

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

UTILISATION DE SYSTÈMES D'ÉTIQUETTES POUR LA  
FONCTIONNALISATION D'UN BIOPOLYMÈRE - APPLICATIONS À LA  
LIVRAISON DE GÈNE

ANTOINE DEMOLLIENS

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MAÎTRISE  
ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

OCTOBRE 2008



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
ISBN: 978-0-494-69167-0  
*Our file* *Notre référence*  
ISBN: 978-0-494-69167-0

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

■ ■ ■  
**Canada**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

UTILISATION DE SYSTÈMES D'ÉTIQUETTES POUR LA  
FONCTIONNALISATION D'UN BIOPOLYMÈRE - APPLICATIONS À LA  
LIVRAISON DE GÈNE

présenté par : Antoine Demolliens

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. FAVIS Basil, Ph.D., président

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. BUSCHMANN Michael, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. PELLERIN Christian, Ph.D., membre

## REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mes directeurs de recherche, les professeurs Grégory De Crescenzo et Michael Buschmann pour leur soutien, leur disponibilité et leur aide pour l'avancement constant de mon projet. Je les remercie également de m'avoir offert l'opportunité de découvrir le génie biomédical et le monde des technologies appliquées au vivant.

Je remercie également le CRSNG pour m'avoir octroyé le financement de mon projet de maîtrise.

Je tiens à remercier très chaleureusement Marc pour son intérêt, ses idées et son soutien constant. Sans lui, ce projet ne serait jamais arrivé à ce terme. Merci d'avoir partagé toutes ses heures de discussion sur mon projet! Merci aussi à Isabelle pour les modèles de microcalorimétrie.

Merci aussi à tous les autres étudiants et associés de recherche de mes deux laboratoires, c'est toujours plus facile de travailler dans une si bonne ambiance! Merci aussi pour vos conseils, vos idées et vos protéines. Merci en particulier à Cyril, Anne, Eric, Aline, Vincent et Pei Lian pour votre aide et surtout pour tout le reste!

Merci à mes parents et mes 4 frères et sœur, Marie, Bertrand, Etienne et Pierre pour m'avoir toujours encouragé à me lancer dans de nouveaux projets et à garder toujours le sourire. Merci aussi à ceux qui m'ont permis de garder le cap, Magali, Nathalie, Sylvain, Julie, Aurélie et Bartouille.

Enfin, la meilleure pour la fin, merci à Margot pour ses encouragements, sa présence, ses mots qu'il faut quand il le faut, son rire et son sourire. A ♥ M.

## RÉSUMÉ

En 2006, le traitement des lésions causées par dégénérescences cartilagineuses a représenté un fardeau de 5 milliards de dollars et les techniques utilisées à ces fins sont encore imparfaites. Parallèlement, un intérêt croissant se développe pour le chitosane et ses dérivés. En effet, les propriétés physicochimiques et biologiques du chitosane, un polymère naturel de glucosamines partiellement acétylé, en font un candidat idéal pour des applications de livraison de gène, thérapie appelée à lutter entre autres contre les dégénérescences cartilagineuses et suppléer les thérapies mises en œuvre à l'heure actuelle dans le domaine de la médecine régénératrice. Les travaux exposés ici présentent une manière innovante de fonctionnalisation du chitosane pour accroître l'efficacité de ce dernier comme porteur d'ADN aux cellules.

Le premier système étudié se base sur l'utilisation d'étiquettes peptidiques, le domaine coiled-coil. Un des partenaires (peptide coil) est ajouté sur une protéine ou peptide alors que le peptide coil complémentaire est greffé au chitosane. Lors de la mise en présence du chitosane modifié et de la protéine étiquetée, un complexe stable et spécifique se forme spontanément lors de la mise en solution des deux composés modifiés. Un protocole de greffage covalent d'un des peptides coils à l'aide d'une enzyme, la tyrosinase, a été établi et son efficacité a été prouvée à l'aide de mesures en ultraviolet et en infrarouge. Puis, l'interaction entre un facteur de croissance (EGF, Epidermal Growth Factor) et le chitosane, tous deux étiquetés avec des coils complémentaires a été étudiée à titre de modèle grâce à la technologie de résonance plasmonique de surface (SPR). Ces tests montrent qu'environ 7 étiquettes coil ont été greffées à chaque chaîne de chitosane d'une longueur de 1250 motifs. De plus, le domaine coiled-coil est encore capable de se former, démontrant que la bioactivité de l'étiquette a été préservée.

La nature cationique du chitosane est à l'origine du développement du second système : une étiquette de nature anionique greffée au peptide d'intérêt viendra interagir directement avec le chitosane qui joue le rôle de récepteur. La caractérisation de ce système innovant a été menée au cours du projet à l'aide de deux peptides tests étiquetés

et marqués avec un fluorophore. L'un se compose de 5 résidus chargés négativement et le second de 10 résidus. Des tests menés par microcalorimétrie (ITC) et par résonance plasmonique de surface ont permis de caractériser l'interaction électrostatique entre étiquette et chitosane. L'interaction se distingue par une grande affinité à pH 6.0. De plus, il a été observé que les peptides s'associent au chitosane de manière électrostatique, puis entre eux via une interaction entre fluorophores, ce que des mesures en ultraviolet ont confirmé. Des essais de perte de fluorescence des peptides greffés au biopolymère ont confirmé cette hypothèse d'interaction des fluorophores et ont permis d'établir un protocole de greffage optimal. Les différents essais ont montré que chaque chaîne de chitosane ayant une masse moléculaire 200 kDa et un degré de désacétylation 80% pouvait accueillir un nombre variable de peptides, à savoir 83 pour le peptide 5E et 42 pour le 10E.

Ainsi, dans les deux cas de figure, le chitosane acquiert une propriété supplémentaire, celle de la protéine adjointe par le système d'étiquettes, tout en conservant les siennes. Cependant, du fait que les nanoparticules ADN/chitosane sont formées dans un excès de chitosane, l'injection directe de peptides étiquetés engendrerait une perte substantielle de celui-ci par greffage sur les chaînes de chitosane libre au détriment des complexes. Compte tenu de l'objectif final, soit la modification contrôlée de nanoparticules pour la livraison de gène, une méthode de séparation des nanoparticules du chitosane libre a été mise au point. Ce dernier possède la capacité de lier le peptide étiqueté au détriment des nanoparticules, ce qui pourrait engendrer une perte substantielle de matériel lors du greffage. A l'aide d'une étape d'ultracentrifugation en gradient de densité suivie d'une dialyse, les nanoparticules ont été séparées et caractérisées. A l'aide de mesures de fluorescence et de diffusion dynamique de la lumière (DLS), il a été observé que le procédé ne les dégrade pas et que près de 80% du total initial est extrait du milieu avec une concentration finale en chitosane libre négligeable.

Nous avons étudié le potentiel de deux systèmes d'étiquettes, l'un bien connu et caractérisé et l'autre totalement nouveau. Dans les deux cas, le peptide étiqueté a été

conjugué au chitosane avec un rendement intéressant. De plus, le développement du protocole de purification offre de nouvelles possibilités pour l'étude de la fonctionnalisation de complexes directement utilisables pour la livraison de gène.

## ABSTRACT

In 2006, the treatment of diseases and lesions caused by the degeneration of cartilage represented a bill of 5 billions dollars. Moreover, the procedures that aim at healing those lesions are still not entirely successful. These facts create a growing interest in chitosan, a partly desacetylated natural polysaccharide made of glucosamine monomers and whose properties for cell transfection in gene delivery process are well-known. One objective in this latter area is assisting the existing therapies for cartilage degeneration. Thus, this project explores the modification of chitosan in a universal and innovative way to obtain high efficiency transfection vectors for gene delivery.

The first method is based on the use of a well-characterized capture/delivery system based on two different peptides called coil peptides that were designed to interact in a stable and specific manner. The grafting of one of them on chitosan and the presence of its partner on the N-terminus of a protein enables the grafting of the coil-tagged protein through the formation of a stable coiled coil domain. Using an enzyme called tyrosinase, the coil peptide was covalently conjugated to chitosan, with a yield of 7 peptides per chitosan chain (1250 monomeric units) as demonstrated by ultraviolet and infrared assays. Surface Plasmon Resonance based assays gave evidence that the grafted coil is still bioactive since a coil-tagged protein (i.e., the Epidermal Growth factor) was able to bind the coil-derivatized chitosan.

The second approach we proposed exploits the cationic charge borne by chitosan under acidic conditions. Two anionic tags of different lengths (5E and 10E peptides corresponding to respectively 5 and 10 glutamic acid residues) were labeled with a fluorescent dye to assess their binding to chitosan. Microcalorimetry assays showed that the interaction was of high affinity and stability at pH 6.0 for both peptides. Moreover, additional interactions between fluorophores were observed and confirmed by ultraviolet assays. Owing to these interactions, self quenching of peptide fluorescence took place and was taken advantage of for determining optimal conditions for the preparation of peptide / chitosan complexes. We found that a one-shot mixing of peptides into a solution of chitosan gives the best results in terms of stability and

complex solubility. Between 83 chains for the 10E peptide and 42 chains for the 5E peptide per chitosan chain were conjugated to a 200 kDa – 80% chitosan,

Peptides or protein grafting on chitosan is thus enabled by these two risk-free processes, allowing chitosan functionalization. However, as DNA / chitosan nanoparticles are prepared in an excess of chitosan, direct injection of peptide into a solution of freshly prepared complexes may lead to a substantial loss of peptides, a consequence of the grafting of injected peptide on free chitosan. It was then crucial to develop a robust protocol aimed at separating DNA / chitosan nanoparticles from free chitosan so as to be able to functionalize the nanoparticles with minimum loss of peptides due to their demonstrated interactions with free chitosan. A purification method was thus designed. The latter is based on step gradient ultracentrifugation followed by dialysis. Fluorescence and Dynamic Light Scattering (DLS) assays allowed us to demonstrate that the nanoparticles were separated from free chitosan and that the process did not change the morphology or size of the complexes.

In conclusion, two processes for the functionalization of chitosan as well as a purification protocol being compatible with both of them were developed. This work thus paves the way for the development of improved gene delivery approaches based on functionalized chitosan nanoparticles.

## TABLE DES MATIÈRES

|                                                                                                                         |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| REMERCIEMENTS.....                                                                                                      | iv    |
| RÉSUMÉ.....                                                                                                             | v     |
| ABSTRACT.....                                                                                                           | viii  |
| TABLE DES MATIÈRES.....                                                                                                 | x     |
| LISTE DES TABLEAUX.....                                                                                                 | xiii  |
| LISTE DES FIGURES.....                                                                                                  | xiv   |
| LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....                                                                                   | xviii |
| LISTE DES ANNEXES.....                                                                                                  | xix   |
| 1. Chapitre 1 : Contexte et revue bibliographique.....                                                                  | 1     |
| 1.1. Contexte.....                                                                                                      | 1     |
| 1.2. Organisation du mémoire.....                                                                                       | 2     |
| 1.3. Le chitosane et la chitine.....                                                                                    | 3     |
| 1.3.2. Propriétés.....                                                                                                  | 6     |
| 1.4. Applications.....                                                                                                  | 8     |
| 1.4.1. Applications non médicales.....                                                                                  | 8     |
| 1.4.2. Le chitosane pour la régénération des tissus.....                                                                | 9     |
| 1.4.3. Le chitosane pour la livraison de principes actifs.....                                                          | 10    |
| 1.4.4. Le chitosane pour la livraison de gène.....                                                                      | 11    |
| 1.5. Bibliographie sur la modification du chitosane.....                                                                | 15    |
| 1.5.1. Les techniques de fonctionnalisation du chitosane.....                                                           | 16    |
| 1.5.2. Les améliorations apportées par l'utilisation de chitosanes modifiés.....                                        | 19    |
| 2. Chapitre 2. Problématique, Hypothèses et Objectifs.....                                                              | 24    |
| 2.1. Problématique.....                                                                                                 | 24    |
| 2.2. Hypothèses de travail.....                                                                                         | 26    |
| 2.3. Objectifs.....                                                                                                     | 26    |
| 3. Chapitre 3. Tyrosinase-Catalyzed Synthesis of a Universal Coil-Chitosan Bioconjugate for Protein Immobilization..... | 28    |
| 3.1. Abstract.....                                                                                                      | 28    |
| 3.2. Keywords.....                                                                                                      | 29    |
| 3.3. Introduction.....                                                                                                  | 29    |
| 3.4. Materials and Methods.....                                                                                         | 33    |
| 3.4.1. Synthesis of Kcoil-Chitosan Bioconjugate.....                                                                    | 34    |
| 3.4.2. UV Measurements.....                                                                                             | 34    |
| 3.4.3. IR Measurements.....                                                                                             | 35    |
| 3.4.4. Surface Plasmon Resonance (SPR)-Based Assays.....                                                                | 35    |
| 3.5. Results and Discussion.....                                                                                        | 36    |
| 3.5.1. Tyrosinase-Mediated Grafting of Kcoil Peptide onto Chitosan.....                                                 | 36    |
| 3.5.2. UV-Vis Spectroscopic Characterization.....                                                                       | 36    |
| 3.5.3. FT-IR Characterization of the Compounds.....                                                                     | 38    |
| 3.5.4. Surface Plasmon Resonance characterization of Ecoil Tagged EGF Binding to Kcoil-Conjugated Chitosan.....         | 41    |

|         |                                                                                                                                              |     |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.6.    | Conclusion .....                                                                                                                             | 45  |
| 3.7.    | Acknowledgments .....                                                                                                                        | 46  |
| 4.      | Chapitre 4 : Formation contrôlée de complexes polyélectrolytes chitosane/protéines par l'intermédiaire d'une étiquette électrostatique ..... | 47  |
| 4.1.    | Introduction sur l'utilisation des propriétés polyélectrolytes du chitosane .....                                                            | 47  |
| 4.1.1.  | Les complexes polyélectrolytes avec le chitosane .....                                                                                       | 47  |
| 4.1.2.  | Les étiquettes constituées d'acides aminés polaires .....                                                                                    | 48  |
| 4.2.    | Techniques expérimentales .....                                                                                                              | 49  |
| 4.2.1.  | Matériel .....                                                                                                                               | 49  |
| 4.2.2.  | Méthodes .....                                                                                                                               | 52  |
| 4.3.    | Résultats et discussion .....                                                                                                                | 58  |
| 4.3.1.  | Interaction peptide chitosane sur une matrice et en solution .....                                                                           | 58  |
| 4.3.2.  | Interaction peptide-chitosane en solution : mesures par microcalorimétrie (ITC) .....                                                        | 60  |
| 4.3.3.  | Interaction des ligands entre plus proches voisins : spectres UV/visible des complexes peptide/chitosane .....                               | 76  |
| 4.3.4.  | Étude de la formation des complexes entre peptides étiquetés et chitosane par auto-extinction du fluorophore.....                            | 82  |
| 4.4.    | Conclusion générale et synthèse du chapitre .....                                                                                            | 98  |
| 5.      | Chapitre 5. Développement d'une méthode de séparation des nanoparticules ADN/chitosane .....                                                 | 100 |
| 5.1.    | Contexte et introduction .....                                                                                                               | 100 |
| 5.2.    | Matériel et Méthodes .....                                                                                                                   | 102 |
| 5.2.1.  | Le chitosane.....                                                                                                                            | 102 |
| 5.2.2.  | L'ADN .....                                                                                                                                  | 102 |
| 5.2.3.  | Marquage du chitosane à la rhodamine B .....                                                                                                 | 104 |
| 5.2.4.  | Marquage de l'ADN au Cy3 ou Cy5 .....                                                                                                        | 105 |
| 5.2.5.  | Mesure de la fluorescence .....                                                                                                              | 106 |
| 5.2.6.  | Mesure des diamètres hydrodynamiques par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS).....                                                        | 106 |
| 5.2.7.  | Formation de nanoparticules .....                                                                                                            | 106 |
| 5.2.8.  | Centrifugation simple.....                                                                                                                   | 107 |
| 5.2.9.  | Filtration de particules .....                                                                                                               | 108 |
| 5.2.10. | Ultracentrifugation à angle fixe.....                                                                                                        | 108 |
| 5.2.11. | Préparation des gradients d'ultracentrifugation.....                                                                                         | 108 |
| 5.2.12. | Ultracentrifugation à godets mobiles – Ultracentrifugation par gradient (step gradient) .....                                                | 109 |
| 5.2.13. | Dialyse du sucre .....                                                                                                                       | 110 |
| 5.3.    | Résultats et discussion .....                                                                                                                | 111 |
| 5.3.1.  | Tests préliminaires.....                                                                                                                     | 111 |
| 5.3.2.  | Extraction par ultracentrifugation.....                                                                                                      | 113 |
| 5.3.3.  | Séparation avec le rotor à godets mobiles – MLS-50.....                                                                                      | 115 |
| 5.3.4.  | Purification des fractions – Dialyse du sucre.....                                                                                           | 124 |

|                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.3.5. Synthèse sur le protocole d'extraction.....                                                                                          | 127 |
| 5.4. Résultats et discussion - Perte de fluorescence du chitosane marqué à la<br>rhodamine lors des expériences d'ultracentrifugation ..... | 133 |
| 5.4.1. Observation des pertes en fluorescence .....                                                                                         | 133 |
| 5.4.2. Tests sans centrifugation.....                                                                                                       | 135 |
| 5.4.3. Interprétation et discussion.....                                                                                                    | 140 |
| 5.5. Conclusion générale .....                                                                                                              | 143 |
| 6. Chapitre 6. Discussion générale.....                                                                                                     | 145 |
| 7. Conclusion et Recommandations.....                                                                                                       | 148 |
| RÉFÉRENCES .....                                                                                                                            | 150 |
| ANNEXES .....                                                                                                                               | 166 |

## LISTE DES TABLEAUX

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tableau 1.</b> Récapitulatif des séquences, masses molaires et dénominations des peptides utilisés dans l'étude .....                                                                                                                                                                                         | 51  |
| <b>Tableau 2.</b> Concentrations en peptide utilisées pour le titrage par ITC. $C_{\text{chaînes}}$ représente la concentration en peptide et $C_E$ la concentration en acides glutamiques. Elles sont exprimées en mM et le titre massique est exprimé en $\mu\text{g/ml}$ . ....                               | 54  |
| <b>Tableau 3.</b> Composition des échantillons testés en UV/Visible.....                                                                                                                                                                                                                                         | 56  |
| <b>Tableau 4 .</b> Récapitulatif des paramètres thermodynamiques tirées de l'analyse des isothermes des peptides marqués avec le modèle SSIS. Les enthalpies sont exprimées en kcal/mol et les constantes d'interaction en $\text{M}^{-1}$ . ....                                                                | 68  |
| <b>Tableau 5.</b> Paramètres thermodynamiques obtenues par analyse des isothermes des peptides non marqués (modèle SSIS et Mc Gee Van Hippel). Toutes les définitions et les unités des grandeurs sont données dans le tableau 4. ....                                                                           | 74  |
| <b>Tableau 6.</b> Tableau récapitulatif des propriétés spectroscopiques des différents composés testés en UV/Visible (cf Figure 28).....                                                                                                                                                                         | 79  |
| <b>Tableau 7.</b> Récapitulatif des ratios de saturation obtenus par auto-extinction et ITC....                                                                                                                                                                                                                  | 89  |
| <b>Tableau 8.</b> Récapitulatif des ratios N/E de saturation mesurés par auto-extinction des fluorophores. La seconde ligne pour chaque peptide correspond au nombre de peptides greffés par chaîne de chitosane. Les saturations sont indiquées par une flèche rouge sur les graphiques d'auto-extinction. .... | 97  |
| <b>Tableau 9.</b> Concentrations de chitosane et d'ADN dans les différents milieux.....                                                                                                                                                                                                                          | 107 |
| <b>Tableau 10.</b> Fluorescence dans le filtrat pour les filtrations de nanoparticules et de chitosane libre.....                                                                                                                                                                                                | 112 |
| <b>Tableau 11.</b> Récapitulatif des proportions d'ADN, chitosane libre et nanoparticules sédimentant dans les dernières couches du gradient de centrifugation (35 000 RPM, 1h pour le chitosane et les nanoparticules, 3h pour l'ADN, 15°C).....                                                                | 124 |
| <b>Tableau 12.</b> Évolution de la quantité de fluorescence récupérée tout au long du procédé .....                                                                                                                                                                                                              | 131 |
| <b>Tableau 13.</b> Rayons hydrodynamiques mesurés pour chacun des tests réalisés après et avant traitement (centrifugation + dialyse) .....                                                                                                                                                                      | 133 |

## LISTE DES FIGURES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> Structures de la chitine, du chitosane et de la cellulose. Le chitosane représenté ici possède un degré de désacétylation de 100% Source : <a href="http://members.tripod.com/~Dalwoo/structure.htm">http://members.tripod.com/~Dalwoo/structure.htm</a> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 4  |
| <b>Figure 2.</b> Variation du DDA en fonction de la concentration en soude et du temps de traitement (Figure adaptée de Chang et al., 1997).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 6  |
| <b>Figure 3.</b> Libération contrôlée <i>in vitro</i> de dorzoamide par différentes nanoparticules de chitosane.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 11 |
| <b>Figure 4.</b> Étapes de la livraison de gène à l'aide d'un complexe ADN/polycation .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 12 |
| <b>Figure 5.</b> Comparaison des taux de transfection des systèmes ADN/Lipofectamine (ADN-Lipo) et ADN/chitosane dans différents types cellulaires (D'après Mao et al., 2001) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 13 |
| <b>Figure 6.</b> Variation du taux de transfection de particules ADN/chitosane observé dans des cellules HEK 293. Des chitosanes aux propriétés différentes (masse moléculaire, DDA) ont été testés. Les conditions de préparation (N/P et pH) ont également varié. (Adapté de Lavertu et al. 2006).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 15 |
| <b>Figure 7.</b> Schéma général d'une réaction de Schiff entre le chitosane et un aldéhyde. La chaîne principale de l'aldéhyde est greffée sur la chitosane .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 18 |
| <b>Figure 8.</b> Formation d'un complexe galactose-chitosane. Les nanoparticules formées avec un tel complexe ne sont pas très stables, ce qui nécessite le greffage d'un second polymère (PEG, PEI). Le galactose permet le ciblage des cellules hépatiques .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 22 |
| <b>Figure 9.</b> Synthèse d'un bioconjugué RGD/chitosane.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 23 |
| <b>Figure 10.</b> Stratégies adoptées pour la modification du chitosane .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 25 |
| <b>Figure 11.</b> Schematic representation of the heterodimeric E/K coiled-coil domain and its application as a universal capture/delivery system. Each heptad, K-V-S-A-L-K-E for the Kcoil and E-V-S-A-L-E-K for the Ecoil, is repeated five times in each peptide. The stability of the coiled-coil complex is primarily due to the formation of a hydrophobic core involving leucine and valine residues of each coil, while electrostatic interactions provide additional stability as well as high specificity. This universal system enables the immobilization of coil tagged proteins (e.g. EGF as shown) on chitosan conjugated with its partner coil. .... | 31 |
| <b>Figure 12.</b> Chemical and tyrosinase-catalyzed reactions for the conjugation of a tyrosine-containing peptide to chitosan. Tyrosinase catalyzes the formation of an O-quinone derivative that undergoes a non-enzymatic reaction with chitosan to form two types of products, i.e., a Schiff base and a Michael's type adduct. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 32 |
| <b>Figure 13.</b> UV/vis spectrophotometric measurements demonstrate that both peptide and tyrosinase are necessary for bioconjugation on chitosan. (a) Each chitosan sample was incubated overnight in buffered solution with either tyrosinase (Control #1), peptide (Control #2, not shown), or both and then washed following the procedure described in section 2.1. (b) The spectrum of the peptide-conjugated chitosan after subtraction of the chitosan only spectrum is compared to that of the pure peptide. ....                                                                                                                                          | 38 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 14.</b> FT-IR characterization of the Kcoil-chitosan bioconjugate. FT-IR spectra of (1) pure chitosan, (2) Control #1 (no peptide), (3) Control #2 (no tyrosinase) and (4) Kcoil conjugated to chitosan. The products were prepared as described in section 2.1 of Materials and Methods. The resolution was set to $2\text{ cm}^{-1}$ and the measurement frequency was 5 kHz. The ranges of wavelengths shown are (a) $700\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ (b) $1500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ and (c) $3100\text{-}3650\text{ cm}^{-1}$ ..... | 40 |
| <b>Figure 15.</b> SPR investigation of coil tagged EGF / Kcoil chitosan interactions .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 43 |
| <b>Figure 16.</b> Étiquettes 5E (n=5) et 10E (n=10) à pH 6.0 .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 49 |
| <b>Figure 17.</b> Structure du fluorophore 5-FAM .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 51 |
| <b>Figure 18.</b> Données expérimentales obtenues par microcalorimétrie (courbe noire) entre le peptide 5E (0.045 mM) et le chitosane (28 injections, $1.6\text{ }\mu\text{M}$ ). Le titrage a été réalisé en inverse, c'est-à-dire par ajout de chitosane dans la solution de peptide. La courbe rouge correspond au contrôle, c'est-à-dire à la dilution de chitosane dans le MES.....                                                                                                                                                                 | 55 |
| <b>Figure 19.</b> Comparaison des injections sur une surface de chitosane de concentrations $1.3\text{ }\mu\text{g/ml}$ et $4\text{ }\mu\text{g/ml}$ de peptide 5E (courbe rouge supérieure) et de $0.7\text{ }\mu\text{g/ml}$ et $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ pour le peptide témoin (courbe verte inférieure). La surface référence était laissée nue. Les flèches bleues désignent la fin de l'injection (phase d'association) et le début d'injection de tampon (phase de dissociation).....                                                            | 59 |
| <b>Figure 20.</b> Isotherme de l'injection de peptide 10E $35\text{ }\mu\text{g/ml}$ dans une solution de chitosane concentrée $20.4\text{ }\mu\text{g/ml}$ . Le tampon utilisé était du MES pH 6.0.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 61 |
| <b>Figure 21.</b> Pics de dégagement de chaleur obtenus pour la dilution du peptide 10E $35\text{ }\mu\text{g/ml}$ dans du MES pH 6.0 .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 62 |
| <b>Figure 22.</b> Pics de dégagement de chaleur pour la dilution du chitosane $326,4\text{ }\mu\text{g/ml}$ dans du tampon MES pH 6.0.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 63 |
| <b>Figure 23.</b> Isothermes du peptide 5E étiqueté. Les concentrations étaient de $0.040\text{ mM}$ (losanges) et de $0.045\text{ mM}$ (carrés) dans le MES à pH 6.0 qui servait également de référence. Le témoin avait pour concentration $0.040\text{ mM}$ (ronds).....                                                                                                                                                                                                                                                                              | 65 |
| <b>Figure 24.</b> . Isothermes du peptide 10E étiqueté. Les concentrations étaient de $0.03\text{ mM}$ pour les deux essais (losanges et carrés). Le témoin était lui aussi à $0.03\text{ mM}$ (triangles) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 66 |
| <b>Figure 25.</b> Isothermes comparés du 10E avec et sans fluorophore. La concentration du 10E sans 5-FAM est de $0.018\text{ mM}$ (losanges noirs et carrés blancs). Le 10E marqué avec 5-FAM (cercles noirs) est donné pour comparaison. La flèche rouge indique la formation d'une bosse pour les 10Es non marqués. ....                                                                                                                                                                                                                              | 72 |
| <b>Figure 26.</b> Isothermes du peptide 15E non marqué avec un fluorophore. La concentration du 15E était de $0.021\text{ mM}$ . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 73 |
| <b>Figure 27.</b> Échantillons témoins et produits des expériences de microcalorimétrie. Les dénominations des échantillons sont inscrites sous les tubes avec leur concentration en peptide correspondante (en mM). Ch désigne le chitosane et Tem le peptide témoin. Tous les échantillons portant la dénomination Ch contiennent $0.25\text{ }\mu\text{M}$ de chitosane. ..                                                                                                                                                                           | 77 |
| <b>Figure 28.</b> Spectres UV/Visible des complexes peptide/chitosane comparés aux peptides purs.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 78 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure 29.</b> Équilibre entre les formes monoanionique et dianionique de la fluoréscéine ( $pK_a=6.43$ ). Adapté de Jones et al.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 80  |
| <b>Figure 30.</b> Schéma récapitulatif du phénomène d'auto-extinction lors de l'interaction entre le chitosane et le peptide étiqueté. L'exemple donné ici est pour l'ajout en une injection de peptide dans une solution de chitosane.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 84  |
| <b>Figure 31.</b> Titration directe et goutte à goutte du chitosane par les peptides 5E et 10E. La fluorescence a été normalisée par rapport au maximum observé. Celle-ci a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 480 nm et d'émission de 530 nm. Les points représentent les valeurs du 10E et la ligne rouge celles du 5E. Les ratios molaires N/E sont exprimés en moles de glucosamines par moles d'acides glutamiques L'expérience a été répétée deux fois pour le 5E et une fois pour le 10E. La flèche indique l'atteinte de la saturation (perte de fluorescence maximale). .... | 85  |
| <b>Figure 32.</b> Formation de colloïdes dans la solution de chitosane par ajout goutte à goutte de peptide. Les petits traits noirs représentent le peptide et les longues chaînes le chitosane. Adapté de Schatz et al. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 86  |
| <b>Figure 33.</b> Titration indirecte et goutte à goutte de peptides par le chitosane. La fluorescence est normalisée par rapport au maximum observé (pas de chitosane ajouté) et elle a été mesurée comme pour la figure 32. . Les ratios molaires N/E sont exprimés en moles de glucosamines par moles d'acides glutamiques. L'expérience a été répétée deux fois pour le 5E et une fois pour le 10E. Les flèches indiquent l'atteinte des saturation (pertes de fluorescence maximales).....                                                                                                      | 87  |
| <b>Figure 34.</b> Formation de complexes sur la chaîne de chitosane injectée dans une solution de peptide concentrée. Les traits noirs représentent le peptide et le trait gris, la chaîne de chitosane. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 88  |
| <b>Figure 35.</b> Niveaux normalisés de fluorescence pour l'ajout en une injection de peptide dans une solution de chitosane. La référence était prise pour une solution de tampon à laquelle était ajoutée la même quantité de peptide. Les ratios molaires N/E sont exprimés en moles de glucosamines par moles d'acides glutamiques. Cette expérience a été répétée 2 fois pour chaque peptide. La flèche indique l'atteinte de la saturation (perte de fluorescence maximale).....                                                                                                               | 91  |
| <b>Figure 36.</b> Fluorescence normalisée d'aliqots de peptide après l'ajout de dilutions de chitosane. L'ajout de tampon dans un aliqot de peptide a été pris comme référence. Les ratios molaires N/E sont exprimés en moles de glucosamines par moles d'acides glutamiques. La flèche indique l'atteinte de la saturation (perte de fluorescence maximale).....                                                                                                                                                                                                                                   | 93  |
| <b>Figure 37.</b> Schéma d'interaction entre le chitosane et le peptide en ajout indirect (chitosane dans peptide) pour des ratios molaires élevés. Adapté de Drogoz et al. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 95  |
| <b>Figure 38.</b> Structure de la rhodamine B utilisée comme marqueur du chitosane .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 104 |
| <b>Figure 39.</b> Structures des marqueurs fluorescents Cy3 et Cy5.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 105 |
| <b>Figure 40.</b> Répartition des fractions prélevées pour les tests en fluorescence .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 110 |
| <b>Figure 41.</b> Précipitation de complexes par ultracentrifugation à angle fixe.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 113 |
| <b>Figure 42.</b> Distribution de particules dans une ultracentrifugation rotor fixe / mobile .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 114 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure 43.</b> Comparaison des niveaux de fluorescence de l'ADN libre dans les différentes fractions du gradient avec et sans centrifugation. L'expérience a été répétée deux fois. L'ADN libre a été centrifugé pendant 3 heures dans un gradient de sucrose 35 / 55 % à 15°C et à 30,000 RPM..... | 116 |
| <b>Figure 44.</b> Distribution de l'ADN libre marqué au Cy5 dans le gradient de sucrose...                                                                                                                                                                                                             | 116 |
| <b>Figure 45.</b> Comparaison de chitosane rhodamine dans gradient 35/55 avec et sans ultracentrifugation. Le chitosane rhodamine a été centrifugé pendant 1 heure à 30,000 RPM et à une température de 15 °C. ....                                                                                    | 118 |
| <b>Figure 46.</b> Proportion de chitosane libre dans les couches du gradient.....                                                                                                                                                                                                                      | 119 |
| <b>Figure 47.</b> Ultracentrifugation 30,000 RPM, 20 min, 15°C ADN marqué au Cy5 .....                                                                                                                                                                                                                 | 120 |
| <b>Figure 48.</b> Distribution en pourcentage des nanoparticules après centrifugation de 20 minutes ADN marqué au Cy5 .....                                                                                                                                                                            | 120 |
| <b>Figure 49.</b> Ultracentrifugation 30,000 RPM 1heure 15°C ADN marqué au Cy3 .....                                                                                                                                                                                                                   | 121 |
| <b>Figure 50.</b> Distribution en pourcentage des nanoparticules après centrifugation de 1 heure ADN marqué au Cy3 .....                                                                                                                                                                               | 122 |
| <b>Figure 51.</b> Mesure de l'absorbance du dialysat de la solution de sucrose pendant la dialyse .....                                                                                                                                                                                                | 125 |
| <b>Figure 52.</b> Spectres UV des échantillons avant et après dialyse.....                                                                                                                                                                                                                             | 127 |
| <b>Figure 53.</b> Ultracentrifugation 1h 30,000 RPM 15°C ADN Cy3 pour des nanoparticules N:P 2 .....                                                                                                                                                                                                   | 128 |
| <b>Figure 54.</b> Centrifugation 35 000 RPM 1h 15°C - Proportion de nanoparticules dans chacune des fractions .....                                                                                                                                                                                    | 129 |
| <b>Figure 55.</b> Spectre UV des fractions dialysées et non dialysées après centrifugation..                                                                                                                                                                                                           | 130 |
| <b>Figure 56.</b> Pics obtenus pour la mesure du rayon hydrodynamique des nanoparticules avant traitement. Les 5 échantillons prélevés étaient dilués dans le MES à pH 6.0 pour une force ionique de 20 mM. Rh représente le rayon hydrodynamique des complexes. ....                                  | 131 |
| <b>Figure 57.</b> Pics obtenus pour la mesure du rayon hydrodynamique des nanoparticules après traitement. Les échantillons étaient dilués dans le MES à pH 6.0 pour une force ionique de 20 mM. Rh représente le rayon hydrodynamique des complexes.....                                              | 132 |
| <b>Figure 58.</b> Fluorescence du chitosane rhodamine après centrifugation 30,000 RPM 20 min 15°C (N : P 2).....                                                                                                                                                                                       | 134 |
| <b>Figure 59.</b> Comparaison de la fluorescence du chitosane rhodamine dans différentes conditions. Les nanoparticules sont à un ratio N/P de 2. ....                                                                                                                                                 | 136 |
| <b>Figure 60.</b> Spectres d'émission de la rhodamine sans centrifugation et en présence ou non de sucrose/ADN .....                                                                                                                                                                                   | 137 |
| <b>Figure 61.</b> Spectres UV/Vis dans différentes conditions Chitosane-Rhodamine/ADN N : P = 1.2 .....                                                                                                                                                                                                | 139 |

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

|       |                                                               |
|-------|---------------------------------------------------------------|
| 5E    | Peptide de séquence 5-FAM-GGGEEEEEE                           |
| 10E   | Peptide de séquence 5-FAM-GGGEEEEEEEEEEEE                     |
| 5-FAM | 5-Carboxyfluoréscéine                                         |
| ADN   | Acide DésoxyriboNucléique                                     |
| ARN   | Acide RiboNucléique                                           |
| DDA   | Degré de DésAcétylation                                       |
| Ecoil | Peptide coil de séquence (EVSALEK) <sub>5</sub>               |
| EDTA  | Acide éthylène-diamine-tétraacétique                          |
| EGF   | Endothelial Growth Factor                                     |
| FGF   | Fibroblast Growth Factor                                      |
| FT-IR | Fourier Transform InfraRed                                    |
| HBS   | Hepes Buffered Saline                                         |
| HEK   | Human Embryonic Kidney                                        |
| ITC   | Isothermal Titration Calorimetry ou microcalorimétrie         |
| Kcoil | Peptide coil de séquence (KVSALKE) <sub>5</sub>               |
| Lipo  | Lipofectamine                                                 |
| MES   | Acide 4-Morpholineethanesulfonique                            |
| PDGF  | Platelet-Derived Growth Factor                                |
| PEG   | PolyÉthylène Glycol                                           |
| PEI   | PolyÉthylène Imine                                            |
| pI    | Potentiel d'ionisation                                        |
| PVP   | Poly(Vinyl Pyrrolidone)                                       |
| RGD   | Peptide de séquence Arginine – Glycine – Acide aspartique     |
| RFU   | Resonance Fluorescent Unit ou Unité de résonance fluorescente |
| RU    | Resonance Unit ou unité de résonance                          |
| siRNA | Small Interfering RiboNucleic Acid                            |
| SSIS  | Single Set of Identical Sites                                 |
| UV    | Ultraviolet                                                   |

## **LISTE DES ANNEXES**

|                                                                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Annexe 1.</b> Description des modèles Single Set of Identical Sites (SSIS) et de Mc Gee Van Hippel et résultats des interpolations par ces méthodes..... | 166 |
| <b>Annexe 2.</b> Certificats d'analyse des peptides utilisés.....                                                                                           | 182 |

# **1. Chapitre 1 : Contexte et revue bibliographique**

## **1.1. Contexte**

En 2006, près de 4.5 millions de Canadiens souffraient d'arthrite selon Santé Canada et 5% de cette population était profondément handicapé dans sa vie quotidienne. Aux États-Unis, près de 5 milliards de dollars ont été dépensés en 2006 pour les interventions orthopédiques liées à l'arthrite articulaire et ce montant ne fait qu'augmenter depuis le début des années 2000 (National Center for Health Statistics, 2005). L'arthrose, qui est la forme la plus répandue d'arthrite, se caractérise par une dégénérescence du cartilage hyalin ou articulaire. Le cartilage est un tissu lisse, innervé et avasculaire, ce qui se traduit par une absence de réparation et de régénération tissulaire après une lésion (Messner et al., 1998).

Les thérapies et chirurgies luttant contre l'arthrose sont malheureusement encore imparfaites. L'implantation de cellules autologues dans le cartilage (Hangody et al., 2001) et les techniques de microfractures (Steadman et al., 2003) ne sont pas encore en mesure de régénérer le cartilage lésé de façon suffisante, ce qui laisse l'arthroplastie comme unique alternative dans le cas de dégénérescences sévères. Il n'est donc pas surprenant que les attentes dans le développement d'outils thérapeutiques soient élevées.

La technique de microfracture consiste à percer des microperforations dans l'os sous chondral sous jacent à la lésion. Ainsi, un caillot sanguin se forme à la surface de l'os et stimule la réparation tissulaire. De plus, afin de s'assurer de la stabilité du caillot formé, une matrice de biopolymère bioadhésif a été développée et implantée, donnant de bons résultats quant à la colonisation de la lésion par les cellules réparatrices (Hoemann, Sun et al., 2007).

Dès lors, il devient intéressant de mettre au point une thérapie alternative et un système de livraison de gène aux cellules a été donc développé à l'aide du même biopolymère. Cette thérapie innovante met à profit la capacité des cellules d'endocyter et de défaire certaines nanoparticules formées d'un polymère et d'une séquence d'ADN. Cette dernière est ensuite adjointe au matériel génétique de la cellule (Corsi et al., 2003).

Ce polymère, nommé *chitosane*, est un polycation capable d'encapsuler, de protéger et de livrer aux cellules cibles des séquences d'ADN (Dash et al., 1999). Ces séquences coderont alors pour des protéines dont les effets sur la réparation et la régénération tissulaire ont été observés *in vitro* et *in vivo*. C'est le cas des protéines FGF (Fibroblast Growth Factor) et PDGF-BB (Platelet-derived Growth Factor), des facteurs de croissance impliqués dans la prolifération cellulaire (Cao et al., 2003; Dimmeler et al., 2000). Le concept général du système de livraison de gène est donc de stimuler les cellules responsables de la réparation tissulaire, cellules qui sont présentes grâce au maintien du caillot sanguin par la matrice de chitosane.

Il devient donc crucial de développer des vecteurs biocompatibles, biodégradables, mais également capables d'incorporer efficacement le matériel génétique dans les cellules. Même si le chitosane sous sa forme native s'est avéré un excellent candidat dans cette optique, certaines modifications chimiques et biochimiques peuvent lui être apportées grâce à la fixation sur celui-ci de molécules bioactives (protéines, peptides, sucres, etc.) capables d'interagir encore davantage avec les cellules ciblées. Cette fonctionnalisation trouve une application à tous les niveaux, que ce soit, par exemple, lors du ciblage de la cellule ou lors de la pénétration dans celle-ci. Une telle modification du chitosane serait capable d'entraîner une stimulation cellulaire et d'une manière plus générale, une réparation tissulaire plus efficaces.

## **1.2. Organisation du mémoire**

Le chapitre 1 présente la revue de littérature et une mise en contexte générale du projet. Le chapitre 2 expose le sujet du mémoire, sa problématique ainsi que ses hypothèses et objectifs. Le chapitre 3 aborde le projet de greffage de peptides sur le chitosane à l'aide d'un système d'étiquettes coiled coil. Ce chapitre est sous la forme de l'article scientifique publié dans la revue *Bioconjugate Chemistry* en septembre 2008 ; il contient toutes les informations pertinentes sur le procédé, sur les méthodes expérimentales utilisées (en particulier greffage par méthode enzymatique avec la tyrosinase et fonctionnement du domaine coiled-coil) ainsi que sur les résultats et leur

discussion. Ensuite, toutes les étapes pour l'élaboration d'un greffage électrostatique sur le chitosane sont abordées dans le chapitre 4. La revue de littérature sur l'utilisation des propriétés électrostatiques du chitosane, les méthodes expérimentales pour la caractérisation, les résultats et leur discussion sont inclus dans cette partie. Pour compléter le corps de ce mémoire, le chapitre 6 présente une méthode d'extraction des complexes ADN / chitosane d'un milieu aqueux. Tout comme les deux chapitres précédents, cette partie résume les principes généraux de la méthode et les résultats des tests réalisés pour sa validation. Finalement, une discussion générale des parties constituant le corps du mémoire et les recommandations pour travaux futurs font l'objet du chapitre 7.

### 1.3. Le chitosane et la chitine

La chitine est un biopolymère extrait de l'exosquelette des insectes et des crustacés représentant en quantité le 2<sup>ème</sup> polysaccharide le plus abondant sur Terre après la cellulose. De grandes quantités sont donc disponibles et ce, à faible coût car il est très facile de l'extraire. Ses propriétés biologiques en font un dérivé intéressant pour des applications biomédicales, mais son insolubilité en milieu aqueux et son inertie chimique le rendent inutilisable pour des applications de génie tissulaire. Contrairement à la grande majorité des polysaccharides, on retrouve sur le chitosane des fonctions chimiques azotées dans sa structure, ce qui offre la possibilité de développer des réactions chimiques en s'appuyant sur ces atomes et donc de modifier le biopolymère.

Pour résoudre les problèmes cités plus haut, il est possible de désacétyler partiellement la chitine à haute température dans l'hydroxyde de sodium. Ce faisant, une partie des monomères de la chitine subit une transformation en résidus glucosamines, ce qui se traduit par la transformation de la fonction acétyl en une amine primaire. Toute la chimie des amines devient alors utilisable au niveau de ces résidus. On se trouve alors en présence de *chitosane* (Figure 1), le dérivé principal de la chitine à la solubilité et aux propriétés chimiques accrues et dont les applications médicales et pharmaceutiques,

mais également dans les domaines du traitement des eaux et de la cosmétique, sont nombreuses.

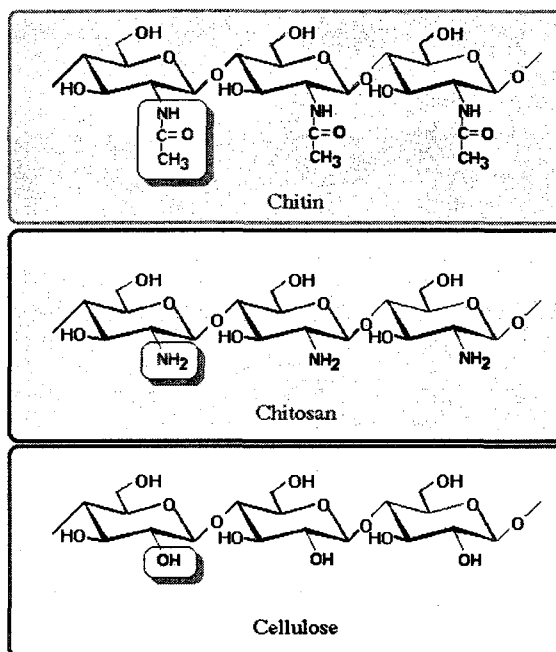


**Figure 1. Structures de la chitine, du chitosane et de la cellulose.**  
 Le chitosane représenté ici possède un degré de désacétylation de 100%  
 Source : <http://members.tripod.com/~Dalwoo/structure.htm>

### 1.3.1. Structure

La chitine est un polysaccharide constitué de monomères de 2-acétoamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucose, donc de nom complet Poly(((1 $\rightarrow$ 4)-2-acétoamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucose)). Dans le cas du chitosane, une partie des monomères de la chitine est transformée en 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucose (ou glucosamine), le groupement acétyl porté par le carbone C2 du polysaccharide étant remplacé par une fonction amine. Le chitosane est donc un copolymère de glucosamine et de N-acétyl-glucosamine, comme on peut le voir sur la figure 1. La présence de ces groupements est essentielle, puisqu'elle confère une solubilité et une réactivité chimique au chitosane, contrairement à la chitine.

La proportion de glucosamine est donc un paramètre important pour caractériser un polymère de chitosane. Cette proportion est nommée Degré de DésAcétylation (DDA) ; ce paramètre représente la proportion de monomères désacétylés parmi l'ensemble des monomères constituant le polymère. Les valeurs de DDA s'échelonnent de 10 à 99% et sont corrélées à un certain comportement chimique, en particulier à la solubilité du chitosane en milieu aqueux. Le chitosane représenté sur la figure 1 est quant à lui désacétylé à 100%.

Le deuxième paramètre utilisé pour la classification des chitosanes est caractéristique des polymères en général, il s'agit de la masse molaire moyenne  $M_n$ . Elle est évidemment influencée par le DDA, puisque le remplacement d'un groupement acétyl par un groupement amine a une répercussion directe sur la masse molaire du copolymère. La longueur de chaîne influence également la valeur de la masse molaire. Comme c'était le cas pour le DDA, le comportement chimique et biologique du chitosane dépendra également de sa masse molaire (Kubota, 1998).

Ces deux paramètres sont dépendants des traitements appliqués à la chitine pour produire du chitosane. La désacétylation passe par un chauffage en milieu basique, typiquement de l'hydroxyde de sodium, pendant un temps déterminé. En modulant la concentration initiale en hydroxyde de sodium, la durée et la température du traitement, le DDA et la masse molaire peuvent être modifiés selon les besoins comme on peut le voir sur la figure 2 (Chang et al., 1997). Ainsi, il est possible de moduler dans une certaine mesure les propriétés chimiques, biologiques et physiques du biopolymère (Hamilton et al., 2006; Huang et al., 2004; Youling et al., 2008).

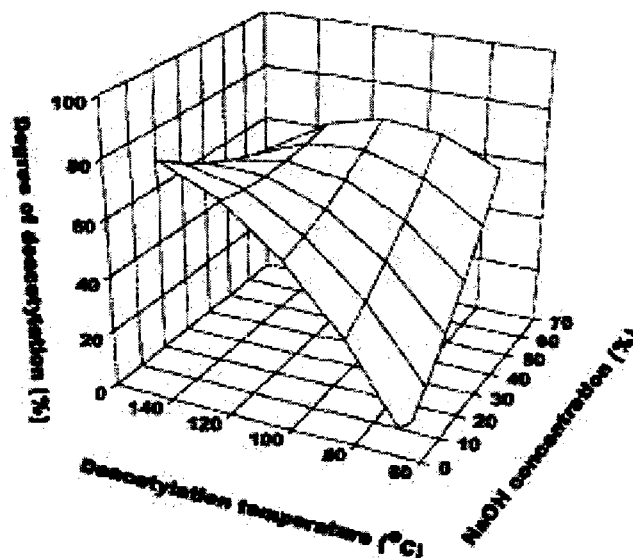


**Figure 2. Variation du DDA en fonction de la concentration en soude et du temps de traitement**  
(Figure adaptée de Chang et al., 1997)

Par ailleurs, il est également possible de modifier ces propriétés en réacétylant le chitosane (l'étape inverse de la transformation des monomères en glucosamines) ou en le dépolymérisant. En agissant ainsi sur la masse molaire ou le DDA, on obtient des chitosanes dont les propriétés spécifiques sont mieux adaptées à certaines applications (Huang et al., 2004).

### 1.3.2. Propriétés

#### 1.3.2.1. Propriétés physico - chimiques

Le chitosane est capable, comme la plupart des polysaccharides, de former des réseaux réversibles ou irréversibles.

Les gels irréversibles se forment par liaisons covalentes entre les chaînes, créant un gel qu'il n'est pas possible de défaire par simple modification des conditions de pH, de température ou par action enzymatique par exemple (Berger et al., 2004). Ce type de gel n'est pas le plus courant dans le cas du chitosane car ce dernier ne possède pas de

fonction chimique pouvant réagir sur elle-même et ainsi former un réseau (Felix et al., 2005).

Par contre, les gels réversibles, qui résultent d'interactions non spécifiques entre chaînes, sont très souvent observés et exploités dans le cas du chitosane. Ces hydrogels ont un comportement variable en fonction des conditions de pH et de température, ce qui permet de moduler la libération de composés actifs encapsulés dans le gel (Peniche et al., 2003). Malgré la répulsion électrostatique due à la nature cationique des chaînes, le chitosane peut s'assembler sous forme d'hydrogel grâce à l'établissement de liaisons hydrogènes entre les résidus non désacétylés et les groupements hydroxyles. Ainsi, tant la masse moléculaire que le DDA du chitosane jouent un rôle dans la formation et la stabilité du réseau. Le réseau formé par le chitosane polyphosphate et le chitosane tripolyphosphate est un des plus connus car il possède des propriétés très intéressantes pour la livraison de principes actifs (stabilité variable en fonction du pH, grande capacité d'encapsulation) (Ahmadi et al., 2008; Mi et al., 1999). Une propriété remarquable et unique du chitosane est sa capacité à former un gel thermosensible avec le glycérol-phosphate. Ce gel thermosensible possède une bonne capacité de chargement et peut être formé aux conditions physiologiques, ce qui n'est pas le cas de la plupart des autres hydrogels à base de chitosane. (Chenite et al., 2001)

#### 1.3.2.2. Propriétés biologiques

Le chitosane est reconnu pour ses propriétés de biocompatibilité, c'est-à-dire l'absence d'induction de réactions inflammatoires ou d'allergies lors de l'introduction, de l'ingestion ou de l'injection de chitosane dans l'organisme (R. Muzzarelli, 1995). Des études comparatives ont montré que le chitosane sous forme de film était aussi biocompatible que le collagène (Berscht et al., 1995). Cet aspect est déterminant pour toutes les applications biomédicales dont il sera question dans la suite.

Le chitosane est également qualifié de biodégradable car lorsqu'il est hydrolysé par certaines enzymes comme le lysozyme ou la chitosanease, les produits de sa biodégradabilité n'entraînent pas de réaction immunitaire de l'organisme. Ils ne sont pas

reconnus comme déterminants antigéniques par l'organisme et ce, peu importe leur degré de désacétylation (Onishi et al., 1999). De plus, ces résidus sont rapidement éliminés (Hirano et al., 1989).

La capacité à stimuler la régénération osseuse en complexant les ions phosphates des tissus de l'os (R. A. A. Muzzarelli et al., 1998) et surtout l'activation de certains phénomènes biologiques comme la production de collagène ou la migration de cellules inflammatoires représentent les propriétés biologiques majeures de ce polysaccharide exploitées dans le domaine de la reconstruction osseuse (Mori et al., 1997). De plus, certaines études suggèrent de surcroît que des propriétés bactériostatique et hémostatique ont été identifiées chez le chitosane dû à la stimulation de la sécrétion de facteurs de croissance (Campos et al., 2007; Fischer et al., 2007).

Pour toutes ces raisons, le chitosane est un vecteur biologique très utilisé pour des applications de médecine régénératrice.

#### **1.4. Applications**

##### **1.4.1. Applications non médicales**

En-dehors du domaine biomédical, le chitosane est très utilisé dans les domaines de l'agriculture pour le traitement des eaux, dans l'agroalimentaire et dans la diététique pour ses propriétés de complexant de lipides.

De par sa charge cationique, le chitosane est capable entre autres de complexer et capturer les anions présents dans les eaux usées (par exemple, les ions chromates, sulfites et thiosulfates) et plus généralement les espèces contaminantes chargées négativement. Sous forme de résine poreuse, le chitosane est également capable d'emprisonner certains cations, le  $\text{Cu}^{2+}$  et le  $\text{Hg}^{2+}$  en particulier. Ainsi, le chitosane est très utilisé comme résines purificatrices et vient en complément des techniques utilisées en purification des eaux usées (Lin et al., 2008; Zhao et al., 2007).

Le chitosane est également capable de complexer les lipides saturés (acide stéarique) et insaturés (acides oléique et isoléique). Cette caractéristique est exploitée en diététique pour la réduction des graisses consommées et du cholestérol, tout

particulièrement chez les personnes atteintes de surpoids. Cette application et son efficacité sont encore controversées, mais plusieurs études ont mis en évidence le potentiel du chitosane pour ces fins (Wydro et al., 2007).

#### 1.4.2. Le chitosane pour la régénération des tissus

Le chitosane possède des propriétés de stimulation cellulaire qui lui ont valu un grand intérêt pour la reconstruction tissulaire, en particulier pour la peau, les cellules neuronales et la reconstruction de cartilage articulaire.

Dans le cas des greffes de peau, il a été démontré que le chitosane formant un film autour de la greffe est efficace pour le traitement de brûlures et la cicatrisation de blessures infligées à la peau en protégeant les tissus avant la cicatrisation et en stimulant cette dernière (Boucard et al., 2007). De plus, le film biocompatible est dégradé par les enzymes de la peau une fois la cicatrisation amorcée.

Le chitosane peut également former des matrices poreuses, biodégradables et sur lesquelles les cellules adhèrent. Ces composés sont utilisés pour la reconstruction neuronale ; les neurones viendront adhérer à la matrice dont la taille de pores aura été contrôlée pour cette application et il sera alors possible de stimuler la croissance d'axones et de dendrites grâce à des facteurs greffés sur la surface du chitosane (Yu et al., 2007). Ce genre d'application est également à l'étude pour la croissance de chondrocytes et de cellules musculaires (Malafaya et al., 2008).

Enfin, comme il a été décrit dans la section 1.3.2.1 « Propriétés physico chimiques », l'ajout de glycérol-phosphate au chitosane permet de former un gel thermosensible, gel capable d'encapsuler des chondrocytes et de les livrer directement sur le site de lésion cartilagineuse (Chenite et al., 2000). Lors d'une élévation de température, les protons du chitosane migrent vers le glycérol phosphate, entraînant la précipitation du polysaccharide. De même, il a été démontré que le chitosane / glycérol-phosphate est un excellent candidat pour la livraison aux cellules de facteurs de croissance, ce qui nous amène à parler de la livraison de molécules, une des utilisations majeures du chitosane dans le domaine biomédical.

#### 1.4.3. Le chitosane pour la livraison de principes actifs

Le fait que le chitosane soit extrêmement biodégradable et biocompatible en font un excellent candidat pour l'encapsulation et la livraison de principes actifs dans l'organisme. Le principe consiste à amener le complexe formé par l'enveloppe de chitosane et le principe actif encapsulé jusqu'à la zone ciblée et de dégrader le chitosane grâce, par exemple, aux conditions de pH, de température ou aux enzymes présentes afin de libérer la molécule active. De plus, en contrôlant la dégradation de l'enveloppe encapsulant le principe actif, il est possible de moduler la diffusion de celui-ci dans les tissus.

De nombreuses molécules ont été testées, des antibiotiques et des anticancéreux en particulier. Un des exemples les plus probants est la libération contrôlée d'insuline pour le traitement du diabète. Des particules éventuellement administrables par voie orale ou respiratoire et constituées d'insuline encapsulée par du chitosane sont capables de livrer l'insuline directement dans le sang et de remplacer les traitements actuels basés sur l'administration d'insuline par injection (Bayat et al., 2008).

Dans le cas plus particulier du chitosane, sa propriété de mucoadhérence le rend intéressant pour des livraisons dans les muqueuses, en particulier nasales, gastrointestinales et vaginales (Bernkop-Schnurch, 2005). Il a aussi été montré que le chitosane possédait un potentiel très intéressant pour la livraison de peptides (Jong-Ho et al., 2008), vaccins ou principes actifs de faibles poids moléculaire (la morphine en particulier) dans le corps humain. (Papadimitriou et al., 2008; Sinswat et al., 2003). La figure 3 illustre un des aspects de la livraison de principes actifs, celle de la livraison ciblée. Suite à l'administration de nanoparticules chitosane/Dorzoamide dans les yeux, le complexe se propage jusqu'à son lieu de livraison, les intestins, où il se défait, libérant au moins 60% du Dorzoamide encapsulé en une heure environ. Il est donc possible grâce à des particules de chitosane d'injecter des principes actifs à un endroit pour agir sur un organe situé ailleurs.

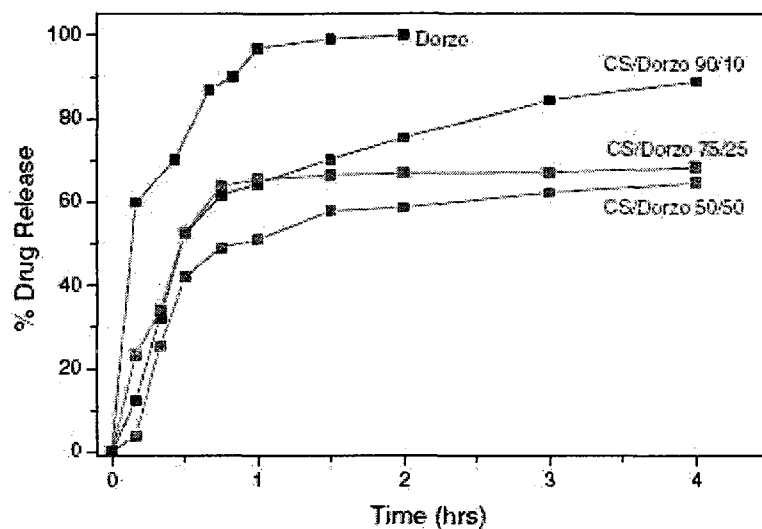


**Figure 3. Libération contrôlée *in vitro* de dorzoamide par différentes nanoparticules de chitosane**  
(Figure adaptée de Papadimitriou et al., 2008)

#### 1.4.4. Le chitosane pour la livraison de gène

La thérapie génique est potentiellement un des outils les plus puissants pour le traitement de maladies ou de dysfonctionnements cellulaires graves. Il est possible par cette voie de stimuler la production de protéines réparatrices ou de réguler les fonctionnements anormaux à l'échelle cellulaire et ce, en utilisant les processus biologiques ayant lieu dans les cellules.

Le défi majeur de la livraison de gènes est alors de trouver un vecteur biocompatible, capable d'amener le gène jusqu'à la cellule et surtout de transfecter celle-ci. La transfection désigne l'incorporation de matériel génétique étranger à celui d'une cellule. Si celle-ci est réussie, la cellule produit la protéine encodée par le gène selon les processus naturels de transcription et traduction. Les différentes étapes de la livraison de gène sont résumées sur la figure 4 pour un complexe ADN/polycation.

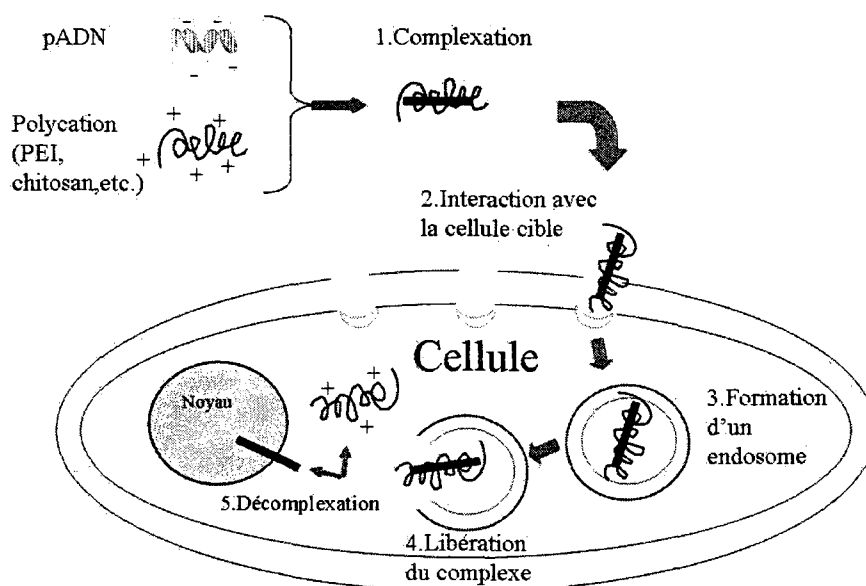


Figure 4. Étapes de la livraison de gène à l'aide d'un complexe ADN/polycation

Les premiers vecteurs de transfection utilisés ont été les virus, mais ils posent d'évidents problèmes d'immunogénicité et de plus, leur production est complexe (Smith, 1995). Du fait de ces problèmes majeurs, de nouvelles approches ont été étudiées, à commencer par les polymères cationiques synthétiques (Lipofectamine, poly-L-lysine, poly-éthylèneimine, etc.). Ces derniers présentent l'avantage de s'associer électrostatiquement avec les plasmides d'ADN par un simple mélange des deux composants et de former ainsi des complexes pour la transfection cellulaire. Malheureusement, ces polymères ne sont pas, pour la plupart, biodégradables ce qui provoque des problèmes de cytotoxicité (T.-H. Kim et al., 2007).

Le choix s'est alors porté sur le chitosane, polymère naturel, biocompatible et biodégradable. En plus de présenter une densité de charge positive suffisante pour complexer l'ADN à des pHs inférieurs à son  $pK_a$ , le chitosane possède des sites disponibles pour le greffage de ligands ou de groupes fonctionnels qui peuvent être mis à profit pour le ciblage cellulaire.

Les expériences ont montré que le chitosane encapsulait l'ADN de façon très stable et que les nanoparticules ainsi formées étaient capables de transfecter différents types cellulaires (Corsi et al., 2003; Erbacher et al., 1998). Malheureusement, le taux de transfection s'avère nettement inférieur à ceux obtenus avec d'autres polymères cationiques, tout particulièrement à l'aide de la Lipofectamine (Figure 5) (Mao et al., 2001). De plus, il a été observé que les particules ADN/chitosane sont libérées plus difficilement des endosomes que les complexes ADN/PEI, possiblement du fait de la protonation insuffisante du chitosane par rapport au PEI (Boussif et al., 1995).

La figure 5 présente les taux d'expression de protéine obtenus pour différentes lignées cellulaires dans le cas d'utilisation de Lipofectamine et de chitosane comme vecteurs d'apport de plasmides codant pour cette protéine. Il est observable que les taux de transfection dans le cas de la Lipofectamine sont plus élevés pour tous les types cellulaires (HEK 293, IB3-1, HTE et HeLa)

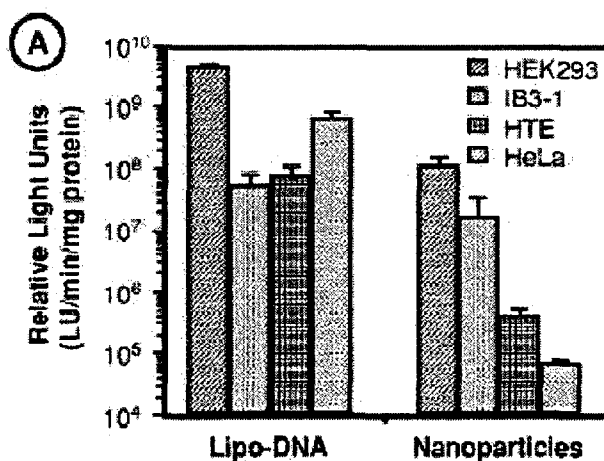


**Figure 5. Comparaison des taux de transfection des systèmes ADN/Lipofectamine (ADN-Lipo) et ADN/chitosane dans différents types cellulaires (D'après Mao et al., 2001)**

Cependant, de nombreux paramètres peuvent être optimisés pour contrebalancer ce taux de transfection relativement faible. Il a été observé que la livraison de gène était meilleure pour des pHs autour de 6.5 et pour certaines combinaisons de DDA et de masse moléculaire (Lavertu et al., 2006). Plus spécifiquement, dans le cas de la masse

moléculaire, une haute masse moléculaire (200 – 1000 kDa) permet une bonne protection de l'ADN alors qu'une masse moléculaire plus faible (10 – 40 kDa) facilite la libération du plasmide une fois le complexe internalisé dans la cellule (Koping-Hoggard et al., 2004). De plus, le ratio N/P (rapport des unités glucosamines du chitosane sur les groupements phosphates du plasmide dans la préparation du complexe) contrôle également la stabilité du complexe et est optimal autour de 5. Des diminutions marquées du taux de transfection ont été observées pour des N/P de 10 ou 20 (Li et al., 1996).

Ainsi, il est possible, en choisissant de façon précise le chitosane utilisé (masse moléculaire et degré de désacétylation spécifiques), le ratio N/P du mélange ADN/chitosane et les conditions de préparation, d'obtenir des taux de transfection très proches de ceux obtenus avec la Lipofectamine. La figure 6 résume les tests réalisés avec des chitosanes de divers masses moléculaires et DDAs ainsi qu'à pH et ratio N : P variables. Comme précédemment, le taux de transfection a été mesuré sur des cellules HEK 293 en utilisant un plasmide codant pour la protéine luciférase et en mesurant la production de cette dernière. La Lipofectamine était utilisée comme référence et est notée CDLF. La figure 6 montre par exemple que des complexes ADN / chitosane préparés avec un chitosane de bas poids moléculaire (10 kDa) et possédant un degré de désacétylation de 80% amènent un rendement très proche du contrôle positif, la Lipofectamine. Le ratio N/P du mélange était de 10 et son pH de 6.5.

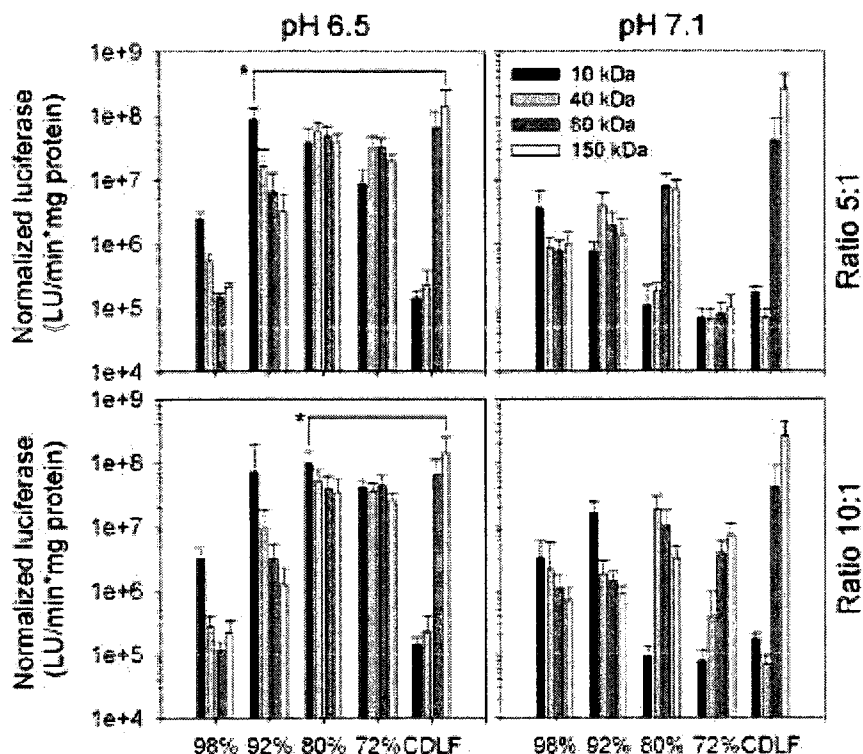


**Figure 6. Variation du taux de transfection de particules ADN/chitosane observé dans des cellules HEK 293. Des chitosanes aux propriétés différentes (masse moléculaire, DDA) ont été testés. Les conditions de préparation (N/P et pH) ont également varié. (Adapté de Lavertu et al. 2006)**

Afin d'optimiser encore davantage ce rendement de transfection, amener des propriétés de ciblage cellulaire ou la capacité pour le chitosane de franchir les barrières physiologiques, les études se sont alors tournées vers la modification de ce dernier.

### 1.5. Bibliographie sur la modification du chitosane

Comme il a été présenté précédemment, le chitosane présente des avantages indéniables (biocompatibilité, biodégradabilité, etc.) pour des applications biomédicales. Toutefois, afin d'accentuer le potentiel du chitosane pour les différentes applications dans lesquelles il est impliqué, de nombreuses études ont été menées sur la fonctionnalisation du chitosane, c'est-à-dire la conjugaison chimique sur le chitosane de molécules présentant des propriétés intéressantes pour l'application visée. Par exemple,

le chitosane possède une solubilité limitée, ce qui peut s'avérer problématique ; le greffage de molécules très hydrophiles pourrait permettre de contrecarrer cet effet. L'objectif général est donc de créer un biomatériau hybride possédant à la fois le potentiel du chitosane et les fonctions des molécules greffées sur le biopolymère.

La présence de nombreux monomères de glucosamines sur la chaîne du biopolymère permet d'avoir accès à l'éventail complet de la chimie des amines, ce qui est une différence majeure par rapport aux autres polymères utilisés en livraison de principes actifs et de gène. De nombreuses techniques ont donc été mises au point pour exploiter cette particularité et adjoindre de nouvelles propriétés physicochimiques et biologiques au chitosane.

#### 1.5.1. Les techniques de fonctionnalisation du chitosane

##### 1.5.1.1. Modifications n'impliquant pas les amines primaires

Les groupements hydroxyles du polysaccharide peuvent être impliqués dans des liaisons faibles, de type hydrogène ou van der Waals avec d'autres molécules, comme des alcanes ou des alcools (Kolyadina et al., 2006). Des réactions d'estérification sur ces mêmes fonctions alcools ont également été testées avec, entre autres, de l'acide citrique (Hsieh et al., 2004). Cependant, ce type de réaction sur le chitosane reste très rare et assez peu exploité, contrairement à la voie des amines.

##### 1.5.1.2. Modifications portant sur les glucosamines

Le groupement  $\text{NH}_2$  (amine primaire) des unités glucosamines reste le centre principal de réactivité du chitosane par ses propriétés nucléophile et acidobasique. Le  $\text{p}K_a$  du chitosane est de 6.5 environ ce qui est inférieur à ceux des amines primaires aliphatiques situé autour de 9-10. Cette valeur varie quelque peu en fonction du DDA et de la masse moléculaire du chitosane.

Le chitosane constitue donc un polycation pour des pH inférieurs à 6.5 et précipite pour des pH supérieurs à cette valeur (Filion et al., 2007; Lavertu et al., 2008). Les amines primaires se protonent en  $\text{NH}_3^+$  pour des pHs inférieurs à 6.5, ce qui modifie

notamment ses propriétés chimiques. Les glucosamines sont donc entièrement responsables de la solubilité du chitosane et pour la plus grande partie, de sa réactivité chimique.

Le doublet non liant présent sur l'atome d'azote des amines primaires déprotonées à  $\text{pH} > 6.5$  rend possible le déroulement de réactions nucléophiles qui constituent la grande majorité des réactions utilisées dans les modifications chimiques du chitosane. Cette propriété est totalement absente dans le cas des amines primaires protonées ( $\text{NH}_3^+$ ) puisque ce doublet non liant est impliqué dans une liaison donneur-accepteur avec le proton  $\text{H}^+$ . Par ailleurs, les conditions pour les attaques nucléophiles sont douces, ce qui est indispensable pour tout traitement chimique impliquant du matériel biologique ou destiné à la biologie et pour la préservation de la structure polymérique du chitosane.

La présence de cette amine primaire permet en particulier le déroulement d'un schéma réactionnel typique entre les amines et les aldéhydes ou cétones, la réaction de Schiff. Les aldéhydes et les cétones sont des fonctions chimiques électrophiles, donc ayant une affinité particulière pour les amines primaires. Le groupement  $\text{NH}_2$  est impliqué dans une attaque nucléophile sur le groupement carbonyle d'un aldéhyde ou d'une cétone qui, après réduction, donnera lieu à un lien covalent entre l'azote du chitosane et le carbone de l'aldéhyde (Figure 7). L'action d'un agent réducteur comme  $\text{NaBH}_4$  suffit à catalyser cette réaction (X. D. Liu et al., 2002).

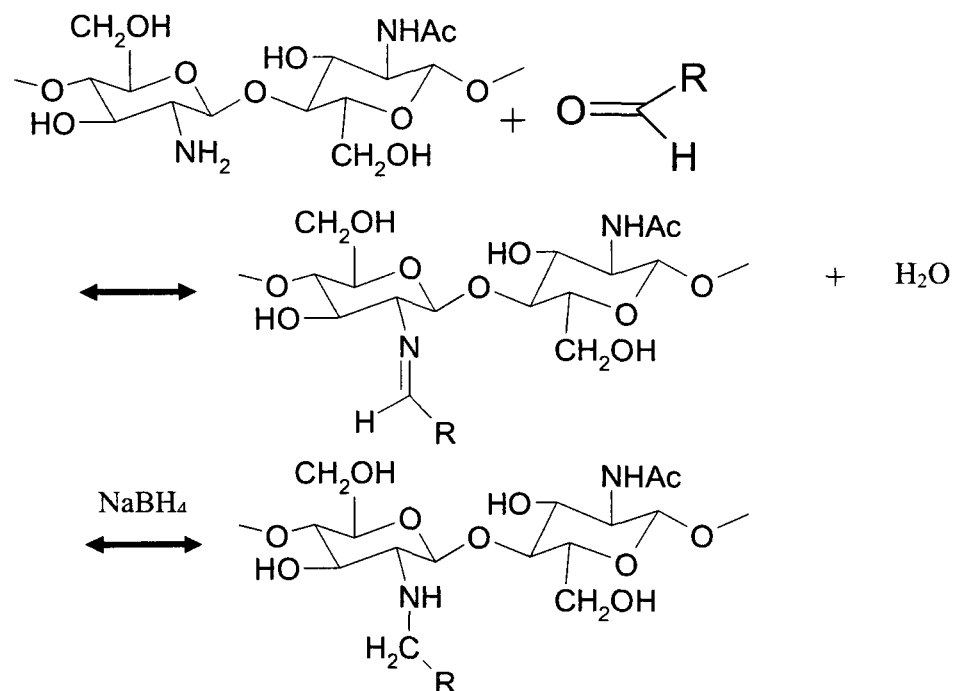


**Figure 7. Schéma général d'une réaction de Schiff entre le chitosane et un aldéhyde.  
La chaîne principale de l'aldéhyde est greffée sur la chitosane**

Les additions de Michael en présence de doubles liaisons ou de cycles aromatiques avec une attaque nucléophile en para du carbonyle sont également possibles (Sashiwa et al., 2003).

Les fonctions amines du chitosane présentent également par leur nucléophilie une réactivité accrue envers les fonctions époxydes (Gruber et al., 1995) et les anhydrides d'acide (Choi et al., 2007) pour l'acylation du chitosane. Les amines primaires sont aussi capables de former une liaison amide ou peptidique avec des acides carboxyliques par activation des acides (Kafedjiiski et al., 2006).

Par ailleurs, cette possibilité de greffage simple par activation des acides carboxyliques permet d'adjoindre au chitosane le type de fonction chimique désirée. Par exemple, l'amine primaire pourra être modifiée, avec un certain taux de greffage contrôlé, en acide carboxylique par simple addition de pyridine (Aiedeh et al., 2001). Cette façon de faire multiplie les possibilités de conjugaison sur le chitosane.

Enfin, l'utilisation de certaines enzymes est envisageable pour des processus biochimiques, leur action pouvant être directe ou indirecte. Dans ce dernier cas, leur effet sera de modifier suffisamment la molécule à greffer pour que le lien covalent entre celle-ci et le chitosane se fasse par simple mise en présence des deux composants. Par exemple, la transglutaminase catalyse la transamidation entre les fonctions  $\text{NH}_2$  du chitosane et un résidu glutamine. En d'autres termes, les fonctions amides portées par les chaînes latérales des résidus glutamine des peptides deviennent réactives avec les amines déprotonées du chitosane (Yi et al., 2005). Une autre possibilité est d'utiliser la tyrosinase, enzyme oxydant les phénols, ce dont il sera question plus longuement dans le Chapitre 3.

Ces procédés sont très utilisés pour réaliser des fonctionnalisations du chitosane, conjugaison qui amène des modifications majeures des propriétés du polysaccharide.

### 1.5.2. Les améliorations apportées par l'utilisation de chitosanes modifiés

#### 1.5.2.1. Les améliorations pour la livraison de principes actifs

Les principes actifs sont souvent livrés dans les muqueuses (nasale, parentérale, vaginale, etc.) ce qui nécessite d'améliorer la mucoadhérence du chitosane. Cette propriété est déjà présente pour le chitosane non fonctionnalisé, mais la conjugaison d'un thiol sur les glucosamines permet de l'exacerber. Ces thiols forment des liaisons covalentes avec la muqueuse, ce qui multiplie par dix la capacité du chitosane à interagir avec les muqueuses tout en restant biodégradable (Kast et al., 2001).

De plus, l'utilisation d'autres dérivés de chitosane permet de contrôler la libération de la molécule encapsulée. Ainsi, l'utilisation de N-succinyl chitosane comme vecteur de livraison permet de s'affranchir des limitations de pH observées avec le chitosane, celui-ci ayant un taux de libération de molécule active constant indépendant du pH (Aiedeh et al., 2001).

### 1.5.2.2. L'utilisation de chitosanes fonctionnalisés pour la livraison de gène

Du fait de l'interaction entre le chitosane et les cellules, les objectifs en livraison de gène sont nombreux : solubilité accrue, meilleur ciblage et stimulation des cellules, libération des complexes des endosomes facilitée, etc. De très nombreux chitosanes fonctionnalisés ont donc été étudiés pour remplir ces différents objectifs.

Il est primordial que les particules d'ADN/chitosane gardent une solubilité maximale pour être transportées par les fluides sanguins jusqu'aux cellules cibles. Ainsi, le chitosane modifié par des chaînes chargées positivement (quaternisation) a démontré une solubilité à des pHs supérieurs à 7 ainsi qu'une augmentation du taux de transfection. Cependant, sa cytotoxicité était légèrement accrue lorsque comparé au chitosane non modifié (Kean et al., 2005). Le greffage de poly(éthylèneglycol) (PEG) sur la chaîne polymérique du chitosane est également très employé ; cette fonctionnalisation mène à une augmentation de la solubilité des complexes et à une meilleure stabilité de ceux-ci (Morimoto et al., 2002).

Au-delà de cette solubilité maximale souhaitée, la conjugaison de molécules hydrophobes sur le squelette du chitosane apporte également des améliorations considérables. Parmi celles-ci, le greffage d'acide déoxycholique, un composant de la bile, engendre l'aggrégation des nanoparticules et l'augmentation du taux de transfection, même si celui-ci reste en deçà des valeurs obtenues avec la Lipofectamine (K. Y. Lee et al., 1998). D'autre part, la modification de glucosamines par de l'acide cholanique (Jong-Ho et al., 2008) et de l'acide stéarique (Hu et al., 2006) ont pour effet respectif de faciliter l'endocytose des nanoparticules et leur libération des endosomes. Le taux de transfection approche alors celui obtenu avec la Lipofectamine.

Comme il a été mentionné dans la partie précédente, une étape limitante dans le processus de livraison de gène avec des complexes ADN/chitosane se situe au niveau de la vitesse de libération des endosomes. Le mécanisme de cet effet n'est pas encore clairement établi, mais deux hypothèses ont été émises. Premièrement, la protonation insuffisante du chitosane impliqué dans les complexes serait responsable de la faible vitesse de sortie des endosomes. Afin de contrer cet effet, du poly(éthylèneimine) a été

adjoint au chitosane afin d'exploiter le « proton sponge effect » du PEI. Ce nouveau vecteur s'est avéré cent fois plus efficace que le PEI seul, mais légèrement cytotoxique et d'une stabilité moindre par rapport au chitosane seul (Jiang et al., 2007). Une autre stratégie a été développée à l'aide de l'acide urocanique dont la capacité d'absorption de protons est aussi connue (T. H. Kim et al., 2003). Les tests ont montré une amélioration de la transfection proportionnelle au taux de modification.

Toutefois, cette interprétation est contestée par d'autres publications. En particulier, il a été montré que la sortie des endosomes pouvait être accélérée sans modifier le pouvoir tampon du polycation, ce qui contredit le mécanisme précédent (Issa et al., 2006). Cette vitesse serait en fait liée à la dégradation enzymatique du chitosane dans les endosomes, dégradation qui aurait pour effet d'augmenter l'osmolarité dans la particule. Ainsi, la pression osmotique engendrerait l'éclatement de la vésicule et la libération du complexe ADN/chitosane. Par ailleurs, le chitosane de faible masse molaire est plus facilement dégradé par les enzymes, ce qui explique que le taux de transfection soit meilleur lors de son utilisation (Köping-Höggård et al., 2003).

Ces modifications du chitosane ne représentent que la moitié des greffages réalisés sur le biopolymère. En effet, la conjugaison de composés possédant des propriétés biologiques spécifiques (protéines, sucres, etc.) prend de plus en plus d'importance dans les études réalisées sur la fonctionnalisation du chitosane.

Une classe de chitosane doublement fonctionnalisé attire beaucoup l'attention de par ses propriétés intéressantes. Le chitosane est d'abord fonctionnalisé à l'aide d'un autre sucre, le galactose, puis par un second polymère dont la principale fonction sera d'augmenter la stabilité du complexe ADN/chitosane modifié dans les milieux aqueux (Figure 8). Le dextran (Y. K. Park et al., 2000), le poly(éthylèneglycol) (I. K. Park et al., 2001) et le poly(vinyl pyrrolidone) (I. K. Park et al., 2003) ont été testés comme polymères stabilisateurs. L'ajout de galactose permet d'adjoindre au chitosane une propriété de ciblage des cellules hépatiques alors que le dextran, le PEG et le PVP augmentent sensiblement la stabilité de l'interaction entre le plasmide et le polycation dans les nanoparticules formées avec ces polymères. Le bioconjugué mannose/chitosane

a également fait l'objet d'études de ciblage pour la livraison de gène au système immunitaire car les cellules responsables de la présentation des antigènes expriment sur leurs membranes des récepteurs au mannose (T. H. Kim et al., 2007).

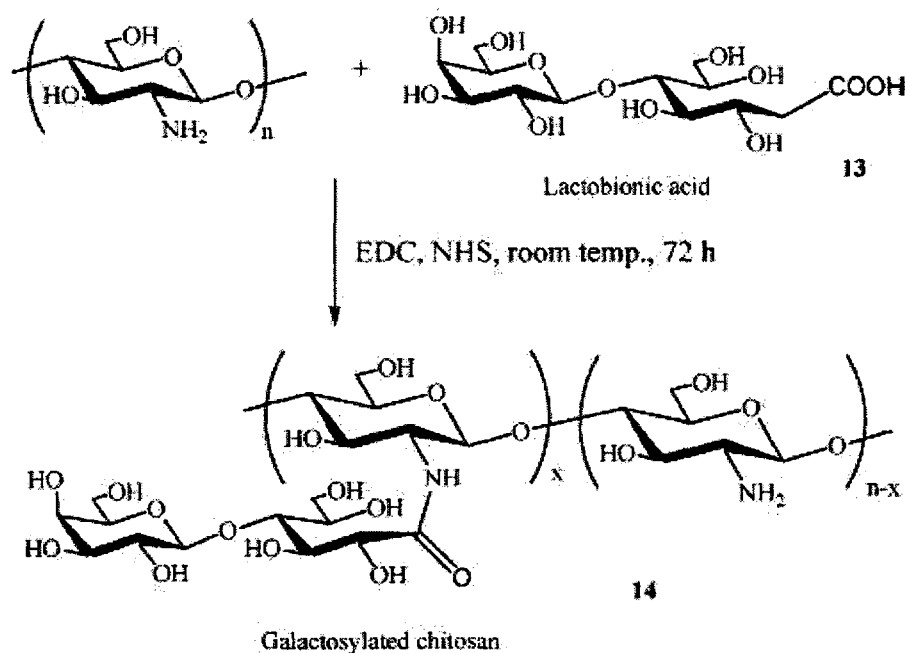


**Figure 8. Formation d'un complexe galactose-chitosane.**

Les nanoparticules formées avec un tel complexe ne sont pas très stables, ce qui nécessite le greffage d'un second polymère (PEG, PEI). Le galactose permet le ciblage des cellules hépatiques (Adapté de Park and al. 2003)

Enfin, la conjugaison de ligands sur le chitosane semble être la fonctionnalisation qui connaît le développement le plus important. Les ligands peuvent être de toute sorte, des laminines et autres peptides RGD (voir Figure 9) (T. H. Kim et al., 2007; Masuko et al., 2005; Matsuda et al., 2005) aux protéines (Mao et al., 2001). Il est crucial de préserver la protéine dans son état natif après greffage pour en garder la bioactivité, ce qui peut rendre la conjugaison parfois délicate. Ainsi, la transférine est une molécule dont les récepteurs sont exprimées à la membrane cellulaire et donc potentiellement utilisable à la fois comme stratégie de ciblage et d'augmentation du taux de transfection (Cotten et al., 1990). Malheureusement, cette dernière propriété n'a pas été observée. Le greffage du peptide KNOB (domaine C-terminal de protéine fibreuse

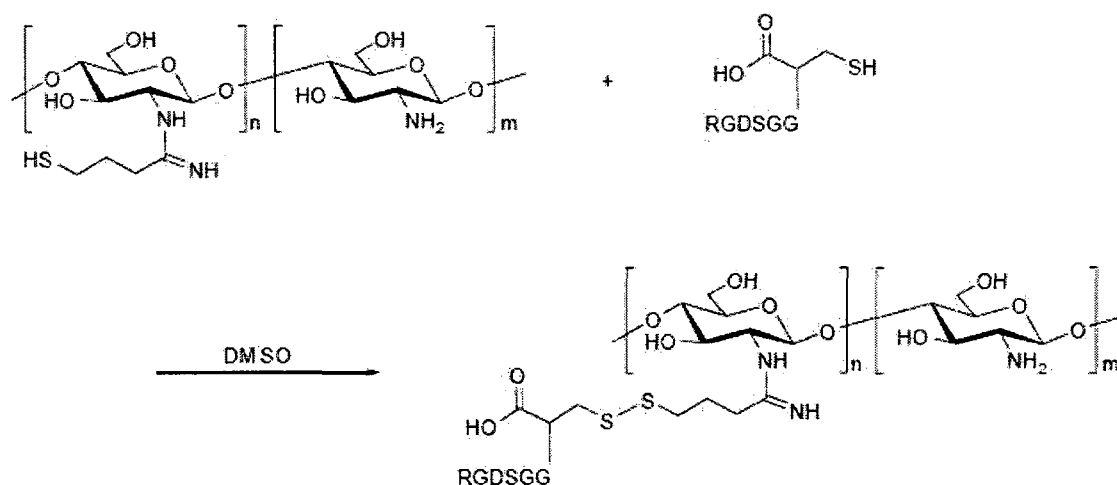


**Figure 9. Synthèse d'un bioconjugué RGD/chitosane**  
**Le chitosane a d'abord été modifié pour présenter un thiol puis la synthèse d'un pont**  
**disulfure a permis la conjugaison du ligand RGD**  
**(Adapté de Masuko and al. 2005)**

De nombreux autres peptides et protéines sont à l'étude (facteur de croissance, anticorps, peptides de pénétration cellulaire, peptides endosomolytiques, etc...) pour agir à tous les niveaux de la livraison de gène avec le chitosane.

## **2. Chapitre 2. Problématique, Hypothèses et Objectifs**

### **2.1. Problématique**

Le chitosane sous sa forme native est un vecteur de transfection très intéressant pour la livraison de principes actifs et de gènes, mais sa fonctionnalisation amène des avantages déterminants quant à l'efficacité du procédé. La modification du chitosane est donc appelée à jouer un rôle déterminant dans la formulation de nanoparticules ADN/chitosane pour la livraison de gène (T.-H. Kim et al., 2007). Le greffage de molécules bioactives comme les peptides ou les protéines tient une place centrale dans la fonctionnalisation du chitosane. En effet, ces molécules engendrent une stimulation de la cellule selon les voies biologiques, ce qui débouche sur une efficacité plus grande du procédé.

Cependant, les protéines sont des molécules très fragiles et leur greffage s'avère souvent délicat. Le maintien de la structure native et du repliement de la molécule est primordial au maintien de la bioactivité de la protéine (Voige, 1997). Il est donc impossible de travailler à des conditions trop éloignées des conditions physiologiques (37°C et pH de 7.4). D'autre part, le chitosane, malgré sa relative robustesse, pourrait également subir des dommages dans des conditions trop extrêmes (Knill et al., 2005). Pour ces raisons, la conjugaison directe et orientée de protéines sur le chitosane semble problématique, la marge de manœuvre étant très limitée au niveau des réactifs utilisables et des conditions de réaction.

Toutefois, le développement d'un système de liaison non-covalente des protéines au chitosane paraît être une alternative intéressante. Une courte extension protéique appelée étiquette ou « tag » servira alors d'agent de liaison entre le chitosane et la protéine sans perturber la fragile structure de celle-ci. La protéine à immobiliser comportera une étiquette apposée par ingénierie moléculaire. Celle-ci interagira soit avec un partenaire greffé de façon orientée sur le chitosane soit directement avec celui-ci.

L'universalité est l'avantage le plus déterminant apporté par l'utilisation d'un système d'étiquettes; toute protéine peut être conjuguée au chitosane à partir du moment où elle porte l'étiquette adéquate. Le problème du greffage et de la chimie à adopter ne

se pose plus grâce à cette alternative, l'interaction et donc le greffage se feront par simple incubation.

Les systèmes d'étiquette testés ont été de deux types. D'une part, le premier type est un domaine connu en biochimie et impliquant une interaction spécifique entre deux partenaires, le domaine *coiled-coil*. D'autre part, le second système testé se base sur la nature cationique du chitosane. Le système se forme par une interaction non spécifique entre le biopolymère et une étiquette électrostatique portée par la protéine et comportant 5 à 10 acides glutamiques. La figure 10 résume les deux techniques étudiées. Enfin, afin de valider ultérieurement sur des nanoparticules ADN/chitosane les résultats obtenus avec du chitosane libre, une méthode de purification des complexes ADN/chitosane a été mise au point.

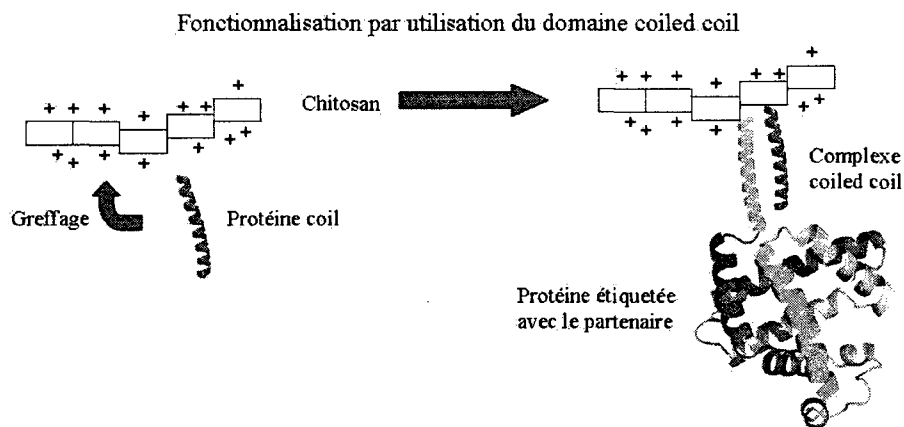


Figure 10. Stratégies adoptées pour la modification du chitosane

## 2.2. Hypothèses de travail

Les hypothèses de travail posées dans le cadre de l'étude des systèmes d'étiquette pour le greffage protéique sur le chitosane sont les suivantes :

- L'étiquette amène une possibilité de greffage universel et ne dépend pas des caractéristiques spécifiques du chitosane ou de la protéine impliquée
- L'interaction entre les étiquettes apposées sur les partenaires ou avec le chitosane directement est stable et permet la présentation du ligand étiqueté à la surface du chitosane.

Quant à l'étude et au développement d'une méthode d'extraction des nanoparticules ADN/chitosane, les hypothèses suivantes ont été posées :

- L'ultracentrifugation suivie d'une étape de dialyse permet l'isolement et l'extraction des nanoparticules avec une proportion de chitosane libre négligeable.
- Le procédé ne détériore pas les nanoparticules.

## 2.3. Objectifs

Le premier objectif principal de ce projet était de mener à bien une étude complète sur deux systèmes d'étiquettes afin d'en étudier les caractéristiques et l'intérêt présenté par chacun d'entre eux pour une fonctionnalisation ultérieure du chitosane. En vue de l'application finale, les complexes ADN/chitosane devront être purifiés de tout élément pouvant adsorber la protéine. Le second objectif central a donc été de développer une méthode d'extraction et de purification de ces nanoparticules pour modification ultérieure par les systèmes étudiés précédemment.

Dans le cadre de l'étude du domaine coiled-coil, la protéine Ecoil-EGF que nous détenons en notre possession a été caractérisée et possède bien la bioactivité de la protéine non étiquetée (Boucher et al., 2008). Les étapes successives pour son étude ont été définies comme suit :

- Greffer le partenaire Kcoil sur le chitosane de façon stable et sans dégradation du chitosane ou du peptide coil.

- Caractériser cette modification
- Vérifier que la bioactivité du peptide coil (lien avec son partenaire de façon spécifique) n'est pas affectée par l'adjonction au chitosane

Pour ce qui est du système électrostatique, les objectifs étaient quelque peu différents, du fait que l'interaction ne se déroule pas entre deux partenaires comme dans le cas du domaine coiled-coil, mais directement entre l'étiquette et le chitosane. Les étapes sous-jacentes ont donc été les suivantes :

- Caractériser le lien entre les différentes étiquettes électrostatiques et le chitosane en vérifiant sa stabilité.
- Étudier la disposition des ligands présentés à la surface du chitosane.

Enfin, le développement de la méthode d'ultracentrifugation pour isolement des nanoparticules pose des objectifs également différents :

- Optimiser les paramètres d'ultracentrifugation et de dialyse afin de séparer de façon marquée les nanoparticules du chitosane libre.
- Vérifier que l'intégrité des particules n'est pas affectée par le procédé.

### 3. Chapitre 3. Tyrosinase-Catalyzed Synthesis of a Universal Coil-Chitosan Bioconjugate for Protein Immobilization

*Antoine Demolliens<sup>1</sup>, Cyril Boucher<sup>1,2</sup>, Yves Durocher<sup>2</sup>, Mario Jolicoeur<sup>1</sup>, Michael Buschmann<sup>1</sup>, Gregory De Crescenzo<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Institute of Biomedical Engineering, Ecole Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, Station Centre-ville, Montréal (Québec) Canada H3C 3A7

<sup>2</sup>Animal Cell Technology Group, Bioprocess Sector, Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada, 6100 Royalmount avenue, Montréal (Quebec) Canada H4P 2R2

*\* Corresponding author. Tel: +1 514 340 4711 x7428; fax: 1 514 340 2990.  
E-mail address : [gregory.decrescenzo@polymtl.ca](mailto:gregory.decrescenzo@polymtl.ca)*

#### 3.1. Abstract

Chitosan has been reported as a promising material for gene and drug delivery as well as for tissue engineering and regenerative medicine. We here report the conjugation of a de novo designed coil peptide (Kcoil) to chitosan (Mn = 200 kDa) to achieve a universal Kcoil-chitosan scaffold for subsequent immobilization of proteins tagged with the Kcoil partner, i.e. the Ecoil peptide. Kcoil-chitosan conjugate was synthesized using a tyrosinase-catalyzed protocol. Extensive UV/vis and IR characterization demonstrated that Kcoil peptide was covalently grafted to amines of chitosan. The ability of Kcoil-chitosan conjugate to recruit Ecoil tagged epidermal growth factor (EGF) was assessed by Surface Plasmon Resonance measurements. Despite non specific interactions between chitosan and EGF, the specific formation of an E/K coiled coil complex was observed at slightly acidic pH and high salt concentration conditions, demonstrating that

grafting to chitosan did not negatively impact binding characteristics of Kcoil peptide. Finally, the benefits of such bioconjugates for biomedical applications are discussed.

### **3.2. Keywords**

Chitosan, Tyrosinase, Coiled-coil, Capture/delivery systems, Epidermal Growth Factor, Surface Plasmon Resonance.

### **3.3. Introduction**

Within the last decades, natural polysaccharides have emerged as attractive biomaterials for the development of scaffolds in the domain of tissue regeneration as well as for the production of nanoparticles to replace classical viral gene delivery vehicles (Dang et al., 2006). Among them, chitosan has been demonstrated to be especially promising (I.-Y. Kim et al., 2008). More specifically, its availability as a medical grade polymer combined with its gelation properties when mixed with glycerol phosphate makes it an interesting cell carrier (Hoemann, Chenite et al., 2007; Hoemann et al., 2005). A novel hybrid biomaterial, produced by combining chitosan with freshly drawn autologous blood, has also demonstrated beneficial wound healing properties for cartilage repair (Chevrier et al., 2007; Hoemann, Chenite et al., 2007; Hoemann et al., 2005). The use of chitosan as a drug carrier/delivery system (Denkbas E et al., 2000; Dodane et al., 1999; J. E. Lee et al., 2004; Mattioli-Belmonte et al., 1999) as well as a non-viral vector for gene delivery has also led to the development of innovative therapeutic treatments (Lavertu et al., 2006).

Chitosan is a linear polysaccharide of  $\beta$  (1–4) linked glucosamine and N-acetyl glucosamine units obtained through N-deacetylation of chitin, which is extracted from insect and crustacean shells (R. A. Muzzarelli et al., 1986). The presence of primary amino groups on most of chitosan monomeric units confers crucial chemical properties such as nucleophilicity and solubility at low pH (pH < 6.5) (M. N. Kumar et al., 2004; VandeVord et al., 2002). Several studies suggest that intrinsic properties of chitosan that are currently exploited may be further enhanced by tailored chitosan functionalization,

thereby augmenting its potential applications to gene delivery and regenerative medicine. For example, the conjugation of macromolecules interacting with cell surface receptors to chitosan-based nanoparticles may enable the specific targeting of cell populations to which a gene has to be delivered. Also, specific growth factors immobilized onto chitosan three-dimensional scaffolds in a stable manner may control and modulate cell survival, growth and differentiation. The potential advantages of immobilized growth factor *versus* soluble growth factor supply were recently highlighted by Fan et al. The latter demonstrated that covalent tethering of epidermal growth factor (EGF) on poly(methyl methacrylate)-based polymers and exposition to mesenchymal stem cells provided a survival advantage when compared to soluble EGF (Fan et al., 2007) or to adsorbed EGF (Kuhl et al., 1996).

Although unambiguous effects of tethered EGF have been reported by Fan et al, there is still a crucial need for a universal and flexible protocol that would allow any growth factor or any other desired protein to be easily and specifically captured on scaffolds. With this in view, we have developed a novel approach based on the use of *de novo* designed peptides, namely the Ecoil and Kcoil that heterodimerize in a highly specific and stable fashion to adopt a coiled-coil structure (De Crescenzo et al., 2003; Litowski et al., 2002) (Figure 11).

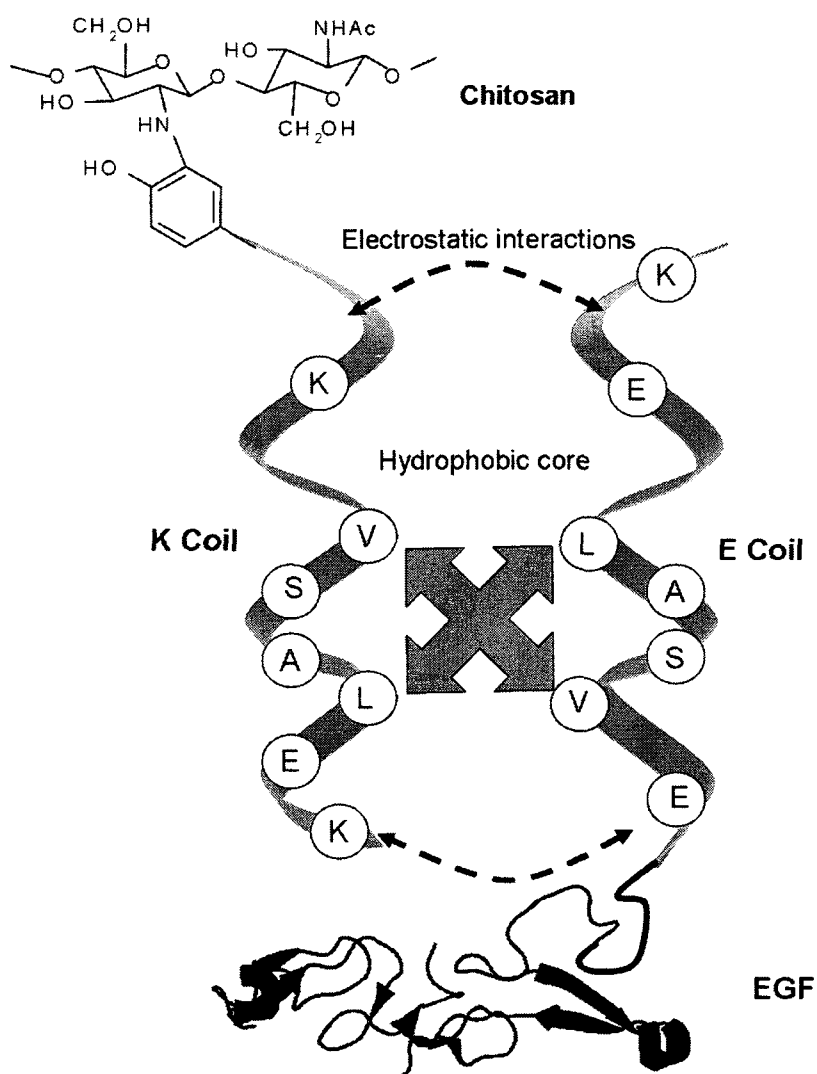


**Figure 11. Schematic representation of the heterodimeric E/K coiled-coil domain and its application as a universal capture/delivery system. Each heptad, K-V-S-A-L-K-E for the Kcoil and E-V-S-A-L-E-K for the Ecoil, is repeated five times in each peptide. The stability of the coiled-coil complex is primarily due to the formation of a hydrophobic core involving leucine and valine residues of each coil, while electrostatic interactions provide additional stability as well as high specificity. This universal system enables the immobilization of coil tagged proteins (e.g. EGF as shown) on chitosan conjugated with its partner coil.**

This Ecoil/Kcoil capture/delivery system has also been recently reported to be useful for adenoviral vector retargeting (Zeng et al., 2008). Also, previous studies have demonstrated that the Ecoil/Kcoil system can be used as a versatile domain for capturing proteins onto surfaces without any loss of bioactivity (De Crescenzo et al., 2003; Tripet et al., 2002, 2003). In the present approach, ligand tethering is achieved by incubating coil-tagged ligands with surfaces or scaffolds on which the other coil partner has been covalently attached (Figure 11).

The purpose of the present study was to examine the applicability of our coil-based approach for modification of chitosan scaffolds and nanoparticles. To achieve this, we explored the use of an enzymatic protocol (Anghileri et al., 2007; G. Kumar et al., 1999) in which tyrosinase-catalyzed oxidation of a tyrosine-containing Kcoil peptide is followed by its condensation onto chitosan in a non-enzymatic step (Figure 12).

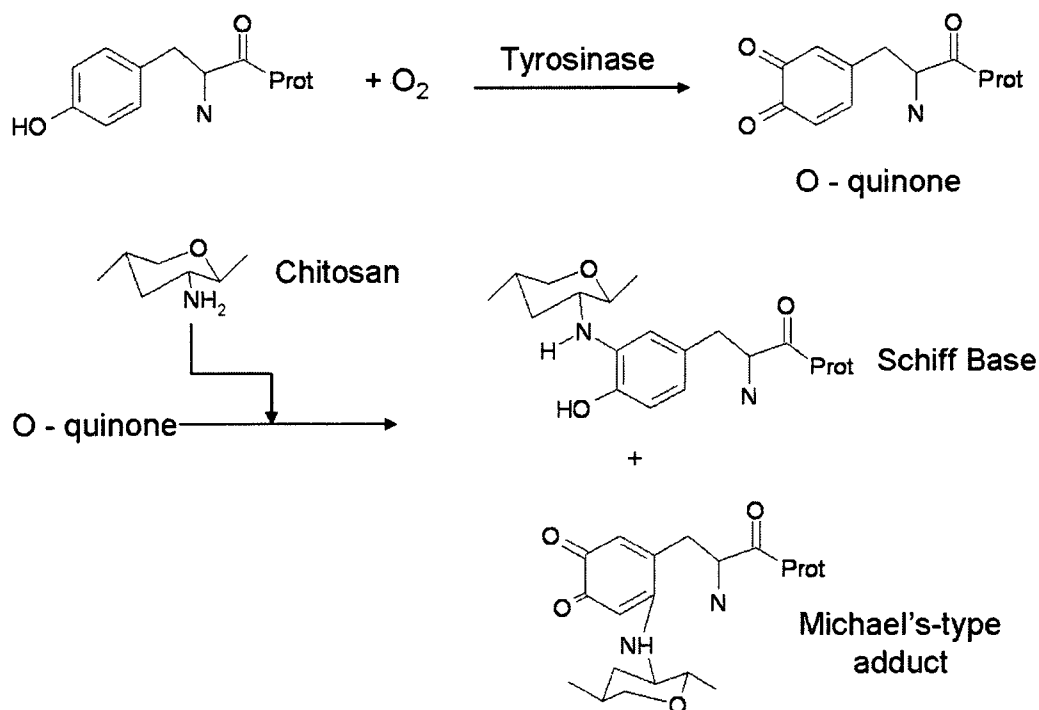


**Figure 12.** Chemical and tyrosinase-catalyzed reactions for the conjugation of a tyrosine-containing peptide to chitosan. Tyrosinase catalyzes the formation of an O-quinone derivative that undergoes a non-enzymatic reaction with chitosan to form two types of products, i.e., a Schiff base and a Michael's type adduct.

Peptide functionalized chitosan was then characterized by UV-vis and FT-IR spectroscopies. Additional surface plasmon resonance (SPR) assays confirmed that Kcoil-functionalized chitosan was able to recruit the Ecoil-tagged epidermal growth factor (E-EGF) *via* coiled-coil interactions, hence validating our procedure that produces chitosan functionalized with a universal coil peptide capture/delivery system.

### 3.4. Materials and Methods

High molecular weight chitosan (number average molecular mass  $M_n = 200,000$  Da with degree of deacetylation that is % of monomers that are deacetylated called DDA = 80%) was supplied by Biosyntech (Laval, QC, Canada). 1% (w/v) chitosan solution was obtained by dissolving 500 mg of chitosan powder in 50 mL of water acidified with 20 mM HCl. After continuous overnight stirring, the pH of the solution was 4.5. Mushroom tyrosinase (EC 1.14.18.1, specific activity of 5370 U/mg according to the manufacturer) was purchased from Sigma Chemical Co (St Louis, MO). The enzyme was dissolved in PBS (150 mM NaCl, 50 mM potassium phosphate, pH 6.5) up to 308 U/ml, aliquoted and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  according to the manufacturer recommendations. Kcoil peptide (primary sequence: YGG(KVSALKE)<sub>5</sub>GGC, > 80% purity) was synthesized by BioSynthesis (Lewisville, TX). 21.2 mg of Kcoil peptide were dissolved in 4 ml of distilled water, aliquoted and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  before use. The K-EGF and E-EGF coding for Kcoil or Ecoil tag, (His)<sub>8</sub> tag and EGF cDNA were produced using HEK-293 cells and purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) as previously described in Boucher et al. (submitted for publication).

#### 3.4.1. Synthesis of Kcoil-Chitosan Bioconjugate

Chitosan was diluted in distilled water to a final concentration of 0.1% (w/v) and 1M NaOH was slowly added to reach a pH of 6.0, which is the highest pH that maintains solubility for this chitosan (Filion et al., 2007; Lavertu et al., 2008). A high pH is desirable since tyrosinase only reacts with deprotonated amine groups and tyrosinase has a maximal effectiveness at pH between 6 and 7. Tyrosinase was diluted in PBS (pH 6.5) to achieve a specific activity of 120 U/ml. Equal volume of tyrosinase and chitosan solutions were then mixed and the pH was adjusted to 6.0. Kcoil peptide was then added to the mixture (4 mg of Kcoil peptide per 10 mg of chitosan, corresponding to 20 millimoles of peptide per mole of chitosan glucosamine units). After overnight stirring at room temperature, the pH of the mixture was slowly increased to 11-12 by dropwise addition of NaOH, 1M. Precipitated chitosan was separated by centrifugation (2 times 250 g for 10 min at room temperature). The pellet was extensively washed by rinsing with water and NaOH precipitation (at least twice). The washed pellet was then dissolved in water and the pH of the solution was adjusted to 5.5 for maximal product solubility. The product was aliquoted and stored at 4°C before analysis.

#### 3.4.2. UV Measurements

UV measurements (230-600 nm scans, 2 nm resolution) for pure chitosan, controls and conjugated chitosan were carried out on a UNICO S 2100 UV spectrophotometer (UNICO, Dayton, NJ).

### 3.4.3. IR Measurements

Functionalized chitosan and control samples were first lyophilized (Benchtop 3L freeze Dryer, VirTis, Warminster, PA) for 24 hours and used directly thereafter. Pure chitosan powder was desiccated for 24 hours and used directly thereafter as control. FT-IR measurements were performed in duplicate using an FTIR 6000 StingRay instrument (Bio Rad, Hercules, CA) equipped with a photoacoustic cell (PAS) maintained in a helium atmosphere. Spectra were recorded from 500 to 4000  $\text{cm}^{-1}$  with resolution set to 2  $\text{cm}^{-1}$  and measurement frequency of 5 kHz. Approximately 8 mg of each sample were introduced into the PAS.

### 3.4.4. Surface Plasmon Resonance (SPR)-Based Assays

Coiled-coil mediated interactions between Kcoil conjugated chitosan and Ecoil tagged EGF were monitored using an SPR-based optical biosensor (Biacore 3000, GE Healthcare, Piscataway, NJ). HBS-EP (10 mM Hepes, pH 6.0, 150 mM NaCl, 3.0 mM EDTA, 0.05% P20 surfactant) was chosen as running buffer and for diluting all injected species. For all experiments, the flow rate was set at 10  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Kcoil conjugated chitosan was adsorbed to the surface of a C1 sensorchip flowcell by manual injection of 10 mg/L Kcoil chitosan dissolved in running buffer (approximately 12  $\mu\text{L}$ ). Guanidium-HCl (5M) was then injected (20  $\mu\text{L}$  at 100  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  flow rate) to remove unbound material. After baseline stabilization, the resulting mass accumulation was of  $\sim 82$  Resonance Units (1000 RUs corresponds to 1 ng of proteins bound to the surface). The control surface was then generated by manual injection of pure chitosan (0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in running buffer) for subsequent monitoring of non-specific protein adsorption on the chitosan-only surface without any coil. The amount of bound chitosan was adjusted to the level of the test surface. After the guanidium-HCl washing procedure (see above), chitosan mass accumulation was of  $\sim 79$  RUs. Control-corrected sensorgrams thus correspond to the subtraction of the chitosan-only sensorgrams from those obtained with Kcoil conjugated chitosan surface.

Various samples (Buffer, Kcoil tagged EGF for negative control and Ecoil tagged EGF both at a concentration of 5  $\mu\text{g/ml}$ ) were injected for 120 s at a flow rate of 50  $\mu\text{l.min}^{-1}$  over both surfaces. This was followed by buffer injection for 180 s in order to monitor complex dissociation. In between sample injections, regeneration of the surface was achieved by 5M guanidium-HCl injection (20  $\mu\text{l}$  at a flow rate of 100  $\mu\text{l.min}^{-1}$ ) in addition to 1M NaCl injection (pulse of 6 s at the same flow rate). Sensorgrams were then control-corrected as described in the previous section using *Biaevaluation 3.1* software package enclosed with the Biacore 3000 instrument.

### 3.5. Results and Discussion

#### 3.5.1. Tyrosinase-Mediated Grafting of Kcoil Peptide onto Chitosan

Three different products were prepared and tested in order to provide chemical evidence for conjugation of Kcoil peptide to chitosan. The first product was generated as described in section 3.4 and corresponded to the test sample while the two others were used as controls. Specifically, the first control (referred to as Control #1 below) was prepared with tyrosinase but without Kcoil peptide added to the mixture and the second control (referred to as Control #2 below) was prepared with Kcoil peptide but without tyrosinase added to the mixture. After incubation, washing and extraction procedures were performed for each sample as described in section 3.4. Chitosan was also used as a negative control baseline in spectroscopic assays.

#### 3.5.2. UV-Vis Spectroscopic Characterization

Figure 13(a) shows UV/vis spectra (230 to 470 nm) for Control #1, pure and grafted chitosan. The spectrum of Control #2 was superimposable to that of chitosan (data not shown). Of interest, the absorbance between 230 and 350 nm was found to be considerably greater for the bioconjugate than for the other samples (Figure 13(a)). The conjugated chitosan showed characteristic features of proteins, i.e., a peak near 280 nm due to the presence of a tyrosine residue in the peptide chain, as well as chitosan features for wavelengths higher than 350 nm, i.e. in the region where the peptide moiety

does not absorb and where all spectra superpose. When the blank chitosan spectrum was subtracted from that of modified chitosan, its high similarity with the spectrum of the pure peptide (Figure 13(b)) affirms that the increase in absorbance near 280 nm observed for bioconjugate was from the covalent attachment of the Kcoil peptide on chitosan. A slight shift of the peak could be observed, from 270 to 274 nm. This bathochrome effect was attributed to the disturbance of electronic distribution near the aromatic ring where glucosamine is grafted.

These UV/vis spectroscopic assays also permit an estimation of the degree of peptide grafting to chitosan. By assuming that the extinction coefficient of the conjugated peptide remained the same as that of original Kcoil peptide only (i.e.  $1490 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  due to the presence of one tyrosine), one can estimate the conjugation degree as follows. The absorbance at 280nm of 0.028 A provides a peptide concentration of  $0.028/1490=18.8 \text{ } \mu\text{M}$  while the concentration of monomers (glucosamines and N-acetylated glucosamines) of chitosan in solution is  $0.5 \text{ g/L} \div 169.4 \text{ g/mole} = 2.95 \text{ mM}$  (where 169.4 g/mole is the average molecular mass of a monomer of 80% DDA chitosan (Filion et al., 2007)) resulting in 1 peptide conjugated per 157 monomers. A 200kDa 80% DDA chitosan contains  $(200,000 \div 169.4 \text{ g/mole}) \cdot 0.8 = 947$  glucosamine monomers, thus resulting in an average of 7 peptides per chitosan chain. This level of conjugation corresponds to a modification of less than one percent of total glucosamine units and a near complete grafting of the peptide added in the original reaction solution.

Taken together, UV-vis spectroscopic results indicated that, even when working with low amounts of Kcoil peptide (4% w/w), conjugation was successfully achieved, and required the presence of both tyrosinase and peptide.

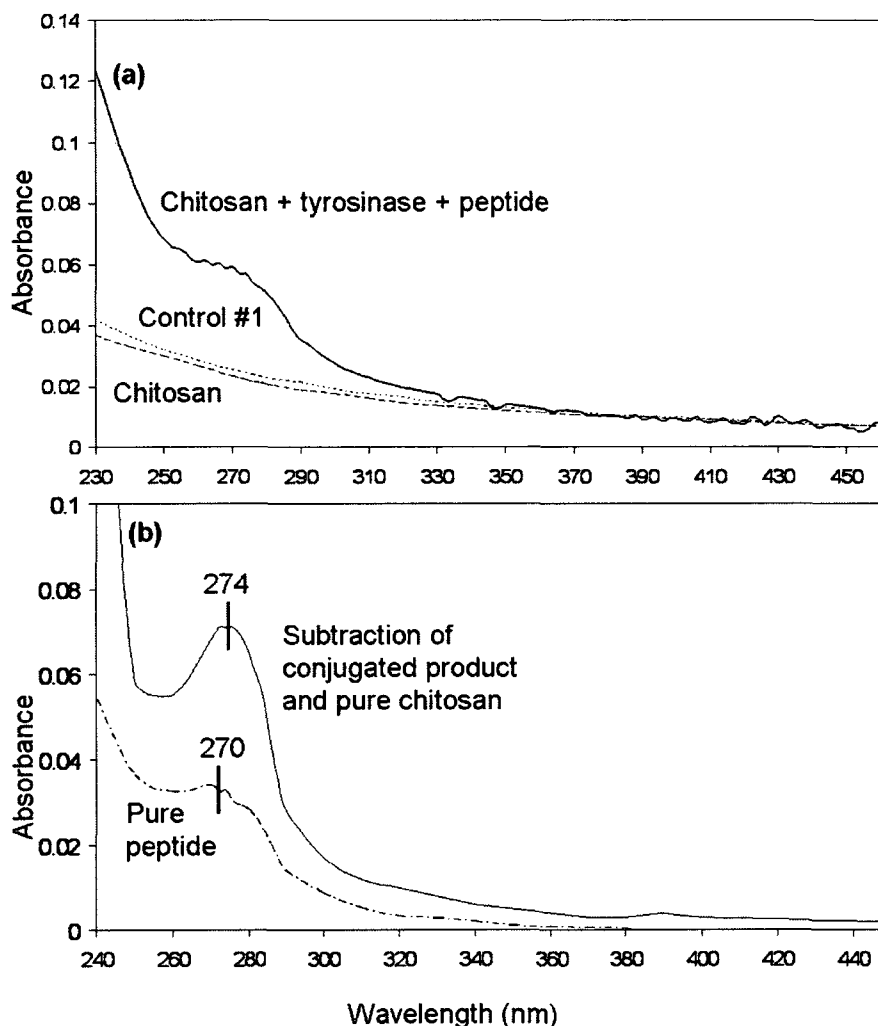


**Figure 13. UV/vis spectrophotometric measurements demonstrate that both peptide and tyrosinase are necessary for bioconjugation on chitosan. (a) Each chitosan sample was incubated overnight in buffered solution with either tyrosinase (Control #1), peptide (Control #2, not shown), or both and then washed following the procedure described in section 2.1. (b) The spectrum of the peptide-conjugated chitosan after subtraction of the chitosan only spectrum is compared to that of the pure peptide.**

### 3.5.3. FT-IR Characterization of the Compounds

The IR spectra of blank chitosan (1), Control #1 (2), Control #2 (3) and conjugated chitosan (4) are shown in Figure 14(a), 14(b) and 14(c) (corresponding to 700-1100  $\text{cm}^{-1}$ , 1500-2000  $\text{cm}^{-1}$  and 3100-3650  $\text{cm}^{-1}$  range, respectively). All observed

spectra displayed peaks characteristic of chitosan including the imine stretch  $\nu\text{C}=\text{N}$  ( $1663\text{ cm}^{-1}$ , Figure 14(b)) and the amide II band ( $1559\text{ cm}^{-1}$ , Figure 14(b)), both arising from N-acetyl groups of chitosan (Sampaio et al., 2005). The intense band at  $1076\text{ cm}^{-1}$  (Figure 14(a)) is likely the result of several overlapping vibrations ( $\nu\text{CO}$ ,  $\nu\text{CN}$ ,  $\nu\text{CC}$ ) and has been previously reported as a spectral feature of chitosan (Anghileri et al., 2007; Gupta et al., 1997). Of interest, its intensity was observed to increase for Kcoil conjugated chitosan (Figure 14(a)), which are likely due to peptidic bonds of the Kcoil peptide conjugated to chitosan.

In the case of the bioconjugate, new peaks and shifts were observed over the whole range of scanned wavenumbers. More specifically, peaks of medium intensity falling at  $832\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C}=\text{C}$  bending),  $1600\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C}=\text{C}$  stretching in aromatic rings) and  $1920\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C}-\text{H}$  out-of-plane deformation) only appeared on the spectrum of conjugated chitosan (Figure 14(a) and 14(b)) and are characteristic of the phenyl-group of tyrosine (Arp et al., 2001; Freddi et al., 2006; Socrates, 1995). No additional intense IR bands were observed, which can be attributed to the lack of strong IR features assigned to the aromatic ring of tyrosine (Anghileri et al., 2007; Sampaio et al., 2005). Also, as can be seen in the  $3100\text{-}3650\text{ cm}^{-1}$  range (Figure 14(c)) which displays the  $\nu\text{NH}$  bands, the primary amine band of the unmodified chitosan sample at  $3421\text{ cm}^{-1}$  remained unchanged in both controls, whereas the bioconjugate displayed a shoulder at  $3375\text{ cm}^{-1}$ . This additional shoulder is consistent with the modification of some primary amine groups of chitosan into secondary amino groups, as a consequence of the chemical conjugation of a peptide onto a glucosamine unit as previously observed (G. Kumar et al., 1999).

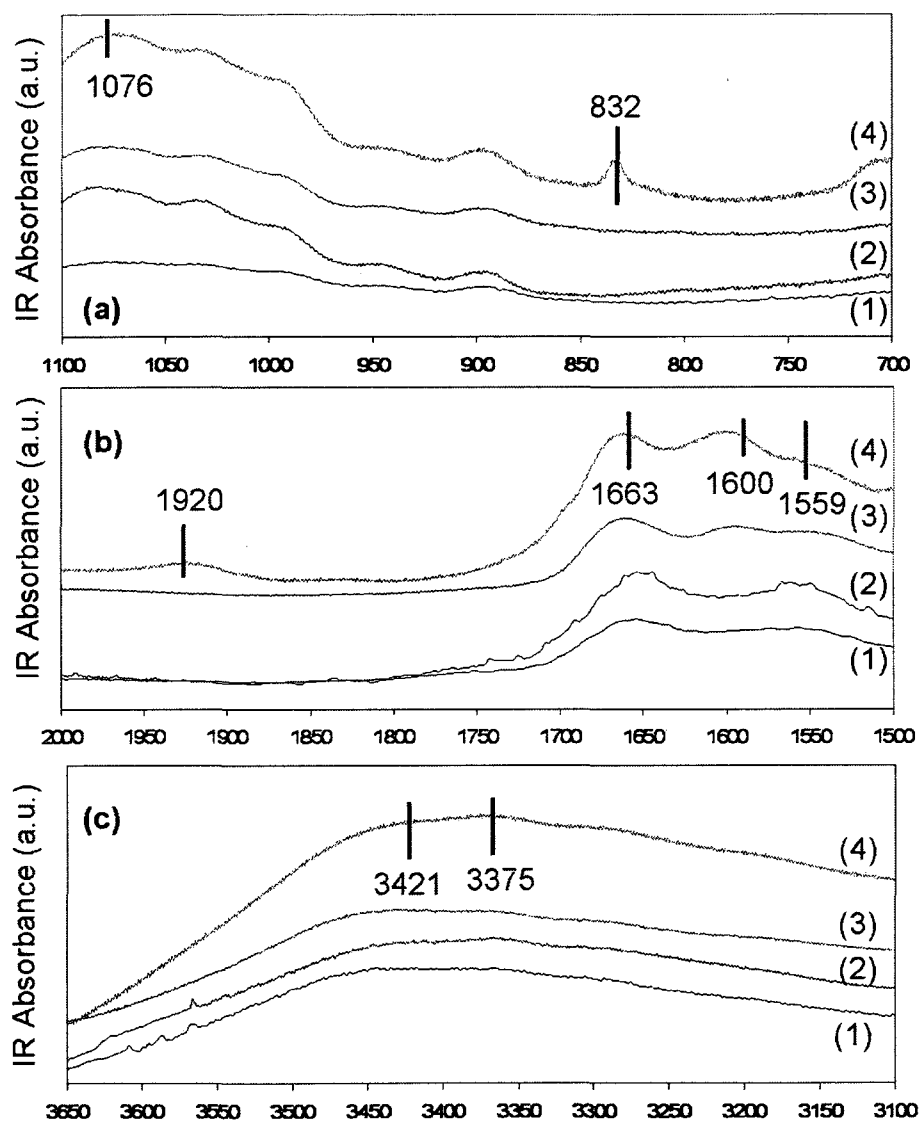


**Figure 14.** FT-IR characterization of the Kcoil-chitosan bioconjugate. FT-IR spectra of (1) pure chitosan, (2) Control #1 (no peptide), (3) Control #2 (no tyrosinase) and (4) Kcoil conjugated to chitosan. The products were prepared as described in section 2.1 of Materials and Methods. The resolution was set to 2 cm<sup>-1</sup> and the measurement frequency was 5 kHz. The ranges of wavelengths shown are (a) 700-1100 cm<sup>-1</sup> (b) 1500-2000 cm<sup>-1</sup> and (c) 3100-3650 cm<sup>-1</sup>.

Altogether, UV/vis and FT-IR measurements unambiguously demonstrated that tyrosinase was able to oxidize the tyrosyl residue of the Kcoil peptide, since subsequent covalent grafting to chitosan was achieved. Indeed, tyrosinase-modified Kcoil was shown to undergo a non enzymatic grafting onto chitosan, whereas in the absence of

tyrosinase, no grafting was observed (Figure 13 and 14). These results are in agreement with previously reported work by Lenhart and colleagues (Lenhart et al., 1998). Although quinones are able to react with several nucleophiles, the low  $pK_a$  of chitosan amino groups favoured grafting as compared to lysyl or sulfhydryl groups of Kcoil whose  $pK_{as}$  are higher (10 for lysine, 8 for cysteine) (Anghileri et al., 2007; Chen et al., 2002). The addition of a tyrosine at the N-terminus of the Kcoil peptide thus provided means for controllable and oriented grafting of the Kcoil peptide.

#### 3.5.4. Surface Plasmon Resonance characterization of Ecoil Tagged EGF Binding to Kcoil-Conjugated Chitosan

The ability of Kcoil-chitosan to recruit and bind to Ecoil tagged EGF *via* specific E/K coiled-coil interaction was tested using an SPR-based optical biosensor. Briefly, pure chitosan was immobilized on the control flowcell and grafted chitosan on the test flowcell. Buffer, Kcoil tagged EGF (negative control) and Ecoil tagged EGF were then injected over both surfaces. Preliminary experiments performed in running buffer (HBS-EP) at pH 7.4 led to high non specific binding of Kcoil tagged EGF to Kcoil chitosan surface (data not shown). This observation led us to hypothesize that this binding was attributable to non specific chitosan-protein interactions, i.e. between chitosan itself and EGF since neither Kcoil/Kcoil nor Kcoil/chitosan interactions are likely to occur due to electrostatic repulsion between cationic chitosan and the cationic Kcoil (De Crescenzo et al., 2003). The pI of Ecoil tagged EGF was computed on Clone Manager (Sci-ED Software, Cary, NC) and found to be around 5.2, which indicates that the protein bears a negative charge for  $pH > 5.2$ . These non specific interactions are thus more likely to be due to EGF interacting with the positively charged  $NH_3^+$  groups of chitosan. (Aguilar et al., 2004). The use of HBS EP at a lower pH of 6.0 as running buffer allowed chitosan and Kcoil chitosan to remain soluble during deposition on the surface, resulting in very stable surfaces that were not modified by 5M guanidinium-HCl injections. At this pH, chitosan and Kcoil chitosan were observed to have a high affinity for the dextran surface of the biosensor ((Serizawa et al., 2000) and results not shown). However, non specific

interactions between injected EGF and deposited chitosan were still observed in this configuration ((Aguilar et al., 2004) and data not shown). In order to limit these non-specific chitosan-protein interactions, NaCl pulse injections were added during the regeneration step, just after the 5M guanidinium-HCl injection. Note that this salt injection is only required to demonstrate specific coiled-coil interactions by SPR and does not need to be applied in general to achieve coupling.

Raw data and control-corrected results corresponding to buffer, Kcoil tagged EGF (negative control) and Ecoil tagged EGF injections over Kcoil conjugated chitosan and pure chitosan surfaces, following the above-described optimized protocol are shown in Figures 15(a) and 15(b), respectively.

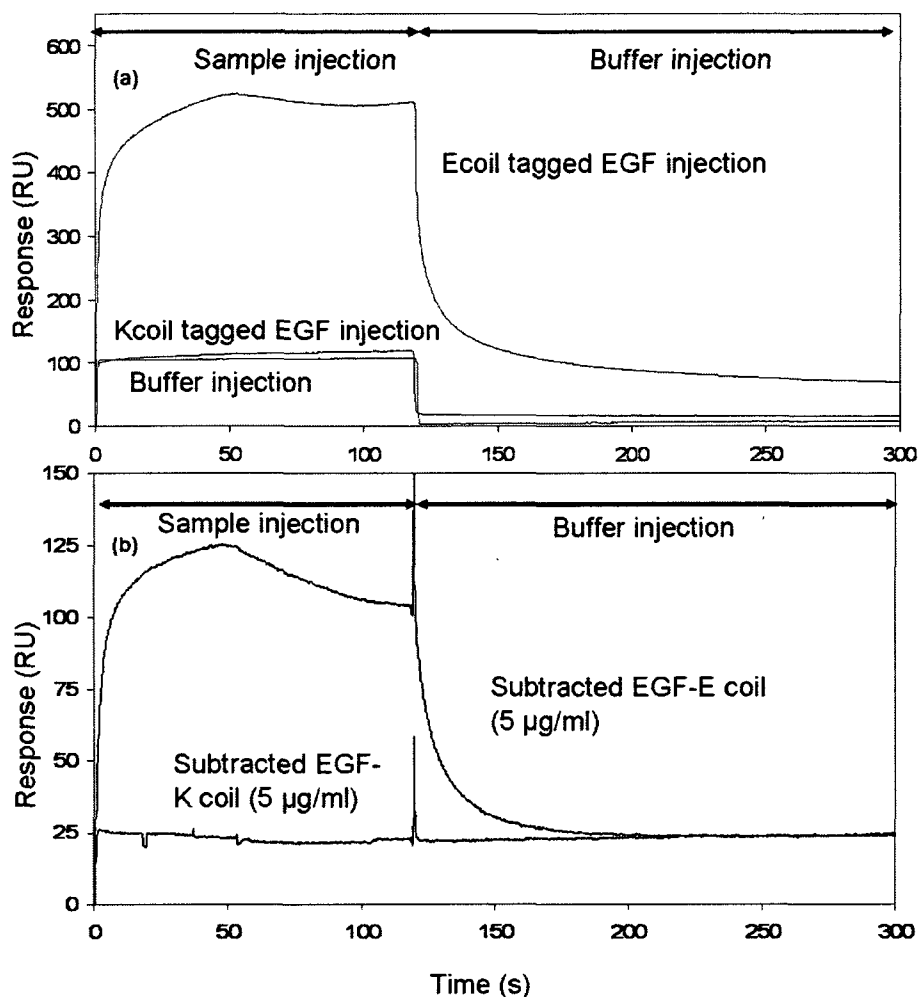


**Figure 15. SPR investigation of coil tagged EGF / Kcoil chitosan interactions**  
**(a) Raw and (b) control-corrected SPR sensorgrams corresponding to the injections of buffer, Kcoil tagged EGF (5 µg/ml) and Ecoil tagged EGF (5 µg/ml) over Kcoil chitosan bioconjugate coated surface. HBS-EP (pH 6.0) was chosen as running buffer. 1M NaCl and 5M guanidium-HCl injections were used to regenerate the surface.**

In contrast to previous experiments performed at pH 7.4 or in the absence of NaCl pulses, Kcoil tagged EGF showed little interaction with the Kcoil chitosan surface since the raw signal monitored on test cell for Kcoil tagged EGF injection was very similar to that of buffer only injection (only 15 RUs of accumulated material were observed, Figure 15(a)). In contrast, Ecoil tagged EGF injection over Kcoil chitosan surface led to approximately 75 RUs of accumulated material at the end of the injection

(Figure 15(a)). Taken together, these results indicated that Ecoil tagged EGF capture on Kcoil-chitosan was mediated by the Ecoil moiety of Ecoil tagged EGF. However, this result did not distinguish whether the mode of interaction was between Ecoil tagged EGF and Kcoil chitosan *via* a E/K coiled-coil interaction *versus* Ecoil interacting directly with chitosan chains adsorbed to the test surface. To further address this issue, the sensorgrams corresponding to Kcoil tagged and Ecoil tagged EGF injections over the pure chitosan surface were subtracted from the sensorgrams obtained by injections over the surface coated with Kcoil conjugated chitosan (Figure 15(b)). The control-corrected sensorgram corresponding to the injection of Kcoil tagged EGF was characterized by rapid transition (less than 2 s) to equilibrium (25 RUs) during injection and by the absence of dissociation of bound material during subsequent buffer injection. In contrast, injection of Ecoil tagged EGF resulted in a kinetic profile characterized by a 5-fold higher mass accumulation during injection and dissociation of Ecoil tagged EGF/Kcoil chitosan complexes during subsequent buffer injection. Of interest, the same level of permanent accumulation of EGF after buffer injection was observed as in the case of Kcoil tagged EGF (25 RUs). These observations are thus consistent with a specific E/K coiled-coil mediated interaction between Ecoil tagged EGF and Kcoil conjugated chitosan, in addition to a smaller non-specific interaction between EGF and chitosan that is present for both E and Kcoil tagged proteins.

One limitation of the current approach and in particular of the conditions used for SPR tests is the limited stability of the coiled-coil complex composed of Ecoil tagged EGF and Kcoil chitosan that was observed to dissociate within 100 s (Fig 12(b)). Such instability was due to stringent experimental conditions, i.e. acidic pH in combination with injection of high concentration of salt which we used to highlight the coiled-coil specific interactions. Indeed, maintaining chitosan solubility and simultaneously screening non specific interactions negatively impacted coiled-coil stability since hydrophobic cores within coiled-coil complexes are less stable at pH 6.0 than at physiological pH and since the presence of salt will mask electrostatic interactions that allow further stabilization of the complex. Thus the hydrophobic core

was formed, which created the increase of SPR signal, but the domain could not be maintained because of the lack of stabilizing electrostatic interactions consistent with previous work (De Crescenzo et al., 2003; Tripet et al., 2002). One remaining challenge in future work is to limit non-specific binding of proteins to chitosan and thus achieve stable and, most of all, monitorable coiled-coil interactions at physiological pH. Indeed, the E/K coiled-coil system used in this study has already been demonstrated to be extremely stable ( $k_d < 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) in a physiological context (De Crescenzo et al., 2003; Litowski et al., 2002; Tripet et al., 2002, 2003), affirming the promising nature of coil-chitosan conjugates as biocompatible substrates for oriented immobilization of proteins. This may be achieved by appropriate mixing and buffer exchange systems where conditions appropriate for specificity of coiled-coil formation are followed by those required for stability of the established coiled-coil complex.

### 3.6. Conclusion

Chitosan has been reported as a promising material for gene and drug delivery as well as in tissue engineering and regenerative medicine. This report demonstrates that enzymatic covalent grafting of a *de novo* designed coil peptide to chitosan can be achieved exploiting the high chemoselectivity of tyrosinase. A particular advantage of the current approach is the absence of tedious and time-consuming purification steps making this enzymatic process very promising to obtain easily a pure and safe product for biomedical applications. This study also demonstrates the ability of coil-chitosan conjugate to specifically capture proteins tagged with the partner coil peptide, for example the growth factor EGF. The well known beneficial properties of chitosan (biocompatibility, degradability, bioadhesion, antimicrobial activity) can thus be complemented with a procedure allowing flexible and oriented protein conjugation to chitosan *via* coiled-coil interactions, providing multiple additional functionalities in applications such as gene delivery and regenerative medicine.

### **3.7. Acknowledgments**

This work was supported by the Canada Research Chairs on Protein-enhanced Biomaterials (G.D.C.) and on Cartilage Tissue Engineering (M.D.B.) as well as by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (M.D.B., G.D.C., C.B.).

## **4. Chapitre 4 : Formation contrôlée de complexes polyélectrolytes chitosane/protéines par l'intermédiaire d'une étiquette électrostatique**

### **4.1. Introduction sur l'utilisation des propriétés polyélectrolytes du chitosane**

Comme il a déjà été mentionné, le chitosane est un polycation chargé positivement et cette propriété a été également observée et mesurée dans le cas de nanoparticules ADN/chitosane (Erbacher et al., 1998). Dans leur très grande majorité, les procédés de bioconjugaison sur le chitosane exploitent des méthodes chimiques nucléophiles, ce qui nécessite la déprotonation des glucosamines. Cependant, celle-ci implique une augmentation de pH du milieu, ce qui affecte de manière importante la stabilité des nanoparticules. Un compromis est donc à trouver au niveau du pH optimal conciliant stabilité des complexes (ou solubilité du chitosane) et déprotonation suffisante pour le greffage.

Une idée mise en avant dans ce projet a donc été d'exploiter cette propriété électrostatique particulière du chitosane et des complexes et de développer une technique universelle, simple et dont les conditions opératoires permettent de trouver un équilibre entre solubilité, stabilité et efficacité du greffage.

#### **4.1.1. Les complexes polyélectrolytes avec le chitosane**

Les complexes polyélectrolytes sont des assemblages spontanés de deux polymères, un polycation et un polyanion, par des interactions électrostatiques. Les deux partenaires seront chargés pour une plage de pH bien définie et interagiront donc dans cette plage, ce qui permettra de former des complexes stables. Ces derniers sont de plus en plus étudiés, tout particulièrement pour la livraison de principes actifs. En effet, de telles constructions sont simples et sont capables d'encapsuler des principes actifs. Par

la suite, avec les variations des conditions de pH, ces derniers peuvent être libérés et ce, de façon contrôlée.

Le chitosane, du fait de ses propriétés d'intérêt pour les livraisons de gène et de molécules actives, est particulièrement utilisé comme polycation. Ses partenaires polyanioniques sont nombreux : le dextran (Schatz et al., 2004), l'alginate (Sæther et al., 2008), l'héparine (Luo et al., 2008), le poly(acide acrylique) (de Oliveira et al., 2008; Silva et al., 2008) le poly( acide glutamique) (Dai et al., 2007; Hajdu et al., 2008). Dans chacun des cas, les objectifs visés sont la libération contrôlée de principes actifs en utilisant des propriétés de pH. Par exemple, le complexe chitosane / acide polyacrylique utilisé pour la livraison de molécules aux tissus de la peau se défait pour des pHs supérieurs à 7 mais est très stable jusqu'à des pHs de 6.1 (Silva et al., 2008). En particulier, l'étude du polyélectrolyte chitosane / acide polyglutamique montre que la stabilité est excellente à un pH de 6 (Hajdu et al., 2008) et que la solubilité n'est pas affectée si les polymères sont de longueur suffisamment différentes (un rapport d'unités monomériques de 25 à 50) (Luo et al., 2008).

#### 4.1.2. Les étiquettes constituées d'acides aminés polaires

Autant les études de polyélectrolytes comprenant du chitosane sont nombreuses, autant les études sur les étiquettes constituées d'acides aminés polaires sont très rares. Un nonamère d'arginines (Arg, R) a été développé pour complexer des « small interfering RNA » (siRNA) pour les livrer dans le cerveau (P. Kumar et al., 2007). Un peptide constitué d'une séquence capable de franchir la barrière immunitaire du cerveau et d'une queue nonamérique d'arginines possédant la propriété de complexer l'ARN est utilisé comme vecteur de transfection pour les cellules cérébrales et musculaires (Uemura et al., 2002).

Les queues complexantes ou électrostatiques sont également utilisées pour modifier quelque peu les propriétés de certains peptides. L'ajout d'une queue polaire facilite par exemple la solubilisation de peptides très hydrophobes (Tang et al., 2004).

A partir de ces observations expérimentales, deux peptides dérivés de l'acide polyglutamique ont été synthétisés et étudiés comme système d'étiquetage protéique. Le principe est donc d'utiliser de courtes séquences d'acides glutamiques (Glu, E) et d'étudier leur interaction directement avec le chitosane en vue d'utilisation ultérieure comme procédé de conjugaison sur le chitosane et les nanoparticules pour les applications de livraison de gène. D'après la littérature, l'interaction semble la plus stable à un pH de 6.0, il n'est donc pas nécessaire de s'approcher davantage du pH du chitosane et on s'affranchit ainsi des problèmes de solubilité de celui-ci (Silva et al., 2008).

La longueur des étiquettes testées a été choisie de telle façon à perturber le moins possible les propriétés du chitosane, soit 5 acides glutamiques (queue 5E) ou 10 acides glutamiques (queue 10E). La partie fonctionnelle est suivie d'un bras espaceur de 3 glycines (Gly, G) et enfin d'un fluorophore (5-FAM) rajouté à des fins de caractérisation (Figure 16).

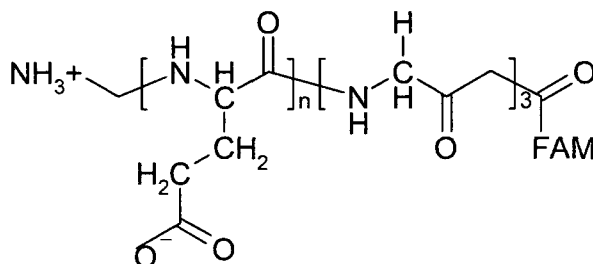


Figure 16. Étiquettes 5E (n=5) et 10E (n=10) à pH 6.0

## 4.2. Techniques expérimentales

### 4.2.1. Matériel

#### 4.2.1.1. Les tampons

L'acide 4-Morpholineethanesulfonique (MES) hydraté de formule brute  $C_6H_{13}NO_4S \cdot xH_2O$ , le MES sous forme de sel de formule brute  $C_6H_{12}NNaO_4S$  et le PBS 7.4 ont été achetés chez Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). Le HBS-EP 1X (10 mM HEPES, pH 6.0, 150 mM NaCl, 3.0 mM EDTA, 0.05% P20 surfactant) a été acheté chez GE HealthCare (Piscataway, NJ).

Le tampon de MES a été préparé par l'ajout contrôlé dans 250 ml d'eau déionisée des deux formes de MES pour une concentration finale de 18 mM, une force ionique de 25 mM et un pH de 5.99.

#### 4.2.1.2. Le chitosane

Dans toutes les manipulations, le chitosane utilisé (référence PCCH00075 et CHEM 2461) a été fourni par Biosyntech (Laval, QC). Il se caractérise par un poids moléculaire de 200 kDa et un DDA de 80% (1250 monomères par chaîne) et a été dissous dans de l'eau acidifiée avec 22 mM de HCl pour atteindre un ratio de protonation des glucosamines de 1:1 et une concentration de 4.7 mg/ml.

#### 4.2.1.3. Les peptides

Plusieurs peptides de pureté > 80% ont été synthétisés par BioSynthesis (Lewisville, TX). Leurs propriétés sont les suivantes :

**Tableau 1. Récapitulatif des séquences, masses molaires et dénominations des peptides utilisés dans l'étude**

|                                   | Séquence               | Masse moléculaire (en Da) | Dénomination          |
|-----------------------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Peptide court<br>etiquette        | (5-FAM)-GGG-EEEE       | 1308.1                    | 5E                    |
| Peptide long<br>etiquette         | (5-FAM)-GGG-EEEEEEEEEE | 1953.7                    | 10E                   |
| Peptide témoin<br>etiquette       | (5-FAM)-GGG            | 655.3                     | Témoin                |
| Peptide court non<br>etiquette    | EEEE                   | 663.5                     | 5E sans<br>étiquette  |
| Peptide long non<br>etiquette     | (EEEE)(EEEE)           | 1309.3                    | 10E sans<br>étiquette |
| Peptide très long<br>non étiqueté | (EEEE)(EEEE)(EEEE)     | 1954.7                    | 15E sans<br>étiquette |

Les lettres G et E désignent les acides aminés « glycine » et « acide glutamique » selon la classification habituelle. Le 5-FAM est un dérivé de la fluoréscéine dont la structure est donnée ci-dessous (Figure 17) :

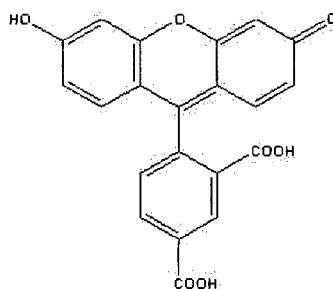


**Figure 17. Structure du fluorophore 5-FAM**

Le  $pK_a$  de l'acide glutamique dans une protéine est de 4.1 environ. Il peut varier en fonction de son environnement électronique mais restera toujours autour de cette valeur. La distance  $C_\alpha - C_\alpha$  entre deux acides glutamiques est de 0.490 nm. (Horton et al., 2002)

20 milligrammes des peptides 5E et 10E ont été dissous chacun dans 5 ml de PBS pH 7.4 pour atteindre une concentration de 4 mg/ml. 10 milligrammes du peptide témoin ont été mis en solution également dans 5 ml de PBS pH 7.4 pour un titre de 2 mg/ml. Quant au peptide 10E sans étiquette, ce sont 5 milligrammes qui ont été dissous dans 5 ml de PBS pour une concentration de 1 mg/ml. Ils ont ensuite été aliquotés et placés à  $-20^\circ\text{C}$  avant utilisation.

#### 4.2.2. Méthodes

##### 4.2.2.1. Expérience de Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

Les interactions entre le chitosane et les peptides étiquetés ont été visualisées à l'aide d'un biocapteur optique dont le principe de détection est basé sur la résonance plasmonique de surface (Biacore 3000, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Le HBS-EP 1X a été utilisé comme tampon circulant. Le débit a été fixé à  $10 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}$  pour tous les essais.

Le chitosane a été immobilisé sur une surface de type CM4 (surface présentant des chaîne de dextran carboxyméthylé) par une injection de  $10 \mu\text{l}$  de chitosane à une concentration de  $4.5 \mu\text{g/ml}$  dans du tampon acétate à pH 4.5. Après injection de tampon pendant 5 minutes et stabilisation de la ligne de base, la masse accumulée était en moyenne de 2400 RUs (Resonance Units). La surface de référence n'a pas été modifiée.

Le peptide 5E a été injecté aux concentrations de  $1.3 \mu\text{g/ml}$  et de  $4 \mu\text{g/ml}$  dans du HBS-EP, pH 6.0. Quant au témoin, les concentrations choisies étaient de  $0.7 \mu\text{g/ml}$  et  $2 \mu\text{g/ml}$  pour que les concentrations en chaîne soient les mêmes que pour le 5E. Chaque injection a duré 240 secondes à un débit de  $10 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}$  suivie d'une injection de tampon pendant 360 secondes à un débit de  $50 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}$  pour visualiser la dissociation éventuelle du complexe formé. Les courbes obtenues sur la surface de

référence ont ensuite été soustraites à celles obtenues sur la surface test à l'aide du logiciel *Biaevaluation 3.1* fourni avec l'instrument.

#### 4.2.2.2. Expérience de microcalorimétrie (ITC)

Tous les tests d'ITC ont été menés sur l'appareil VP-ITC (Northampton, MA) à 298 K. Le chitosane et tous les peptides ont été dilués dans le MES 18 mM, pH 6.0. Le pH après dilution était égal à celui du tampon, soit 6.0. Le MES était également utilisé comme référence dans les expériences.

Deux types d'expérience ont été menés. Tout d'abord, des titrages par injection de peptide dans du chitosane ont été testés, titrage qualifié de direct (Zhu et al., 2007). Puis, les expériences de titrage inverse où le chitosane a été injecté dans une solution de peptide ont été menées (Rispen et al., 2008).

Pour les expériences de titrage direct, le chitosane a été introduit dans la cellule d'injection ( $V = 1.482$  ml) à une concentration de  $20.4 \mu\text{g/ml}$ , soit  $0.1 \mu\text{M}$  de chaînes ou  $100 \mu\text{M}$  de glucosamines. Une première injection de  $2 \mu\text{l}$  était suivie de 27 injections à  $10 \mu\text{l}$  à un débit de  $0.5 \mu\text{l.min}^{-1}$ . Chaque expérience de titrage a été réalisée en duplicat. Les concentrations en peptide dans la seringue sont résumées dans le tableau 2.

Dans chaque expérience de titrage inverse, du chitosane ( $326 \mu\text{g/ml}$ ,  $1.6 \mu\text{M}$  en chaînes de chitosane,  $1.6 \text{ mM}$  en glucosamines) était injecté dans une solution concentrée de peptide à différentes concentrations. Ces concentrations se trouvent dans le tableau suivant.

**Tableau 2. Concentrations en peptide utilisées pour le titrage par ITC.  $C_{chaînes}$  représente la concentration en peptide et  $C_E$  la concentration en acides glutamiques. Elles sont exprimées en mM et le titre massique est exprimé en  $\mu\text{g/ml}$ .**

| Peptide            | Concentrations |       |       |                 |       |       |
|--------------------|----------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
|                    | Titrage direct |       |       | Titrage inverse |       |       |
|                    | $C_{chaînes}$  | $C_E$ | Titre | $C_{chaînes}$   | $C_E$ | Titre |
| 5E                 | 0.09           | 0.45  | 118   | 0.040           | 0.20  | 52.3  |
|                    | 0.12           | 0.6   | 157   | 0.045           | 0.23  | 58.9  |
| 10E                | 0.045          | 0.45  | 88    | 0.03            | 0.3   | 58.5  |
| Témoin             | 0.12           |       | 79    | 0.040           |       | 25.3  |
| 5E sans etiquette  | 0.18           | 0.9   | 119   | 0.040           | 0.20  | 27.0  |
| 10E sans etiquette | 0.045          | 0.45  | 59    | 0.018           | 0.18  | 23.5  |
| 15E sans etiquette | 0.03           | 0.45  | 60    | 0.021           | 0.31  | 41.0  |

Les concentrations ont été calculées de telle façon à obtenir un rapport N/E en moles (moles de glucosamine sur mole d'acides glutamiques) de 1.2 en fin de titrage. Ainsi, la saturation est dépassée.

Par exemple, pour le 5E en titrage direct :

$$N_{\text{glucosamine}} = 100\mu\text{M} \times 1.5\text{ml}$$

$$N_E = 272\mu\text{l} \times C_E \text{ mM}$$

$$\frac{N_E}{N_{\text{glucosamine}}} = 1.2 \Rightarrow C_E = 0.64\text{mM}$$

La concentration du témoin a été choisie pour que la concentration en fluorophore soit la même dans la cellule d'injection que pour le 5E, ce qui correspond à la même concentration en peptide. Les chaleurs de dilution et de mélange ont été déterminées grâce à 28 injections (10  $\mu\text{l}$ ) de chitosane à 1.6  $\mu\text{M}$  dans du MES (1.482

ml). La méthode expérimentale a été programmée et les résultats ont été compilés grâce au logiciel *VPViewer* fourni avec l'appareil. La variation de pH des échantillons n'excédait pas  $\pm 0.02$  à l'issue des mesures calorimétriques.

Un exemple typique des données ITC acquises avec l'appareil est montré en figure 18. Les résultats de la dilution de chitosane sont également montrés en comparaison.

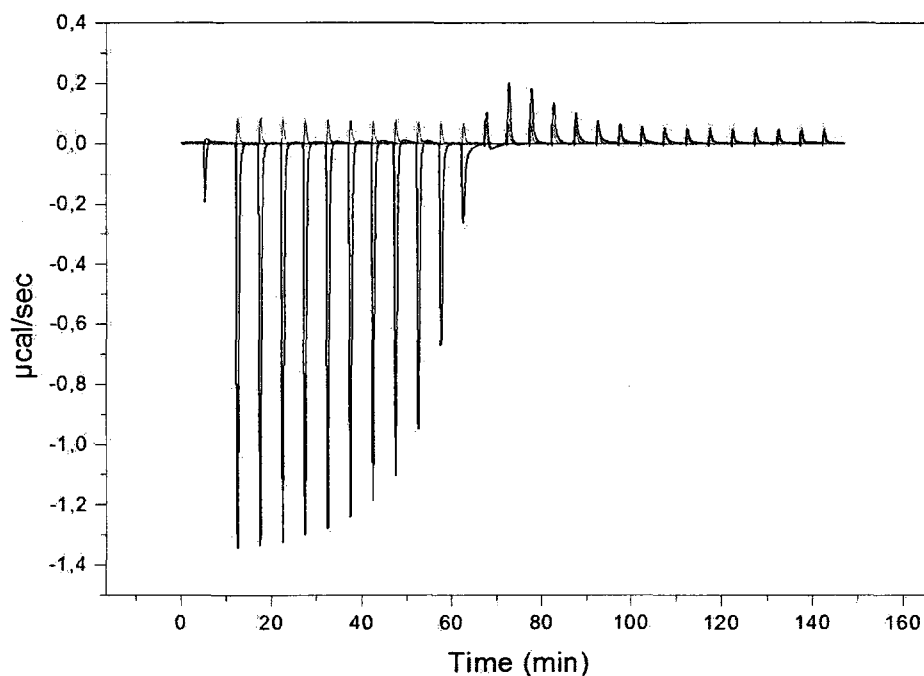


**Figure 18. Données expérimentales obtenues par microcalorimétrie (courbe noire) entre le peptide 5E (0.045 mM) et le chitosane (28 injections, 1.6  $\mu$ M). Le titrage a été réalisé en inverse, c'est-à-dire par ajout de chitosane dans la solution de peptide. La courbe rouge correspond au contrôle, c'est-à-dire à la dilution de chitosane dans le MES.**

Du fait de la présence de grands pics endothermiques à la saturation (voir figure 18 et section 4.3.2 ), le modèle SSIS (Single Set of Identical Sites) fourni avec le logiciel ne permet pas toujours d'identifier les paramètres thermodynamiques de l'interaction. L'effet de dissociation n'étant pas observé pour le peptide 10E, ce modèle a pu être appliqué avec une convergence excellente. Pour tous les peptides, un modèle

prenant en compte la coopération entre ligands a été implémenté à l'aide des publications de Mc Gee et de Velazquez Campoy (McGhee et al., 1974; Velazquez-Campoy, 2006). Ces modèles sont décrits en Annexe 1.

#### 4.2.2.3. Mesures spectrophotométriques

Les spectres UV/Visible (240-740 nm, résolution de 1 nm) des échantillons titrés à l'aide de l'ITC ont été acquis avec le spectrophotomètre DU 640 (Beckman, Fullerton, CA). Les échantillons étaient en solution dans le MES, qui a également été utilisé comme référence. Le volume de la cuve en quartz était de 600  $\mu$ l et les concentrations présentes sont résumées sur le tableau suivant. Ces concentrations sont celles des échantillons à l'issue du titrage inverse en ITC (chitosane dans peptide). Il a donc été testé que, pour ces concentrations de peptide et de chitosane, le peptide est entièrement sous forme de complexes, la saturation ayant été dépassée.

**Tableau 3. Composition des échantillons testés en UV/Visible**

| Dénomination       | Concentration en peptide | Concentration en chitosane |
|--------------------|--------------------------|----------------------------|
| 5E seul            | 0.038 mM                 | 0                          |
| 5E + chitosane     | 0.038 mM                 | 0.25 $\mu$ M               |
| 10E seul           | 0.025 mM                 | 0                          |
| 10E + chitosane    | 0.025 mM                 | 0.25 $\mu$ M               |
| Témoin seul        | 0.019 mM                 | 0                          |
| Témoin + chitosane | 0.019 mM                 | 0.13 $\mu$ M               |

#### 4.2.2.4. Détermination de la saturation du chitosane par autoextinction (« self-quenching »)

Tous les peptides et le chitosane étaient en solution dans le MES à pH 6.0. Toutes les mesures de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de microplaques Spectramax Gemini XS de Molecular Devices (Sunnyvale, CA). L'excitation lumineuse a été réalisée à 495 nm et l'émission lue à 530 nm. Les 3 valeurs lues pour chaque échantillon ont été ensuite moyennées.

#### 4.2.2.4.1. Titrage direct goutte à goutte (peptide dans chitosane)

Pour se rapprocher le plus possible des conditions utilisées en microcalorimétrie, 1,5 ml de chitosane à 20.4  $\mu\text{g/ml}$  a été titré à l'aide d'injections de 20  $\mu\text{l}$  de peptide 5E à 0.12 mM ou de peptide 10E à 0.08 mM. Après chaque injection, 3 aliquots de 100  $\mu\text{l}$  ont été prélevés puis réinjectés pour mesure de fluorescence.

#### 4.2.2.4.2. Titrage indirect goutte à goutte (chitosane dans peptide)

Des solutions de 1,5 ml à 0.040 mM de peptide 5E et à 0.03 mM de peptide 10E ont été titrées à l'aide d'injections de 20  $\mu\text{l}$  de chitosane à 326.4  $\mu\text{g / ml}$ . De nouveau, 3 aliquots de 100  $\mu\text{l}$  ont été prélevés puis réinjectés pour mesure de la fluorescence de l'échantillon. Les pertes de fluorescence ont été calculées par rapport à un échantillon de peptide sans ajout de chitosane.

#### 4.2.2.4.3. Titrage direct en une injection (peptide dans chitosane)

Des dilutions de chitosane ont été réalisées dans le MES à pH 6.0 pour un volume total de 500  $\mu\text{l}$ . Une quantité constante de peptide a été ajoutée à chaque dilution de chitosane pour des concentrations respectives en 5E et 10E de 1.0  $\mu\text{M}$  et de 0.54  $\mu\text{M}$ . La concentration en acides glutamiques était alors de 5.4  $\mu\text{M}$  dans les deux cas de figure et le volume final de 548  $\mu\text{l}$ . Les pertes ont été calculées par rapport à un échantillon de 500  $\mu\text{l}$  de MES auquel a été ajouté un aliquot de peptide. Les mesures de fluorescence ont été réalisées comme dans les manipulations précédentes.

#### 4.2.2.4.4. Titrage indirect en une injection (chitosane dans peptide)

Cette expérience a été réalisée exactement comme la précédente en injectant les 500  $\mu\text{l}$  de chitosane dans le peptide et non l'inverse. Les pertes de fluorescence ont été calculées par rapport à l'aliquot de peptide auquel 500  $\mu\text{l}$  de tampon ont été ajoutés.

### **4.3. Résultats et discussion**

#### **4.3.1. Interaction peptide chitosane sur une matrice et en solution**

Deux cas de figure peuvent se présenter : la fonctionnalisation d'une matrice de chitosane, utile pour des procédés d'ingénierie tissulaire (reconstruction artérielle, stimulation et croissance de cellules sur des surfaces, etc.) et la fonctionnalisation du chitosane en solution. Ce dernier cas est celui qui nous intéresse le plus de par ses applications en livraison de gène. Deux types d'essais ont été réalisés pour caractériser ces interactions.

##### **4.3.1.1. Interaction peptide-matrice : caractérisation par SPR**

Cette expérience de SPR avait pour objectif de tester si une interaction était possible entre le chitosane sous forme de matrice (adsorbé sur une surface CM4 de Dextran) et l'étiquette électrostatique. L'idée était de tester si la fonctionnalisation d'une surface à l'aide d'étiquettes électrostatiques était réalisable, c'est-à-dire si l'interaction était stable.

La figure 19 montre la comparaison des injections de peptides 5E et témoin sur une surface de chitosane en SPR.

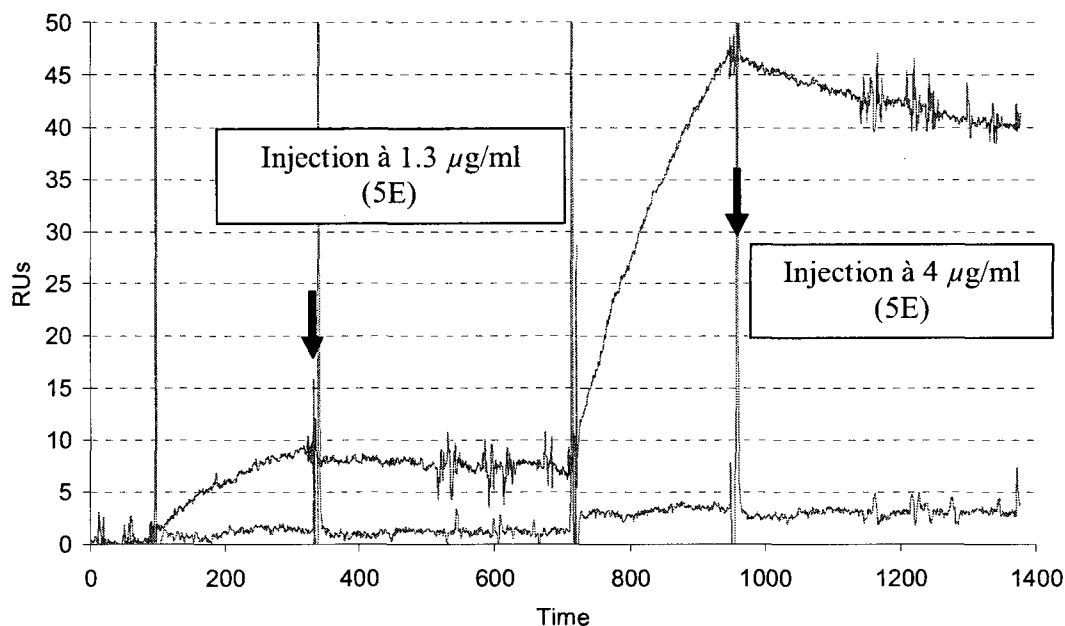


**Figure 19. Comparaison des injections sur une surface de chitosane de concentrations 1.3  $\mu\text{g/ml}$  et 4  $\mu\text{g/ml}$  de peptide 5E (courbe rouge supérieure) et de 0.7  $\mu\text{g/ml}$  et 2  $\mu\text{g/ml}$  pour le peptide témoin (courbe verte inférieure). La surface référence était laissée nue. Les flèches bleues désignent la fin de l'injection (phase d'association) et le début d'injection de tampon (phase de dissociation).**

On observe une nette différence entre les deux peptides, le témoin ne s'accumulant que peu sur la surface de chitosane. Le signal final est d'environ 4 RUs pour le témoin et de 40 pour le peptide 5E. Ceci montre que le peptide est capable d'interagir avec le chitosane. De plus, l'accumulation sur la surface de chitosane est due à la présence de l'étiquette électrostatique et n'est pas le résultat d'une interaction non souhaitée entre le fluorophore et le chitosane.

Par ailleurs, l'association électrostatique est très stable comme on peut le voir dans les périodes de dissociation ; l'injection de tampon suivant l'injection du peptide (dénotée par les flèches bleues) n'amène aucune variation pour la première injection du peptide 5E et une variation de 5 RUs pour la seconde. De plus, l'injection suivante à 8  $\mu\text{g/ml}$  (non montrée) n'a amené aucune accumulation supplémentaire sur la surface, ce

qui suggère fortement que la surface de chitosane est saturée en peptide 5E. L'étiquette électrostatique permet donc bien une immobilisation du peptide sur le chitosane et cette interaction est stable à pH 6.0.

Il est à noter que les expériences pour le 5E et le témoin ont été répétées deux fois, mais qu'il n'a pas été possible d'obtenir de courbes pour le 10E. Une explication d'ordre pratique peut être donnée pour expliquer cette différence de comportement entre les deux types de peptide. Suite aux expériences réalisées pour le peptide témoin et pour le peptide 5E, du chitosan s'est adsorbé sur les tubes et sur la seringue d'injection de la machine SPR. Celui-ci a été retrouvé par hasard lors du démontage de la machine pour l'entretien de la seringue. Ainsi, lors des injections, le peptide 10E s'est trouvé greffé sur ce chitosan avant même d'atteindre la surface. Aucun signal n'a donc été observé.

#### 4.3.2. Interaction peptide-chitosane en solution : mesures par microcalorimétrie (ITC)

Pour des applications de livraison de gène, le chitosane doit rester en solution. La technique de détection par SPR ne permet malheureusement pas l'étude de complexes en solution. Les techniques de mesure par microcalorimétrie (Isothermal Titration Calorimetry) sont alors plus adéquates pour cette application. Brièvement, le chitosane a été injecté dans les peptides étiquetés ou non. Puis, la variation d'énergie due au transfert de protons du tampon MES vers le chitosane lors de l'interaction a été visualisée pour donner des isothermes comme présentés sur les figures 23 et 24.

##### 4.3.2.1. Titrage direct de chitosane par les peptides étiquetés ou non

Dans un premier temps, des expériences de titrage direct de chitosane par les peptides étiquetés ou non ont été réalisées. Brièvement, elles consistaient en 28 injections de peptide dans une solution de chitosane concentrée.

L'acquisition des isothermes s'est déroulée normalement, comme on peut le voir sur la figure 20. Cette dernière présente l'isotherme d'interaction entre le peptide 10E et le chitosane. La forme globale de l'isotherme est conforme avec les profils d'interaction observés en microcalorimétrie.

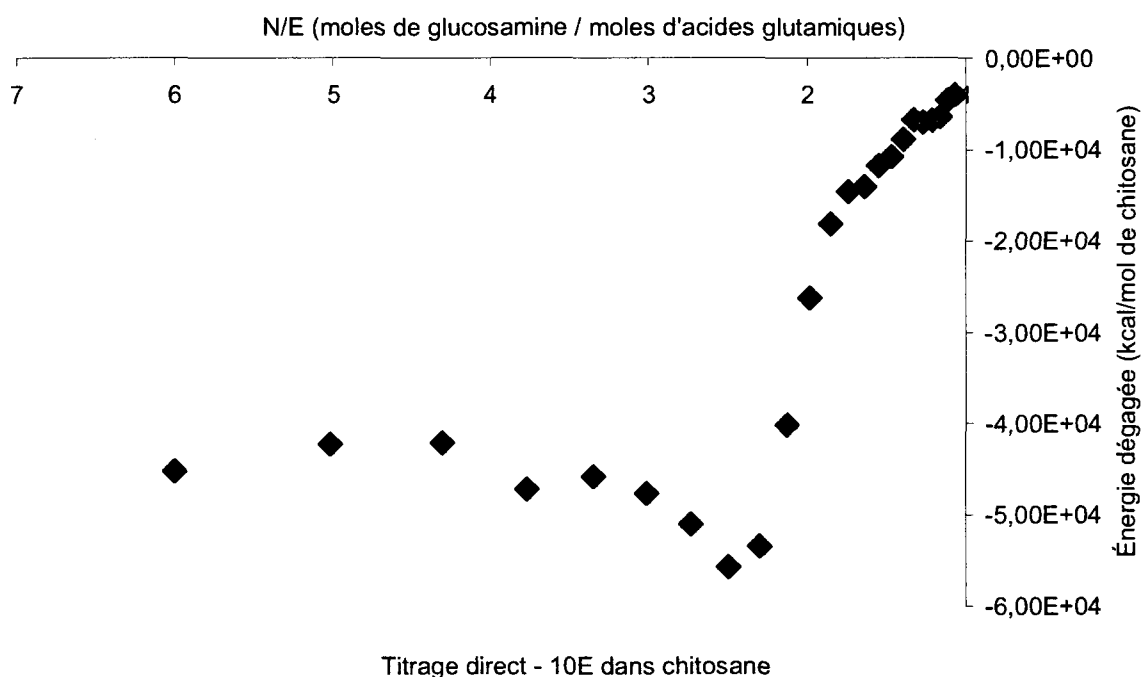


**Figure 20.** Isotherme de l'injection de peptide 10E 35  $\mu\text{g/ml}$  dans une solution de chitosane concentrée 20.4  $\mu\text{g/ml}$ . Le tampon utilisé était du MES pH 6.0.

Malheureusement, il a été impossible de corriger les isothermes par la dilution des peptides marqués ou non. L'essai consistait à injecter les peptides comme cela avait été fait dans le chitosane mais dans du tampon et à observer les dégagements d'énergie. Comme il est possible de le voir sur la figure 21, les pics présentaient des caractéristiques très éloignées de ce qui était obtenu en général. La figure 22 présente ces mêmes pics de dilution pour le chitosane.

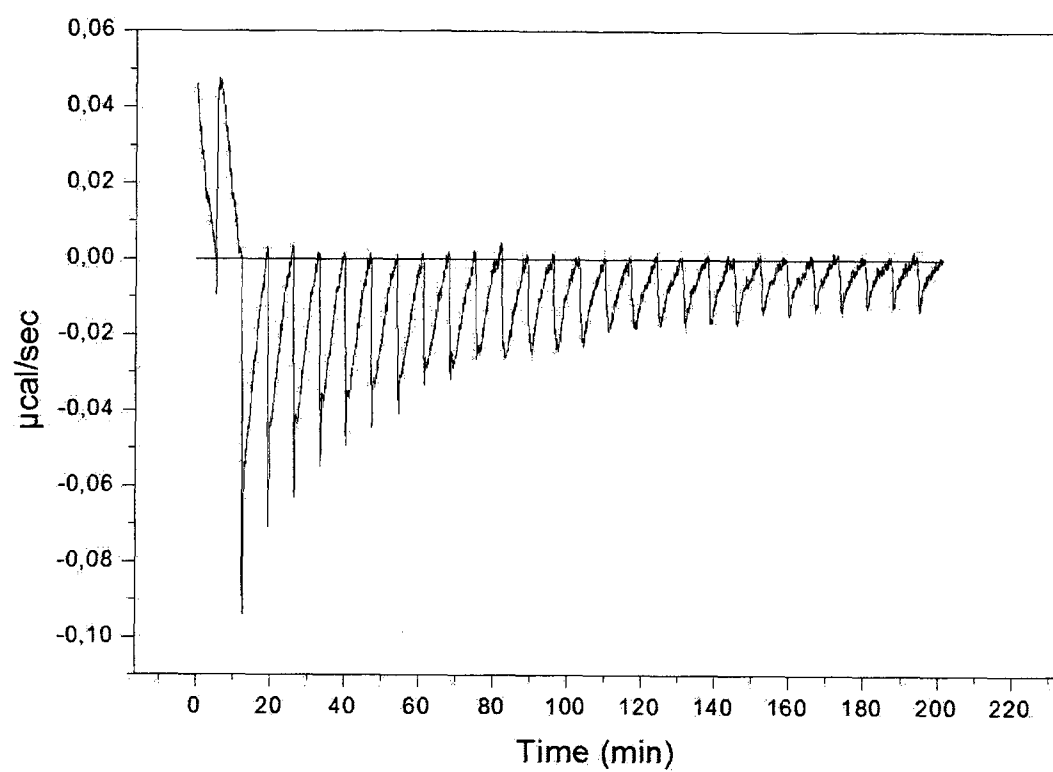


**Figure 21. Pics de dégagement de chaleur obtenus pour la dilution du peptide 10E 35  $\mu\text{g/ml}$  dans du MES pH 6.0**

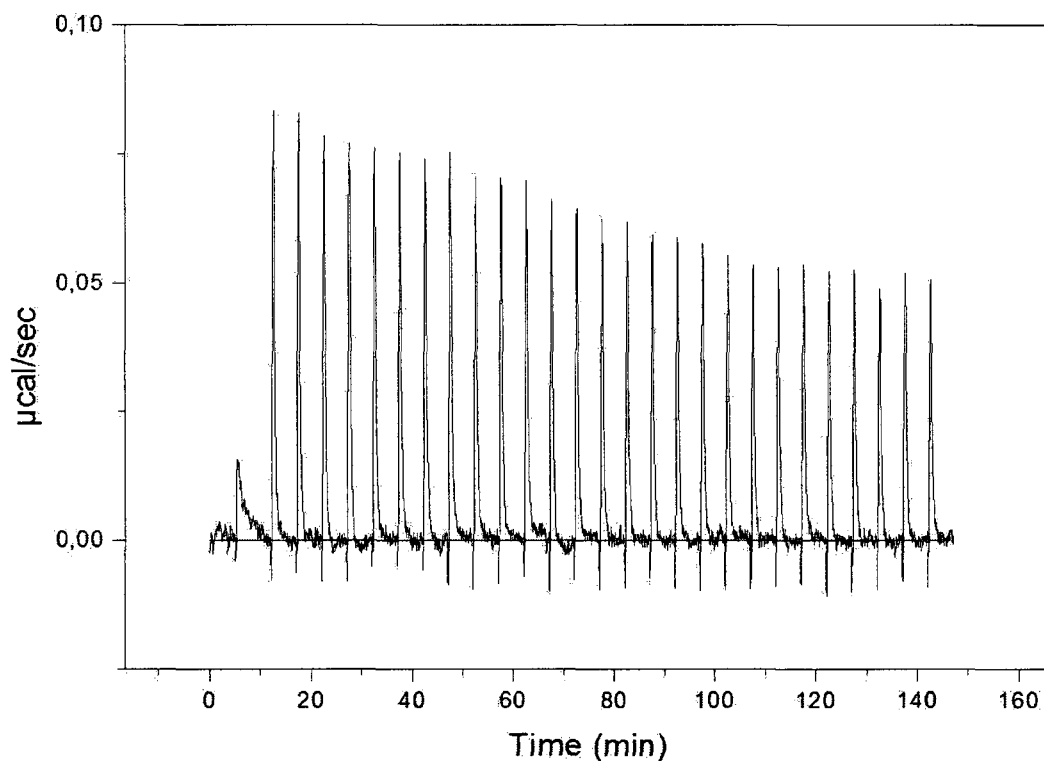


**Figure 22. Pics de dégagement de chaleur pour la dilution du chitosane 326,4  $\mu\text{g/ml}$  dans du tampon MES pH 6.0.**

Le différence majeure qui existe entre les deux essais est située au niveau du retour à l'équilibre des pics. Suite à une injection, il y aura diminution ou augmentation de la quantité de chaleur dégagée suivant si la dilution est exothermique (peptide) ou endothermique (chitosane). Cependant, dans le cas du chitosane, le retour à l'équilibre se fera en quelques secondes alors que dans le cas du peptide, le retour à la ligne de base n'est jamais complété. Les pics s'évasent à leur base et l'intégration de ceux-ci donnent des chaleurs de dilution beaucoup plus grandes que les valeurs données dans la littérature. (Ehtezazi et al., 2000; Scolnik et al., 2006).

Il n'est pas clairement établi quelle est la cause de ce comportement. Il est possible que la présence d'impuretés non purifiées suite à la synthèse (acide trifluoroacétique en particulier) créé une différence de composition suffisante entre la

solution de peptide injectée dans le tampon et la référence (tampon MES également) pour que l'équilibre ne puisse plus s'établir. Cependant, comme les concentrations en impuretés dans le peptide sont inconnues, il n'a pas été possible de mettre au point une solution de référence qui prendrait en compte cet écart de composition.

Toutefois, malgré cette impossibilité à utiliser pleinement les isothermes, en particulier pour tous les calculs de données thermodynamiques, il est possible d'observer qu'une bosse exothermique apparaît avant la montée. Cette caractéristique a été observée auparavant dans les systèmes coopératifs, ce qui tend à montrer que les ligands ne se lient pas de façon isolée (Velazquez-Campoy, 2006). Cet effet sera étudié et confirmé par les titrages inverses.

La solution adoptée a donc été de recourir au processus inverse, soit l'injection de chitosane dans une solution de peptide. Comme il est possible de voir sur la figure 22, la dilution du chitosane dans le tampon ne posait quant à elle aucun problème.

#### 4.3.2.2. Titrage indirect des peptides par une solution de chitosane

Les figures suivantes montrent les isothermes obtenus pour les peptides 5E et 10E marqués avec le témoin pour comparaison. Tous les isothermes présentés ont été corrigés par la dilution du chitosane dans le MES (Figure 22). Les énergies calculées sur l'axe des ordonnées sont normalisées cette fois-ci en fonction du nombre de moles de chitosane. Les ratios molaires de l'axe des abscisses correspondent au rapport du nombre de moles de glucosamines sur le nombre de moles d'acides glutamiques.

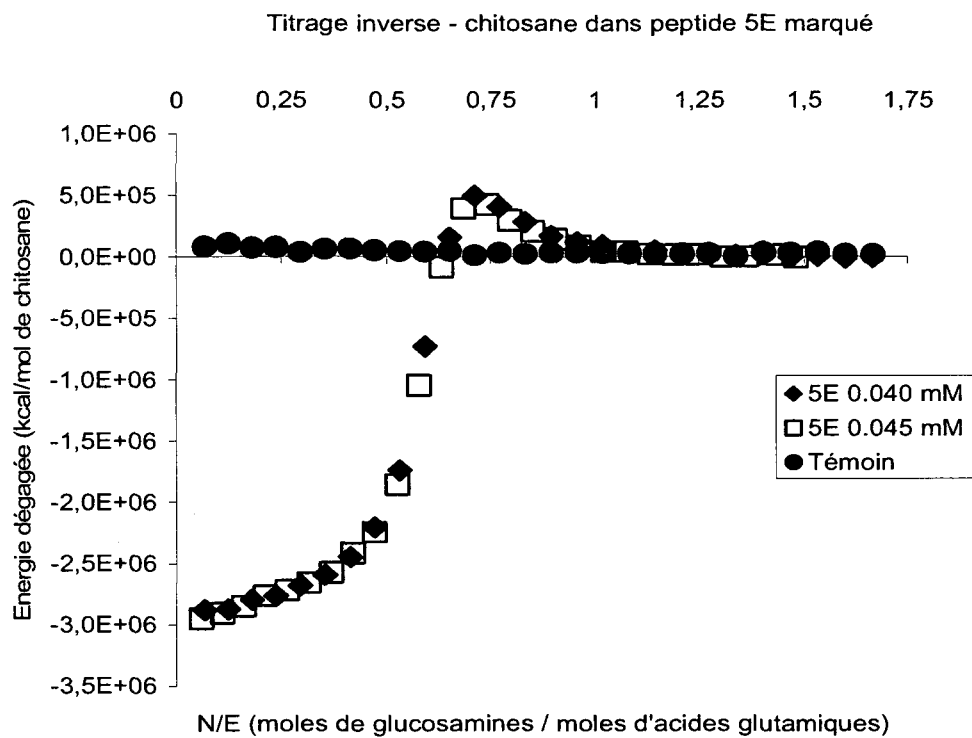


**Figure 23. Isothermes du peptide 5E étiqueté. Les concentrations étaient de 0.040 mM (losanges) et de 0.045 mM (carrés) dans le MES à pH 6.0 qui servait également de référence. Le témoin avait pour concentration 0.040 mM (ronds).**

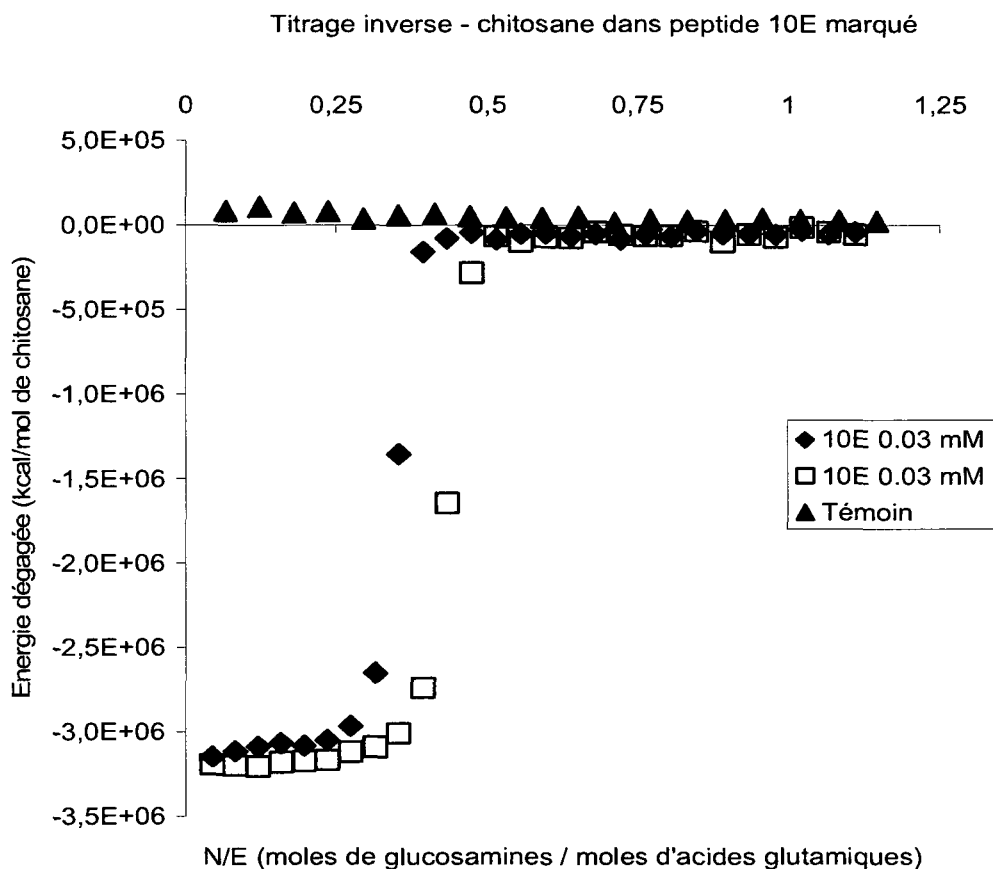


**Figure 24. . Isothermes du peptide 10E étiqueté. Les concentrations étaient de 0.03 mM pour les deux essais (losanges et carrés). Le témoin était lui aussi à 0.03 mM (triangles)**

On peut tout d'abord remarquer que l'interaction entre le peptide témoin et le chitosane est très faible, environ 40 kilocalories par mole. Cette valeur est 75 fois inférieure aux valeurs enregistrées pour les peptides 5E et 10E.

La forme des isothermes observées pour ces derniers est caractéristique des isothermes acquis en ITC. Le premier plateau observé pour des ratios molaires faibles est une étape de sous saturation, tout le chitosane injecté est complexé par le peptide présent dans la cellule d'injection. Le dégagement d'énergie observé correspond donc à l'interaction entre le peptide et l'ensemble des glucosamines injectés. Puis, lors des

injections de chitosane, le peptide n'est plus en quantités suffisante pour complexer l'ensemble du chitosane, le nombre d'interactions diminue et de fait l'énergie dégagée également. La transition dépend de la constante thermodynamique d'association; une pente abrupte traduit une constante élevée, ce qu'on peut observer sur les isothermes du 10E en particulier et ce qui est confirmé par les interpolations (Velazquez-Campoy, 2006) (Tableau 4). Enfin, une fois que tout le peptide est lié au chitosane, il n'y a plus d'interaction avec le chitosane injecté et donc plus de dégagement d'énergie. Tous les isothermes se rejoignent donc à cette étape (Figures 23 et 24).

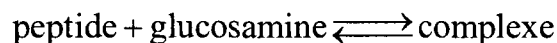
Ces courbes ont ensuite été analysées par les modèles décrits en annexe, le modèle SSIS ainsi que le modèle proposé par Mc Gee et Van Hippel (McGhee et al., 1974). Les corrélations entre le modèle SSIS et les données expérimentales pour le peptide 10E sont excellentes, alors qu'il a été impossible d'analyser adéquatement l'isotherme du peptide 5E du fait de la présence de la bosse positive de coopération. En effet, la coopération n'est pas prise en compte dans ce modèle. Seules les valeurs d'enthalpies d'interaction ont pu être estimées à l'aide du plateau initial.

Il a donc été nécessaire de faire appel à un modèle décrivant l'interaction entre un ligand et une macromolécule de façon plus précise et tentant en compte les interactions entre ligands. C'est le cas du modèle proposé par Mc Gee et Van Hippel en 1974 et qui a été implémenté pour l'analyse des isothermes. Ce dernier est décrit avec précision en annexe 1. De plus, les figures représentant les interpolations sont également disponibles en annexe (annexe 1).

Dans le modèle SSIS,  $N$  représente le ratio N/E en moles de glucosamines par mole d'acides glutamiques pour lequel la saturation des sites est atteinte.

Dans le modèle de Mc Gee Van Hippel, le paramètre  $l$  représente le nombre de sites sur le chitosane occupés par un peptide. En d'autres termes,  $l$  quantifie le nombre d'acides glutamiques du peptide assurant l'interaction entre celui-ci et le chitosane. Enfin,  $\Delta h$  se rapporte à l'enthalpie d'interaction entre peptides liés au chitosane. Il est à noter que l'enthalpie de l'interaction prenant place dans la cellule d'injection lors de l'injection du chitosane est égale à l'addition des deux valeurs d'enthalpie ( $\Delta H + \Delta h$ ).

Le paramètre K représente quant à lui la constante d'interaction de l'équilibre de complexation dans les deux modèles.



$$K = \frac{[\text{complexe}]}{[\text{peptide}][\text{glucosamine}]}$$

Les résultats des interpolations sont présentés dans le tableau 4. Le N présent dans le tableau n'est pas tout à fait celui donné par le modèle SSIS. Le modèle SSIS donne un N représentant le ratio en chaînes de chitosane injectées par chaînes de peptides présentes dans le milieu. Celui exprimé ici a été converti de telle façon à représenter ce même ratio mais en fonction du nombre de moles de peptides présentes par rapport au nombre de moles de glucosamines injectées. Cette conversion permet d'obtenir un N ayant la même unité que celle de l'axe des abscisses sur les isothermes de microcalorimétrie.

**Tableau 4 . Récapitulatif des paramètres thermodynamiques tirées de l'analyse des isothermes des peptides marqués avec le modèle SSIS. Les enthalpies sont exprimées en kcal/mol et les constantes d'interaction en M<sup>-1</sup>.**

|         | Modèle SSIS        |                      |                       | Modèle Mc Gee Van Hippel |         |          |          |
|---------|--------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|---------|----------|----------|
|         | N                  | K                    | ΔH                    | l                        | K       | ΔH       | Δh       |
| 5E (1)  |                    |                      | -2.8 E 6              | 2.6                      | 7.4 E 6 | -2.2 E 6 | -0.8 E 6 |
| 5E (2)  |                    |                      | -2.8 E 6              | 2.6                      | 5.1 E 6 | -2.3 E 6 | -0.9 E 6 |
| Moyenne |                    |                      | -2.8 E 6              | 2.6                      | 6.3 E 6 | -2.2 E 6 | -0.8 E 6 |
| 10E (1) | 0.33<br>± 1.0 E -5 | 5.8 E 9<br>± 1.0 E 9 | -3.1 E 6<br>± 2.1 E 4 | 3.2                      | 1.5 E 8 | -3.2 E 6 |          |
| 10E (2) | 0.41<br>± 1.3 E-5  | 6.0 E 9<br>± 9.9 E 8 | -3.2 E 6<br>± 1.9 E 4 | 3.9                      | 2.4 E 8 | -3.3 E 6 |          |
| Moyenne | 0.37               | 5.9 E 9              | -3.15 E 6             | 3.5                      | 2.0 E 8 | -3.2 E 6 |          |

En comparant les pentes entre elles, il est possible de voir que celles relatives au peptide 5E sont moins abruptes que celles correspondant au peptide 10E, ce qui amène à penser que la constante d'interaction sera également inférieure (Figures 23 et 24). Cette

hypothèse est confirmée par les analyses de courbes qui donnent une constante 100 à 1000 fois plus grande pour le 10E que pour le 5E. Ainsi, la stabilité du greffage est beaucoup plus grande pour le 10E que pour le 5E ce que d'autres caractéristiques des isothermes viennent confirmer.

Les enthalpies d'interaction sont comparables, -3000 kcal/mol pour le 5E ( $\Delta H = -2.2 \text{ E } 6 + \Delta h = -0.8 \text{ E } 6 = -3.0 \text{ E } 6$  kcal/mol d'après le tableau 4) et -3100 kcal/mol pour le 10E, ce qui était un résultat attendu étant donné que l'enthalpie d'interaction est presque entièrement contrôlée par le transfert de protons entre chitosane et tampon MES (Thèse Pei Lian Ma en préparation). En effet, lors des premières injections de chitosane, la macromolécule est entièrement complexée, ce qui se traduit dans les deux cas par le même transfert de protons du tampon vers le chitosane. Les valeurs d'enthalpies par mole de chitosane sont donc proches.

Cependant, la comparaison des isothermes met en évidence plusieurs différences entre le comportement du 5E et celui du 10E. Tout d'abord, les profils à l'atteinte de la saturation sont très différents pour ces deux peptides. L'atteinte est directe pour le 10E alors que les 6 injections suivant la saturation provoquent des absorptions de chaleur (dégagement endothermique) pour le 5E avant de rejoindre le plateau d'énergie nulle.

Cette bosse endothermique observée pour le peptide 5E est caractéristique d'un comportement de coopération entre peptides sur une macromolécule (Velazquez-Campoy, 2006). Les peptides peuvent interagir ensemble selon plusieurs types d'interactions (électrostatiques, hydrophobes, etc.), ce comportement est qualifié de « coopératif » ou « anti coopératif ». Dans ce dernier cas de figure, les peptides se repoussent et induisent une diminution du rendement de greffage.

Dans le cas où la macromolécule est injectée dans le peptide, ce dernier est en excès dans la cellule d'injection et lors de sa complexation sur le chitosane, il sature les sites du polymère et est donc toujours entouré de un ou deux voisins. Au fur et à mesure des injections, la macromolécule devient prédominante et en excès par rapport au peptide dont la forme libre en solution a alors disparu. Ce cas de figure apparaît juste après la saturation, donc au début du plateau final. Cette augmentation de la

concentration en macromolécule induit une dissociation partielle des ligands qui se lieront de façon isolée sur les macromolécules possédant des sites libres. La concentration en ligands liés de façon isolée augmentera et celle en ligands entourés de deux voisins diminuera. En l'absence de coopération, le comportement des ligands liés avec ou sans voisins sera identique, cet effet ne sera donc pas observé (Velazquez-Campoy, 2006). De plus, il est à noter que le comportement des peptides est coopératif du fait de l'apparition de cette bosse. Un comportement anti coopératif n'aurait induit que des changements mineurs sur l'isotherme d'interaction car la proportion de ligands possédant des voisins augmente très lentement contrairement au cas coopératif.

Le fait que la bosse soit endothermique ne veut pas dire que l'interaction entre ligands la soit également, au contraire. Cette caractéristique de l'isotherme est le signe d'une coopération du fait que les ligands se dissocient pour se réassocier avec un plus petit nombre de voisins. Le nombre de dimères diminue donc et l'énergie dégagée ou absorbée est donc l'énergie nécessaire aux ligands pour se dissocier de ses voisins. Ainsi, l'énergie d'association sera quant à elle de signe opposé et de même valeur. Une bosse endothermique est alors le signe de la dissociation d'une interaction exothermique (Velazquez-Campoy, 2006). Les analyses des isothermes confirment que l'interaction entre peptides est exothermique (tableau 4).

Ainsi, pour le peptide 5E, la bosse endothermique observée correspond à cette dissociation. Le transfert de protons serait possiblement inversé, les protons iront du chitosane au MES, ce qui explique le transfert positif d'énergie. Puis les ligands s'associeront de nouveau au chitosane injecté et le système atteindra l'équilibre final. Il est à noter que l'enthalpie de cette interaction est non négligeable, environ -800 kcal/mol pour une enthalpie totale de -3000 kcal/mol. D'autres sources d'absorption de chaleur sont également envisageables, comme des changements de configuration moléculaire ou des interactions hydrophobes entre ligands, entre fluorophores ou entre une des ces deux espèces et le chitosane lui-même.

Par contre, cette bosse est totalement absente sur l'isotherme du 10E alors que les structures peptidiques du 5E et du 10E sont très proches. Deux explications peuvent

être données pour justifier cette différence. Tout d'abord, la coopération est certainement due, comme nous le verrons un peu plus loin, à la présence et à la proximité des fluorophores entre eux. Donc, pour un même nombre de sites, il y aura deux fois moins de fluorophores sur le chitosane après complexation du 10E que pour le 5E et donc deux fois moins de dégagement d'énergie. Le niveau devient possiblement trop faible pour être détecté par l'appareil.

Une autre hypothèse qui paraît plus plausible est que l'interaction entre le chitosane et l'étiquette du 10E est si forte que la dissociation observée pour le 5E n'a pas lieu. La constante d'interaction obtenue par modélisation des isothermes est de l'ordre de  $10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}$  pour le 10E, ce qui est une valeur élevée pour une interaction biologique. En d'autres termes, malgré l'augmentation de la concentration en macromolécule, l'interaction est trop forte pour que les ligands puissent se dissocier du chitosane. Comme il sera discuté plus loin dans le document, les fluorophores présents sur les peptides 10E dimérisent, tout comme ceux du peptide 5E (section 4.3.3). Mais contrairement au peptide 5E, l'augmentation de la concentration en chitosane n'engendre pas de libération de peptides (section 4.3.4), ce qui semble donc abonder dans le sens d'une interaction trop forte entre chitosane et 10E pour engendrer une quelconque dissociation.

Il semblerait donc y avoir coopération entre les peptides sur la chaîne polymérique. Celle-ci est très certainement due à la présence de fluorophores sur les peptides. En effet, comme le montre la figure 17, le 5-FAM est composé de nombreux cycles aromatiques qui lui confèrent également un caractère hydrophobe. Cet enchaînement de cycles est appelé xanthène et est présent chez de nombreux fluorophores (rhodamine, fluoréscéine, Rose du Bengale). Ces fluorophores peuvent s'aggréger tout particulièrement en milieu aqueux (Valdes-Aguilera et al., 1989). Sur la base de cette hypothèse, des tests de microcalorimétrie ont été réalisés avec des peptides ne possédant ni le 5-FAM, ni le bras espaceur de glycines. La figure 25 montre les isothermes du 10E avec et sans étiquette. Quant à la figure 26, elle présente l'isotherme de tests réalisés avec le peptide 15E non marqué. Ces expériences ont pour objectif de

tester la variation de l'affinité avec l'augmentation du nombre d'acides glutamiques sur l'étiquette. Les conditions dans lesquelles cet essai a été mené sont les mêmes que pour les peptides avec étiquette.

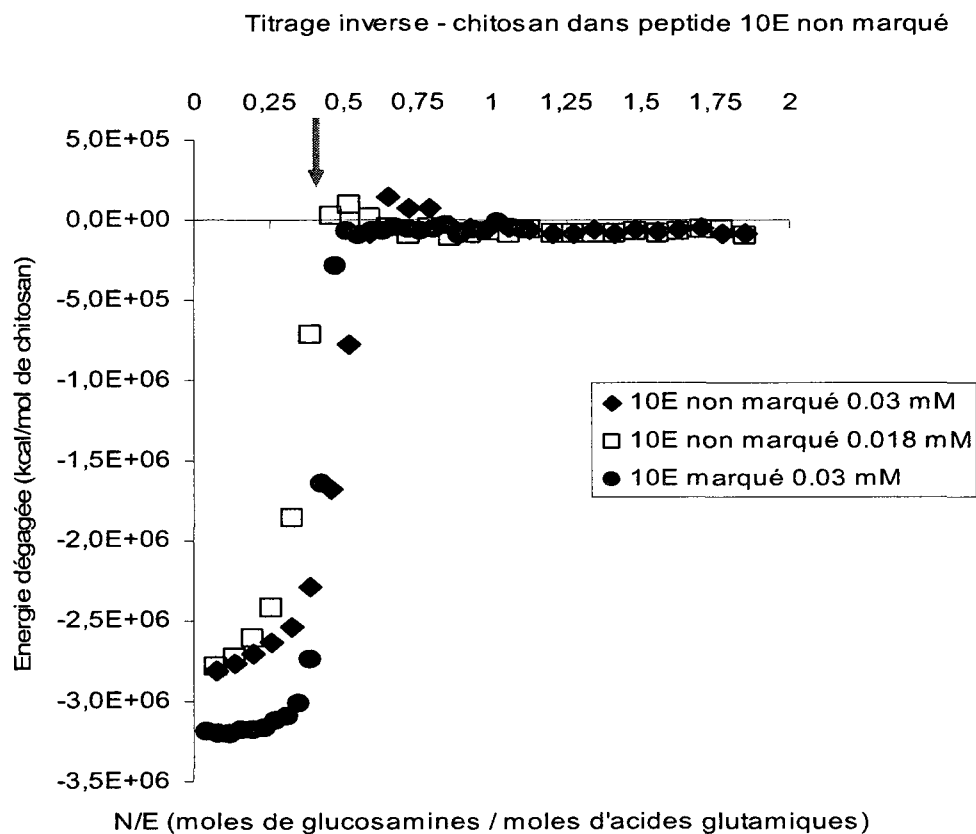


**Figure 25. Isothermes comparés du 10E avec et sans fluorophore. La concentration du 10E sans 5-FAM est de 0.018 mM (losanges noirs et carrés blancs). Le 10E marqué avec 5-FAM (cercles noirs) est donné pour comparaison. La flèche rouge indique la formation d'une bosse pour les 10Es non marqués.**



**Figure 26. Isothermes du peptide 15E non marqué avec un fluorophore. La concentration du 15E était de 0.021 mM.**

**Tableau 5. Paramètres thermodynamiques obtenues par analyse des isothermes des peptides non marqués (modèle SSIS et Mc Gee Van Hippel). Toutes les définitions et les unités des grandeurs sont données dans le tableau 4.**

|                    | Modèle SSIS                   |                                              |                                               | Modèle Mc Gee Van Hippel |                    |                     |
|--------------------|-------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
|                    | N                             | K                                            | $\Delta H$                                    | I                        | K                  | $\Delta H$          |
| 10E non marqué (1) | 0.44<br>$\pm 4.2 \text{ E-}5$ | $2.0 \text{ E } 9$<br>$\pm 3.7 \text{ E } 8$ | $-2.7 \text{ E } 6$<br>$\pm 4.1 \text{ E } 4$ | 4.1                      | $1.6 \text{ E } 7$ | $-3.0 \text{ E } 6$ |
| 10E non marqué (2) | 0.32<br>$\pm 4.1 \text{ E-}5$ | $2.4 \text{ E } 9$<br>$\pm 5.8 \text{ E } 8$ | $-2.7 \text{ E } 6$<br>$\pm 5.4 \text{ E } 4$ | 3.0                      | $1.4 \text{ E } 7$ | $-2.9 \text{ E } 6$ |
| Moyenne            | 0.38                          | $2.2 \text{ E } 9$                           | $-2.7 \text{ E } 6$                           | 3.5                      | $1.5 \text{ E } 7$ | $-3.0 \text{ E } 6$ |
| 15E non marqué (1) | 0.63<br>$\pm 2.7 \text{ E-}5$ | $6.8 \text{ E } 9$<br>$\pm 1.3 \text{ E } 9$ | $-3.1 \text{ E } 6$<br>$\pm 1.9 \text{ E } 4$ | 8.9                      | $5.6 \text{ E } 9$ | $-3.2 \text{ E } 6$ |
| 15E non marqué (2) | 0.52<br>$\pm 3.2 \text{ E-}5$ | $6.4 \text{ E } 9$<br>$\pm 4.2 \text{ E-}5$  | $-2.9 \text{ E } 6$<br>$\pm 2.5 \text{ E } 4$ | 7.2                      | $1.5 \text{ E } 9$ | $-3.2 \text{ E } 6$ |
| Moyenne            | 0.58                          | $6.6 \text{ E } 9$                           | $-3.0 \text{ E } 6$                           | 8.1                      | $3.6 \text{ E } 9$ | $-3.2 \text{ E } 6$ |

Il a malheureusement été impossible d'acquérir l'isotherme du 5E sans fluorophore. Des difficultés de synthèse du peptide pourraient en être la raison, les séquences peptidiques très chargées étant parfois complexes à synthétiser. De plus, des bosses de faible amplitude sont observées sur les isothermes du 10E dépourvu de 5-FAM et de très faible amplitude sur les isothermes du 15E, mais elles n'ont pas le profil de dissociation de celle du 5E. Lors du titrage calorimétrique du peptide non marqué, les charges du peptide sont peu à peu compensées par les charges du chitosane et, à saturation, celles-ci sont totalement compensées. Ainsi, la solubilité du complexe devient problématique, certaines parties auront tendance à précipiter ou à flocculer. Ce phénomène est souvent observé pour les polyélectrolytes chitosane/dextran en particulier lorsqu'ils sont formés par un ajout progressif de chitosane (Drogoz et al., 2007) Ce phénomène n'est pas observé pour les peptides marqués car la fluoréscéine confère une solubilité suffisante aux complexes peptide/chitosane, ce qui élimine le

risque de précipitation. Il est possible d'observer sur la figure 25 au niveau de la flèche rouge qu'une bosse se forme pour les 10E non marqués uniquement, ce qui souligne une différence de comportement des complexes après saturation. Des détails supplémentaires sont donnés dans la section 4.3.4 portant sur les conditions de formation des complexes.

Comme prévu par Velazquez-Campoy, l'enthalpie d'association est différente pour un cas coopératif. En effet, lors qu'il n'y a pas coopération, l'enthalpie observée est uniquement due à l'association des peptides sur le chitosane. Par contre, en cas de coopération, l'enthalpie de dimérisation des fluorophores vient s'ajouter à celle-ci, modifiant l'enthalpie observée par microcalorimétrie. En fait, cette addition des enthalpies est valable en tout point de la courbe précédant la saturation. Une estimation du nombre de dimères formés par injection peut ainsi être donnée grâce à la formule suivante :

$$\begin{aligned} \Delta H_{10E} - \Delta H_{10E}^{\text{marqué}} \\ = -(\Delta H_{\text{électrostatique}} + \Delta H_{\text{dimérisation}}) + \Delta H_{\text{électrostatique}} \\ = -3150 + 2700 = -450 \text{ kcal/mol} \end{aligned}$$

*et*

$$\Delta H_{\text{dimérisation}} = N \cdot \Delta h_{\text{dimérisation}}$$

N désigne le nombre de dimères se formant en solution et  $\Delta h_{\text{dimérisation}}$  l'enthalpie d'une dimérisation.

L'enthalpie de dimérisation de deux fluoréscéines vaut -7.6 kcal/mol (Valdes-Aguilera et al., 1989), ce qui veut dire qu'environ 60 dimères se forment à chaque injection. Dans le cas du 5E, la valeur de l'enthalpie de dimérisation a été estimée grâce au modèle de Mc Gee et Van Hippel et valait 850 kcal/mol environ. 110 dimères se forment donc sur le chitosane à chaque injection de 5E, ce qui est cohérent avec la valeur trouvée pour le peptide 10E étant donné que deux fois plus de fluorophores seront présents dans le cas du 5E pour un même nombre d'acides glutamiques.

Il est à noter que l'enthalpie d'interaction  $\Delta H$  est égale pour les peptides 10E et 15E non marqués, ce qui confirme ce qui avait été dit auparavant. Le transfert de protons du tampon vers le chitosane se déroule de la même façon d'où l'égalité des valeurs (-3100 kcal/ mol).

De plus, le peptide 15E possède une constante d'interaction 10 à 100 fois supérieure à celle du 10E, montrant que l'ajout d'acides glutamiques engendre l'augmentation de la stabilité de l'interaction. Cependant, le pendant de cet effet est la diminution de la solubilité du chitosane du fait de l'implication d'un plus grand nombre de glucosamines dans l'interaction. Il existe donc un compromis à trouver entre la longueur de l'étiquette, donc la stabilité du greffage et la préservation des propriétés du chitosane.

Afin de confirmer l'hypothèse d'une coopération des peptides par aggrégation des fluorophores, d'autres mesures ont été menées. La première était l'acquisition et l'étude des spectres UV/visible des complexes peptide/chitosane.

#### 4.3.3. Interaction des ligands entre plus proches voisins : spectres UV/visible des complexes peptide/chitosane

Lors du retrait des échantillons passés en microcalorimétrie, un changement de couleur nette, visible à l'œil nu et une diminution de l'opacité de la solution avaient été observés. La figure 27 montre ce passage du jaune intense à l'orange pâle. Il est à noter que le pH a été vérifié et qu'aucune différence supérieure à  $\pm 0.02$  unités n'a été observée.

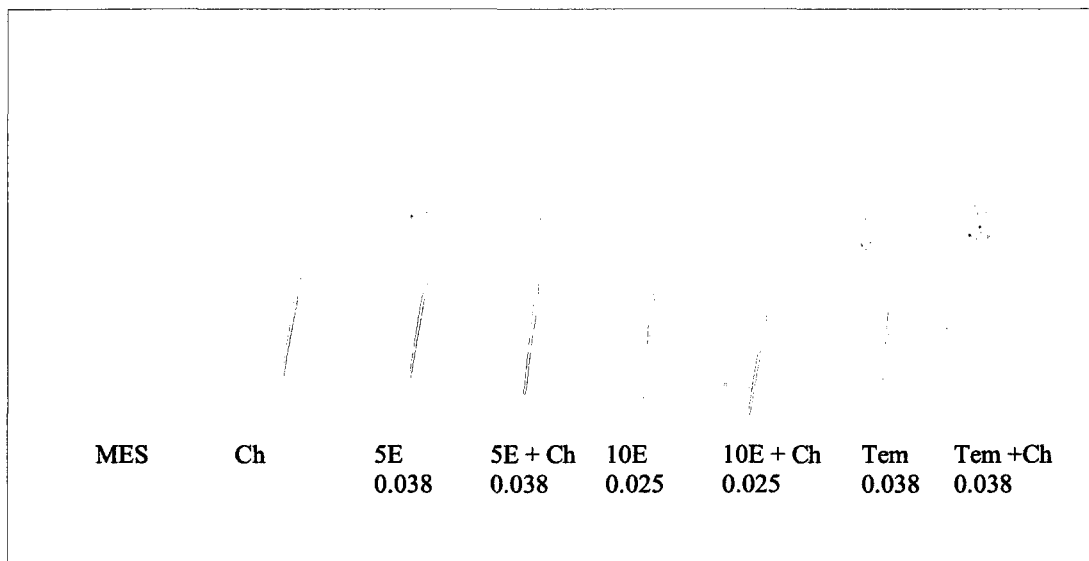


**Figure 27. Échantillons témoins et produits des expériences de microcalorimétrie. Les dénominations des échantillons sont inscrites sous les tubes avec leur concentration en peptide correspondante (en mM). Ch désigne le chitosane et Tem le peptide témoin. Tous les échantillons portant la dénomination Ch contiennent  $0.25 \mu\text{M}$  de chitosane.**

Afin de quantifier ce changement dans l'absorbance des échantillons, les spectres UV/Visible ont été acquis pour chacun des échantillons présentés ci-dessus. Les concentrations sont demeurées inchangées, exception faite des échantillons contenant du témoin qui ont été dilués deux fois pour mesurer des absorbances inférieures à l'absorbance maximale (environ 3 unités d'absorbance). Cela n'a pas été nécessaire pour les autres échantillons.

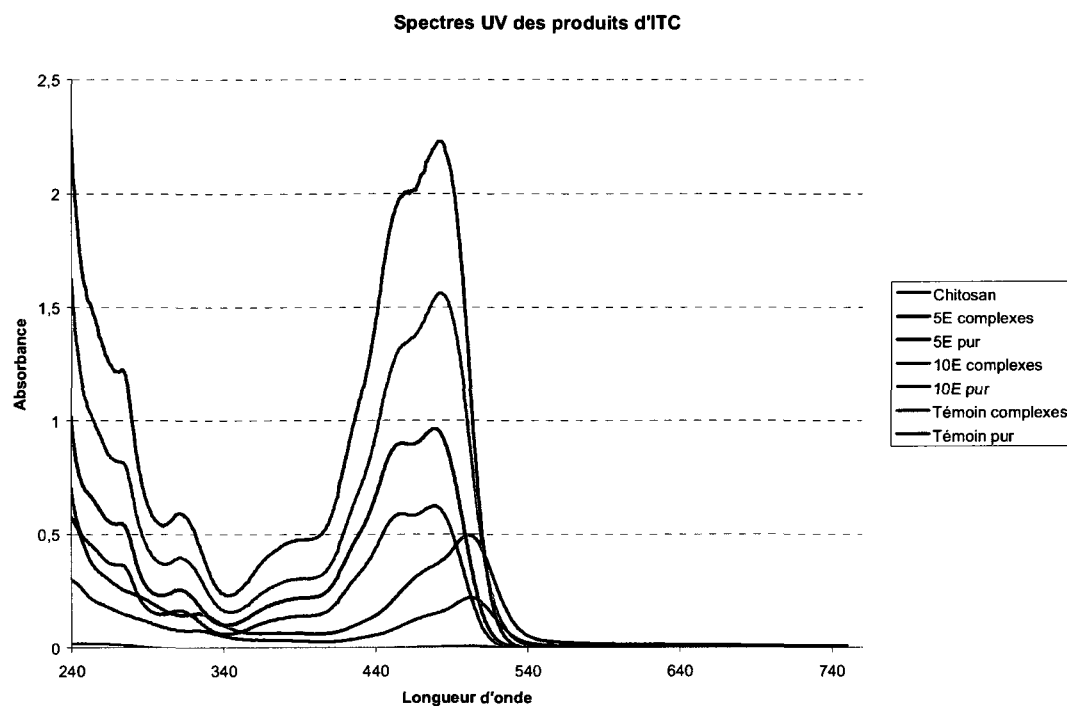


**Figure 28. Spectres UV/Visible des complexes peptide/chitosane comparés aux peptides purs**

Pour plus de clarté, le tableau 6 récapitule les maxima d'absorbance pour chacun des échantillons et les coefficients  $\epsilon$  d'extinction molaire calculés. Ce dernier a été estimé à l'aide de la loi de Beer-Lambert.

**Tableau 6. Tableau récapitulatif des propriétés spectroscopiques des différents composés testés en UV/Visible (cf Figure 28)**

| Peptide | État du peptide | Longueur d'onde des maxima d'absorbance ( $\lambda_{\text{max}}$ en nm) | Coefficient d'extinction molaire ( $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) |
|---------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 5E      | Pur             | 457                                                                     | 2.3                                                                             |
|         |                 | 479                                                                     | 2.5                                                                             |
|         | Complexé        | 477                                                                     | 0.9                                                                             |
|         |                 | 501                                                                     | 1.3                                                                             |
| 10E     | Pur             | 458                                                                     | 2.4                                                                             |
|         |                 | 479                                                                     | 2.4                                                                             |
|         | Complexé        | 473                                                                     | 0.6                                                                             |
|         |                 | 502                                                                     | 0.9                                                                             |
| Témoin  | Pur             | 459                                                                     | 10.0                                                                            |
|         |                 | 481                                                                     | 11.1                                                                            |
|         | Complexé        | 458                                                                     | 6.7                                                                             |
|         |                 | 482                                                                     | 7.8                                                                             |

Tout d'abord, en observant les spectres UV/Visible, on peut remarquer que le pic de maximum d'absorbance est double pour tous les échantillons. Ceci s'explique par la présence dans le milieu d'un équilibre entre deux formes acido-basiques de la fluoréscéine, la forme dite monoanionique et la forme dianionique (Sjoback et al., 1998). Le  $pK_a$  du couple est de 6.43, ce qui à pH 6.0 donne une proportion de 37% de dianion et 63% de monoanion (voir Figure 29)

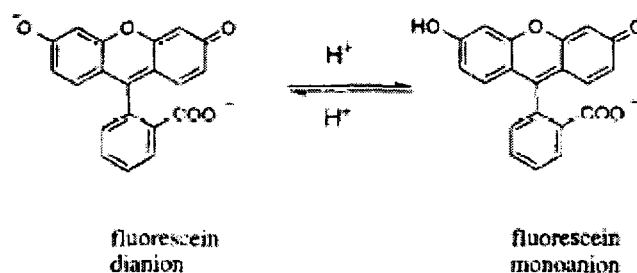


Figure 29. Équilibre entre les formes monoanionique et dianionique de la fluoréscéine ( $pK_a=6.43$ ). Adapté de Jones et al.

Il s'avère que ces deux formes ont des spectres et des coefficients d'extinction molaires différents, propriétés qui, de plus, varient en fonction du pH. En particulier, à pH 6.0, les deux spectres se recouvrent, d'où l'apparition de deux maxima (Jones et al., 1998). Le premier pic est caractéristique de la présence de monoanions alors que la présence de dianions est responsable de la présence du second. Ces deux formes ont également des propriétés de fluorescence différentes, ce qui sera détaillé plus loin.

Par contre, comme la concentration en fluoréscéine est toujours inférieure à 20  $\mu\text{M}$  et celle en sel en-deçà d'une mole par litre, la forme dimérisée du fluorophore est en proportion négligeable (Sjoback et al., 1998).

En examinant de plus près le tableau récapitulatif des coefficients d'extinction molaire pour les espèces non complexées (Tableau 6), on peut remarquer que les valeurs calculées pour le 5E et le 10E sont égales et sont cohérentes avec la valeur donnée par Jones et al. pour des dérivés de la fluoréscéine. Par contre, la valeur pour le témoin est beaucoup plus élevée. Cette propriété est cohérente avec le fait que le coefficient  $\epsilon$  est très influencé par l'ajout de molécules à son extrémité. Ainsi, l'influence du tripeptide GGG et celle de l'ensemble de l'étiquette électrostatique sont différentes et donnent lieu à ces différences dans le spectre d'absorbance (Jones et al., 1998).

Comme on peut le voir à la fois sur la figure 27, les spectres et le tableau récapitulatif, les pics ont subi un déplacement de 20 nanomètres environ, ce qui engendre un changement de couleur visible. De plus, les coefficients d'extinction molaire ont été divisés par 2.5 pour les peptides 5E et 10E, ce qui est l'image de la diminution de l'opacité des échantillons. Ces coefficients sont restés du même ordre de

grandeur; ceci suggère que le phénomène observé pour les peptides 10E et 5E est identique. Le cas du témoin, où aucun déplacement n'est observé mais dont le coefficient d'absorption molaire est modifié, sera traité plus loin (Section 4.3.4). Cependant, il faut souligner que l'absence de déplacement des maxima élimine la possibilité d'une quelconque dimérisation des fluoréscéines libres.

Il est souligné dans de nombreuses publications scientifiques que l'aggrégation de fluorophores peut créer un décalage net dans le spectre UV/Visible ainsi que des variations dans les niveaux d'absorbance (Geoghegan et al., 2000; Ilich et al., 1996; Valdes-Aguilera et al., 1989). La dimérisation des fluorophores modifie l'environnement électronique des deux molécules impliquées, ce qui a un effet direct sur le coefficient d'extinction molaire et sur la longueur d'onde du maximum d'absorbance. Le coefficient d'extinction molaire des peptides n'est cependant pas modifié de la même façon, il diminue davantage pour le 10E. Ceci peut suggérer un empilement plus compact des fluorophores du fait de la plus grande stabilité d'interaction. (Geoghegan et al., 2000).

Par ailleurs, la conformation de l'empilement des fluorophores a un effet direct sur le déplacement des maxima : une conformation parallèle amènera un déplacement vers des longueurs d'onde élevées alors qu'une conformation « head-to-tail » causera une diminution de la longueur d'onde  $\lambda_{\text{max}}$  (Valdes-Aguilera et al., 1989).

Les fluorophores viennent donc dimériser de façon parallèle pour former des complexes de propriétés spectrales différentes par rapport aux monomères. Le mécanisme de cette interaction entre xanthènes n'est pas clairement établi. Certains auteurs la décrivent comme étant la conséquence d'interactions hydrophobes uniquement (Rohatgi et al., 1965), mais cette interprétation est contestée par plusieurs autres publications. En effet, les enthalpies de dimérisation mesurées variaient de -10 kcal/mol (Lopez Arbeloa et al., 1982) à -7.6 kcal/mol (Rohatgi et al., 1965), valeurs très élevées pour des interactions hydrophobes. Par ailleurs, on peut remarquer sur le tableau 4 que l'écart entre l'enthalpie de dimérisation  $\Delta h$  est exothermique, alors que

dans le cas d'une interaction purement hydrophobe, celle-ci est endothermique ou légèrement exothermique (-1 kcal/mol).

De plus, les paramètres thermodynamiques d'interaction des fluoréscéines dans différents solvants sont nettement supérieurs dans l'eau par rapport au glycérol et à l'éthanol (Valdes-Aguilera et al., 1989). Il a donc été suggéré que l'eau jouait un rôle d'intermédiaire pour l'association des molécules par liaisons hydrogènes, ce qui explique la valeur élevée des enthalpies d'association.

Finalement, les propriétés d'absorption UV/Visible ne sont pas les seules à subir une modification : les molécules de fluoréscéine perdent jusqu'à 90% de leur potentiel de fluorescence dans certaines conditions (Geoghegan et al., 2000). Ce phénomène est nommé auto-extinction sera étudié dans la prochaine section.

#### 4.3.4. Étude de la formation des complexes entre peptides étiquetés et chitosane par auto-extinction du fluorophore.

Pour confirmer les résultats obtenus en ITC et en UV/Visible, des essais de formation de complexes chitosane/peptide basés sur le principe d'auto-extinction des fluorophores ont été menés avec les peptides 5E et 10E. L'objectif de ces différentes mesures était d'étudier différentes techniques d'ajout pour la formation des complexes peptide / chitosane.

L'auto-extinction ou « self quenching » est un phénomène observé lors de l'aggrégation de fluorophores. Tout comme les pertes d'absorbance observées pour les dimères de marqueurs fluorescents, la perturbation des environnements électroniques de ceux-ci mènent à de grandes variations des niveaux de fluorescence. Cet effet a été observé pour les xanthènes, en particulier pour la rhodamine et la fluoréscéine (Valdes-Aguilera et al., 1989).

Ainsi, lorsque les molécules de fluoréscéine sont suffisamment proches ( $d < d_{\text{Forster}} = 42 \text{ \AA}$ ), elles dimérisent et la fluorescence chute de façon remarquable. Pour donner un ordre d'idée, la distance entre deux unités monomériques de chitosane n'est que de  $5.5 \text{ \AA}$ . Les fluorophores présents dans un rayon inférieur à  $42 \text{ \AA}$  d'un autre seront

nommées voisins (Egawa et al., 2008; Sato et al., 2006). La figure 30 résume donc la variation attendue de la perte de fluorescence due à l'auto-extinction en fonction du rapport N/E.

La forme de la courbe de fluorescence en fonction du ratio molaire N/E est dépendante des différentes étapes de liaison au polymère. Par exemple, pour l'ajout de peptide dans une solution de chitosane, la courbe aura a priori la forme illustrée par la figure 30. Pour des N/Es inférieurs à la saturation, la fluorescence décroît de façon linéaire ; les peptides qui se lient au chitosaneaturent celui-ci et possèdent tous un voisin. Cependant, le nombre de sites disponibles est encore insuffisant pour lier tous les peptides et les peptides libres fluorescent de façon normale. Ainsi, avec l'augmentation de la quantité de chitosane présente, la proportion de peptides liés augmente de façon linéaire et la perte en fluorescence également. Puis, après saturation, le chitosane sera en excès et donc la proportion de peptides liés possédant un voisin diminuera de nouveau, et ce de façon linéaire. Lorsque le chitosane sera en très grand excès, l'effet d'auto-extinction disparaîtra. Comme on le verra en détail, les courbes dépendent fortement du type d'essai réalisé.

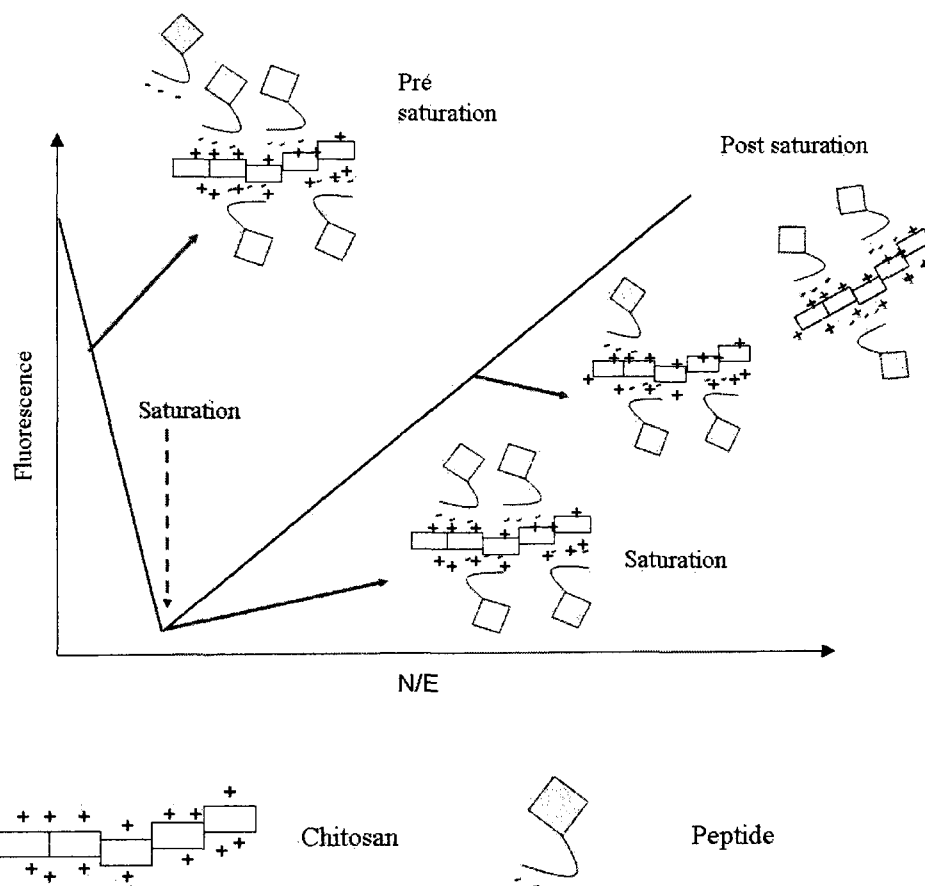


**Figure 30. Schéma récapitulatif du phénomène d'auto-extinction lors de l'interaction entre le chitosane et le peptide étiqueté. L'exemple donné ici est pour l'ajout en une injection de peptide dans une solution de chitosane.**

Cette technique a été utilisée pour étudier la stœchiométrie des complexes en solution et en particulier la valeur de saturation du chitosane par le peptide. L'objectif principal était de comparer quatre techniques de formation des complexes et étudier les mécanismes dans chacun des cas pour déterminer le procédé le plus adéquat en termes de stabilité et de rendement. Par ailleurs, la concentration en fluoréscéine est toujours inférieure à  $20 \mu\text{M}$  pour éviter des phénomènes d'auto-extinction sous forme libre (Sjoback et al., 1998).

#### 4.3.4.1. Technique 1 : Addition progressive d'un des composants

La première approche expérimentale consiste à ajouter progressivement un des constituants dans un milieu comprenant son partenaire. Ainsi, le constituant ajouté goutte à goutte sera en défaut dans le milieu jusqu'à l'atteinte de la saturation. Les deux possibilités sont donc d'ajouter le peptide à une solution de chitosane (addition directe) ou d'ajouter le chitosane à une solution de peptide en excès (addition indirecte).

Le premier essai portait sur l'addition de peptide goutte à goutte à une solution de chitosane.

##### 4.3.4.1.1. Titrage goutte à goutte de chitosane par une solution de peptide

Titration direct et goutte à goutte

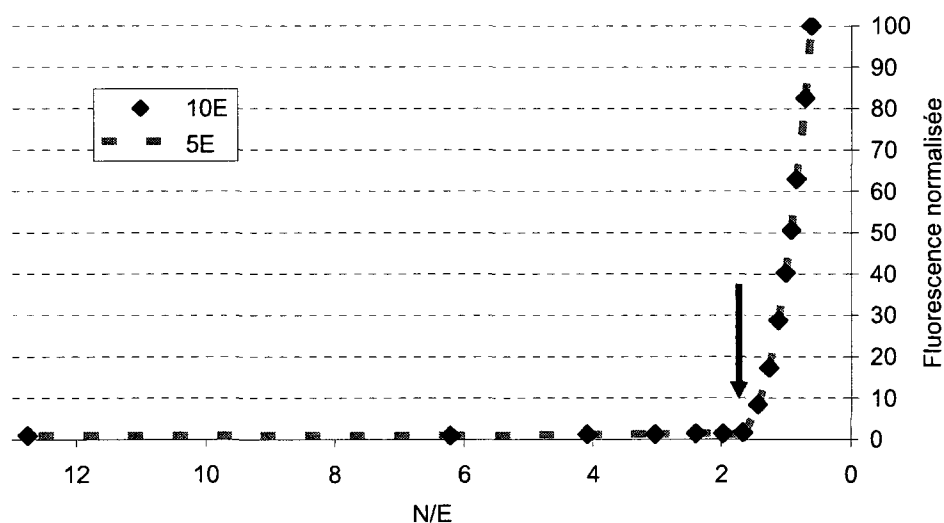


**Figure 31.** Titration direct et goutte à goutte du chitosane par les peptides 5E et 10E. La fluorescence a été normalisée par rapport au maximum observé. Celle-ci a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 480 nm et d'émission de 530 nm. Les points représentent les valeurs du 10E et la ligne rouge celles du 5E. Les ratios molaires N/E sont exprimés en moles de glucosamines par moles d'acides glutamiques L'expérience a été répétée deux fois pour le 5E et une fois pour le 10E. La flèche indique l'atteinte de la saturation (perte de fluorescence maximale).

Les deux courbes sont totalement superposées, le 5E et le 10E ont le même comportement suite à leur addition dans le chitosane. La première étape de titrage est

caractérisée ici par un greffage de l'intégralité du peptide injecté et des niveaux de fluorescence nuls, puis une augmentation linéaire des niveaux de fluorescence à partir d'un ratio de 1.7. L'apparition de la couleur orangée caractéristique des complexes est visible dès la première injection puis le mélange devient progressivement jaune foncé.

Le mécanisme de formation des complexes par ajout goutte à goutte est caractérisé par la formation des liaisons électrostatiques N/E dans le milieu et la formation de colloïdes. Lors des premières injections, le peptide vient se greffer, créant des zones localement hydrophobes. Ces dernières viennent s'associer pour former des colloïdes stabilisés par la présence des extrémités ionisées et hydrophiles de chitosane. Schématiquement, des colloïdes formés d'un cœur de peptides hydrophobes et d'une couronne hydrophile de chaînes de chitosane seront possiblement formés (voir Figure 32). Ainsi, les peptides seront tous voisins, il y aura auto-extinction et la fluorescence sera presque nulle. Du fait de la présence de chaînes de chitosane chargées dans la couronne hydrophile, les injections suivantes engendreront le greffage de peptides sur ces chaînes environnantes et le cœur hydrophobe prendra de l'ampleur. La fluorescence sera donc presque nulle jusqu'à saturation des chaînes de chitosane. (Tsuchida et al., 1982) La figure 32 résume ces étapes de formation de complexes. Ainsi, l'augmentation linéaire de la fluorescence correspond à une dilution des fluorophores dans le milieu, la saturation étant atteinte au point d'inflexion.

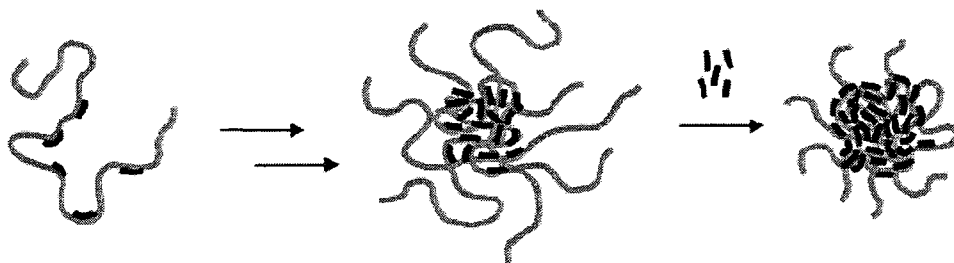


**Figure 32. Formation de colloïdes dans la solution de chitosane par ajout goutte à goutte de peptide.**  
 Les petits traits noirs représentent le peptide et les longues chaînes le chitosane.  
 Adapté de Schatz et al.

#### 4.3.4.1.2. Titrage goutte à goutte d'une solution de peptide par du chitosane

Le cas où le chitosane est ajouté goutte à goutte à une solution de peptide est ensuite étudié. Brièvement, des injections de 20  $\mu$ l de chitosane sont ajoutées à une solution de peptide concentrée et le ratio de perte par rapport au niveau initial est mesuré. Ce mode d'injection est également celui utilisé en microcalorimétrie (titrage indirect, figure 33 ci-dessous) sous agitation.

Titrage goutte à goutte indirect

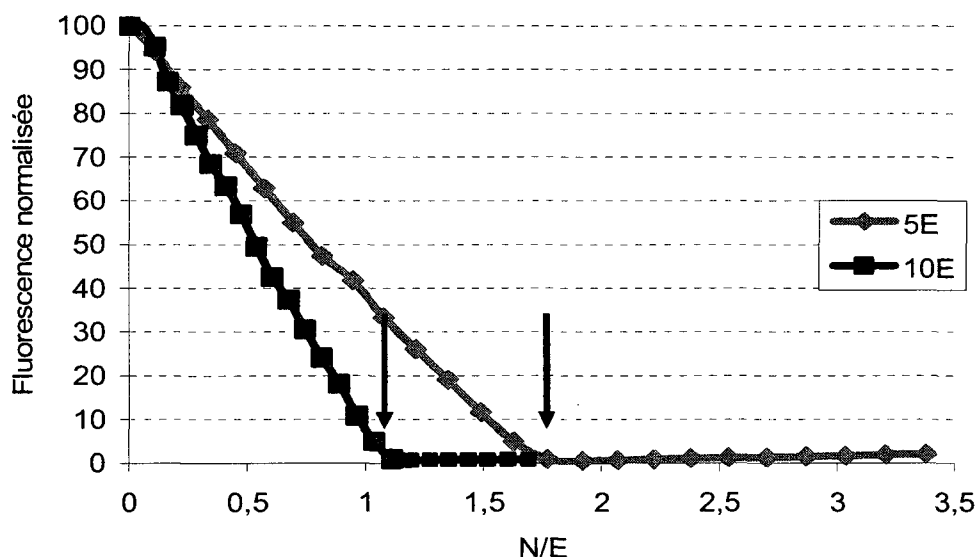


**Figure 33. Titration indirecte et goutte à goutte de peptides par le chitosane. La fluorescence est normalisée par rapport au maximum observé (pas de chitosane ajouté) et elle a été mesurée comme pour la figure 32. Les ratios molaires N/E sont exprimés en moles de glucosamines par moles d'acides glutamiques. L'expérience a été répétée deux fois pour le 5E et une fois pour le 10E. Les flèches indiquent l'atteinte des saturations (pertes de fluorescence maximales)**

La courbe de perte est caractérisée par une première partie linéaire puis par un plateau constant pour le 10E et décroissant pour le 5E. La décoloration progressive (jaune foncé vers orange clair) de la solution est visible à l'œil nu. Il est également à noter que l'atteinte de la perte maximale ne se présente pas pour les mêmes ratios; celle-ci est visible pour le 10E autour de 1.1 et de 1.8 pour le 5E. De même, ces valeurs sont

différentes de celles observées en titrage direct (peptide dans chitosane) où la détection de la saturation avait lieu pour un N/E de 1.7 et ce, pour les deux types de peptides.

Le mécanisme impliqué est à nouveau un mécanisme de neutralisation de charges, mais les rôles sont maintenant inversés : le peptide, nettement plus petit que le chitosane, doit agir comme hôte de ce dernier. L'effet principal de cette inversion est la diminution marquée de la stabilité des colloïdes (Schatz et al., 2004; Tsuchida et al., 1982). En effet, la couronne stabilisatrice présente dans le cas du chitosane en excès ne pourra être formée ici, les zones hydrophobes seront alors fortement instables. Le mécanisme est donc régi uniquement par la formation des liaisons électrostatiques. L'hypothèse peut être émise que les peptides se lieront au chitosane sans former de macrostructures. Ceci expliquerait la décroissance linéaire de la fluorescence : les peptides se lient sur les premières chaînes de chitosane injectées, engendrant l'auto-extinction des fluorophores portés par les peptides et ce, progressivement, jusqu'au point où les sites du chitosane présent dans le milieu seront suffisants pour lier tout le peptide. On aura alors un maximum de perte et de saturation.

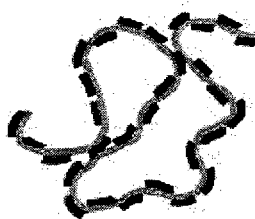


**Figure 34. Formation de complexes sur la chaîne de chitosane injectée dans une solution de peptide concentrée. Les traits noirs représentent le peptide et le trait gris, la chaîne de chitosane.**  
Adapté de Schatz et al.

Toutefois, contrairement au titrage direct, des différences de comportement entre peptides sont observables. Tout d'abord, la fluorescence dans l'échantillon contenant le 5E a tendance à augmenter après la saturation alors que celle du 10E reste strictement la même. Le peptide 5E vient donc se lier aux chaînes de chitosane nouvellement injectées et se libère de ses deux voisins. Cet effet de dissociation dû à l'augmentation de la concentration en macromolécules a déjà été observé pour ce peptide en

microcalorimétrie et est interprété comme un signe de la coopération existant entre peptides (Velazquez-Campoy, 2006). En revanche, tout comme en microcalorimétrie, rien n'est observé pour le 10E probablement du fait de la très haute stabilité de l'interaction peptide / chitosane (voir section 4.3.2).

Enfin, les ratios N/E de saturation observés entre les expériences de microcalorimétrie et celles d'auto-extinction ne sont pas égaux, comme le tableau suivant le montre.

**Tableau 7. Récapitulatif des ratios de saturation obtenus par auto-extinction et ITC.**

|     | Auto-extinction |           | ITC       |
|-----|-----------------|-----------|-----------|
|     | Directe         | Indirecte | Indirecte |
| 5E  | 1.7             | 1.8       | 0.6       |
| 10E | 1.7             | 1.1       | 0.4       |

L'agitation pourrait jouer un rôle dans la différence observée. En effet, le mécanisme impliqué est un mécanisme de neutralisation de charges, dont la cinétique est très rapide, presque instantanée. Donc, les peptides présents au voisinage immédiat des chaînes de chitosane viendront s'adsorber sur les chaînes de façon très rapide. L'agitation a pour effet d'augmenter la proportion de peptides présents au voisinage des chaînes en accentuant leur diffusion dans le milieu. Ainsi, un nombre plus important de chaînes viendra désactiver les charges du chitosane injecté et la saturation sera atteinte plus rapidement (Sæther et al., 2008). Mais cette explication semble insuffisante pour expliquer la différence entre les ratios, des essais supplémentaires devront être menés pour discerner les différences entre microcalorimétrie et expérience de type auto-extinction.

Enfin, dans les titrages indirects, les ratios de saturation sont différents suivant le peptide utilisé. Cette différence est observable tant sur les mesures en auto-extinction que sur celles en microcalorimétrie. L'encombrement stérique causé par le fluorophore pourrait être en cause : la fluoréscéine des peptides déjà liés empêche les peptides

encore en solution d'avoir accès à certains sites du chitosane. Pour un même nombre de sites, il y aura deux fois moins de fluorophores pour le 10E, ce qui diminuera cet effet stérique. De même que pour l'influence de l'agitation, des mesures supplémentaires sont nécessaires pour expliquer cette différence entre peptides dans les titrages indirects.

#### 4.3.4.1.3. Bilan de la technique de titrage par ajout progressif

Tous les cas de figures ont été testés, menant à des résultats illustrant un mécanisme de neutralisation de charges de type « hôte – partenaire ». Les ratios sont parfois sous-stœchiométriques ( $N/E < 1$ ), comme dans le cas des expériences en microcalorimétrie, ce qui conduit à des complexes formés entre une partie des charges de l'étiquette électrostatique et le chitosane. Ce cas de figure est à éviter pour obtenir une stabilité maximale du greffage. De plus, la technique est très sensible aux propriétés des composants ajoutés ainsi qu'à l'ordre dans lequel ils sont mis en solution.

Enfin, l'addition progressive de peptide amène un problème de solubilité. En passant par le seuil de saturation, la solubilité du chitosane atteint son minimum et l'ajout ultérieur de peptide ou de chitosane ne permet pas d'améliorer cette solubilité. Comme la microcalorimétrie l'a montré, la présence de la fluoréscéine permet d'assurer une solubilité suffisante aux complexes à la saturation. Une précipitation semblait apparaître dans le cas du 10E non marqué, ce qui n'était pas le cas du 10E marqué à la fluoréscéine. Il faut donc au maximum éviter de passer par ce seuil, ce que l'addition rapide de peptide permet de faire (Schatz et al., 2004). La technique dite de « flash mixing » ou d'ajout en une injection a donc été étudiée comme méthode alternative de formation des complexes.

#### 4.3.4.2. Technique 2 : Ajout en une seule injection d'un des composant dans le milieu (« flash mixing »)

##### 4.3.4.2.1. Injection d'aliqots de peptide concentré dans une solution de chitosane

La figure suivante (Figure 35) présente les résultats de perte de fluorescence pour un ajout de peptide dans une solution de chitosane. Brièvement, cette dernière a été diluée à certains facteurs pour obtenir des ratios N/E répartis sur une plage de 0 à 24. Ensuite, une quantité définie de peptide 5E ou 10E a été injectée dans tous les échantillons pour obtenir dans chaque volume de 500  $\mu$ l la même concentration en acides glutamiques. La fluorescence a été normalisée par rapport à un témoin positif, où la quantité de peptide prédéfinie était ajoutée à 500  $\mu$ l de tampon MES 6.0.

#### Ajout en une injection de peptide dans du chitosane

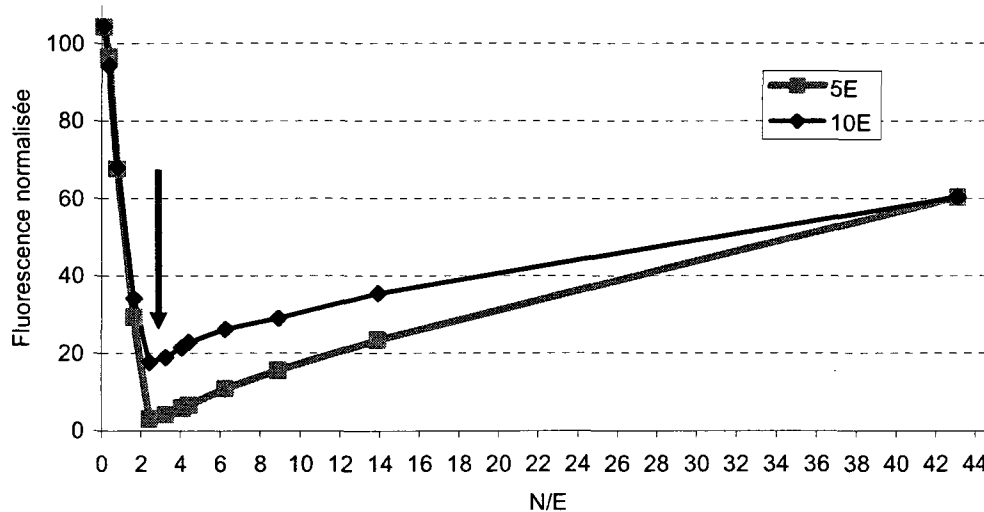


**Figure 35. Niveaux normalisés de fluorescence pour l'ajout en une injection de peptide dans une solution de chitosane.** La référence était prise pour une solution de tampon à laquelle était ajoutée la même quantité de peptide. Les ratios molaires N/E sont exprimés en moles de glucosamines par moles d'acides glutamiques. Cette expérience a été répétée 2 fois pour chaque peptide. La flèche indique l'atteinte de la saturation (perte de fluorescence maximale)

Il est à noter que les courbes du 5E et du 10E sont totalement similaires. Les étapes pré et post saturation se déroulent selon la même croissance et décroissance linéaire. De plus, conformément à nos attentes, la saturation est obtenue pour le même rapport N/E, tout comme dans le cas précédent d'ajout de peptide goutte à goutte dans le chitosane. Ce rapport vaut 2.4 à la saturation. La différence avec les essais commentés dans les sections précédentes sera discutée plus loin.

Le schéma explicatif global de cette expérience est donné en préambule à la figure 30. Brièvement, pour les N/Es plus bas que la saturation, les peptidesaturent le chitosane, mais les peptides libres fluorescent encore. Puis, suite à la saturation, les peptides seront liés mais dépourvus de voisins pour la plupart du fait de la grande disponibilité de sites (Egawa et al., 2008).

Le mécanisme explicatif de l'interaction serait similaire à celui observé pour l'addition goutte à goutte, mais il ne se base pas sur le même effet. Alors qu'il était question de neutralisation de charges pour l'addition goutte à goutte, le mécanisme présent ici est dit d'interaction « résidu à résidu ». Les peptides viennent se greffer sur le chitosane, donnant lieu à une sorte d'échelle le long de la chaîne. (Kabanov et al., 1984). Puis, les colloïdes résultant de la formation des zones hydrophobes se forment, emprisonnant quelques glucosamines protonées pour la stabilité de l'édifice. Cette étape est similaire à celle observée pour l'ajout goutte à goutte de peptide dans le chitosane, exception faite du fait que les colloïdes ne se forment qu'après complexation du peptide sur le chitosane. En d'autres termes, il n'y aura pas d'interaction peptide/colloïde, uniquement des interactions peptide/chitosane suivies de la formation d'un colloïde. Ces derniers se formeront quand le nombre de sites hydrophobes sera suffisamment élevé, ce qui aura lieu avant la saturation de tous les sites du chitosane. Cette dernière étape encapsule donc des sites de liaison disponibles, ce qui donne lieu à un ratio de saturation assez élevé (2.4) (Drogoz et al., 2007). Cette interprétation a été donnée pour expliquer les comportements du dextran et du chitosane pour la formation de polyélectrolytes. Son applicabilité dans le cas d'un peptide pourvu d'une étiquette électrostatique reste

spéculative, des expériences supplémentaires qui permettront d'élucider l'éventuelle formation de macrostructures devront être alors mises en place.

#### 4.3.4.2.2. Injection d'aliqots de chitosane dans une solution de peptide concentré

Pour compléter les possibilités, la dernière expérience consistait à étudier le système peptide/chitosane dans le cas où le peptide était en solution et le chitosane ajouté en une fois. Brièvement, des quantités constantes de peptide 5E et 10E ont été mises en solution pour obtenir une concentration en acides glutamiques constante. Puis, différentes dilutions de chitosane ont été ajoutées pour obtenir des ratios N/E compris entre 0 et 44. La référence a été prise par rapport à un ajout de MES dans un aliqot de peptide.

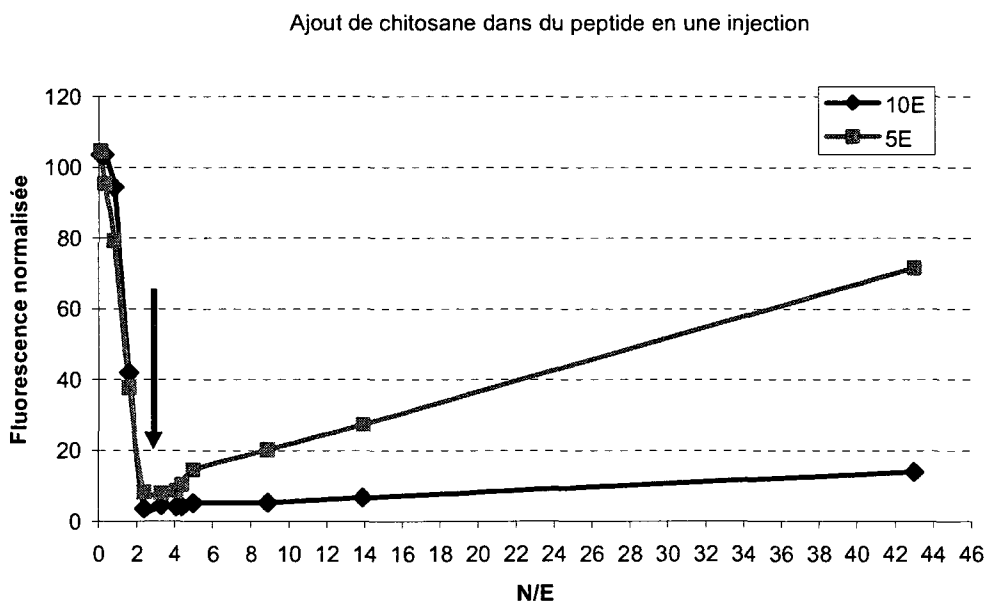


**Figure 36. Fluorescence normalisée d'aliqots de peptide après l'ajout de dilutions de chitosane. L'ajout de tampon dans un aliqot de peptide a été pris comme référence. Les ratios molaires N/E sont exprimés en moles de glucosamines par moles d'acides glutamiques. La flèche indique l'atteinte de la saturation (perte de fluorescence maximale)**

Les courbes sont très différentes de celles observées auparavant, tout comme le mécanisme de liaison. De fait, celui-ci est complexe et admet deux explications suivant le ratio N/E.

Le maximum de perte est toujours observé pour une valeur de 2.4 et les premiers points des courbes sont très similaires à tout ce qui avait été observé dans les expériences précédentes. Par contre, on observe pour les deux peptides un plateau pour lequel les pertes de fluorescence restent élevées, suggérant la formation de complexes locaux secondaires impliquant les peptides. Les niveaux de perte dépassent même ceux obtenus en ajout direct de peptide dans une solution de chitosane, ce qui pourrait s'expliquer par l'existence d'un second effet rapprochant les fluorophores entre eux et engendrant leur auto-extinction.

Le mécanisme tel que décrit par Drogoz (Drogoz et al., 2007) admet deux alternatives suivant la valeur du rapport N/E utilisé. Pour des valeurs inférieures à un seuil critique (nommé  $N/E_c$ ), les chaînes de chitosane ajoutées au peptide sont complexées par le peptide pour atteindre la saturation de tous les sites du chitosane, on a affaire au même type de mécanisme que dans le cas précédent d'ajout goutte à goutte. Il n'y aurait alors ni formation de colloïdes ni interaction entre chaînes.

Mais, lorsque N/E devient supérieur à  $N/E_c$ , une première étape de complexation de chitosane se produit par neutralisation de charges, créant localement des surconcentrations de charges négatives (Figure 37). Puis, ces zones de haute concentration en peptide agissent comme des « pièges » à chitosane et viennent complexer les chaînes restantes. Ainsi, les premières chaînes entrant en contact avec le peptide forment des structures qui complexeront ensuite le reste du chitosane. Quant aux peptides, ils resteront sur les chaînes et seront concentrés dans le complexe (Drogoz et al., 2007).

Ainsi, pour des concentrations de chitosane telles que  $N/E > N/E_c$ , les structures primaires se forment dès l'arrivée des premières chaînes de chitosane et ce, quelque soit la concentration finale de chitosane. Les peptides sont alors emprisonnés au cœur de ces structures et le niveau de fluorescence baisse de manière très marquée. Puis, l'arrivée de

chaînes supplémentaires ne permet pas la libération des peptides et ces dernières demeurent complexées dans les structures. La fluorescence demeurera donc à un niveau comparable à celui de la saturation.

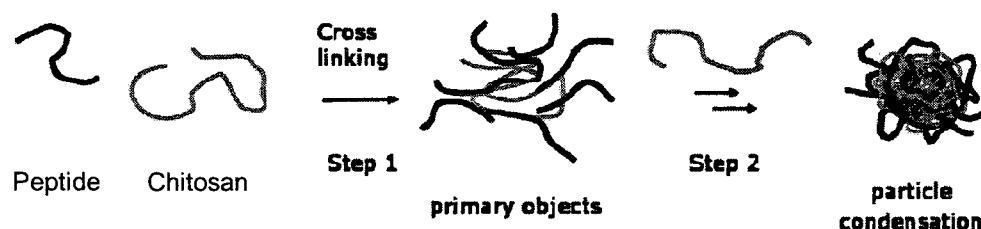


**Figure 37. Schéma d'interaction entre le chitosane et le peptide en ajout indirect (chitosane dans peptide) pour des ratios molaires élevés.**  
Adapté de Drogoz et al.

De ce fait, le premier point du plateau est celui pour lequel le chitosane est entièrement impliqué dans la formation de structures primaires, soit celui pour lequel  $N/E = N/E_c$ . Ici, cette valeur est de 2.4 pour les deux peptides. Conformément au modèle, le chitosane ajouté en surplus, donc pour des  $N/E$ s supérieurs à 2.4, contribue à la condensation des particules déjà formées et ne libère pas les peptides de leurs voisins, ce qui entraîne des augmentations faibles des niveaux de fluorescence. De fait, la diminution des pertes de fluorescence est corrélée à l'impossibilité pour ces complexes primaires de se former, effet qui a lieu lors de l'injection de très hautes concentrations de chitosane ( $N/E = 20$  environ) (Drogoz et al., 2007). La densité de sites de liaison est alors telle que chaque chaîne de chitosane n'accueillera plus plusieurs peptides partiellement liés comme c'était le cas à plus faible concentration de chitosane (voir Figure 37). Cet effet est bien observé pour le peptide 5E, la fluorescence augmente de nouveau pour de hautes concentrations en chitosane. Par contre, pour le 10E, la perte reste très élevée, même en présence de grande quantité de macromolécule. Il semblerait que de nouveau, l'interaction peptide/chitosane est si stable que les premières chaînes de chitosane au contact des peptides 10E viendront immédiatement lier une grande quantité

de chaînes peptidiques de manière presque irréversible et former ces complexes primaires et ce, malgré la disponibilité de nombreux autres sites.

Tout comme ce qui avait été mentionné pour les mécanismes précédents, ceci n'est qu'une hypothèse basée sur un modèle développé pour le polyélectrolyte dextran / chitosane qu'il faut donc prendre avec précautions. La vérification de ce modèle passe par l'analyse de la composition du milieu en différents points lors du titrage. Par exemple, l'analyse du potentiel électrostatique et de son évolution au cours du titrage donnera une idée précise sur les éventuelles macrostructures pouvant se former. Une polarité négative de ces structures indiquerait alors que les peptides se lient partiellement au chitosane, alors qu'au contraire une polarité positive indiquerait que des sites du chitosane demeurent inoccupés.

#### 4.3.4.2.3. Bilan de la technique d'ajout en une injection

Tous les cas de figure ont été testés et les mécanismes observés varient d'un cas à l'autre. Cependant, malgré ces variations entre échantillons, le ratio de saturation observé dans chaque cas est constant, il vaut 2.4 indépendamment du peptide utilisé ou de la séquence d'ajout, ce qui est caractéristique de l'ajout par « flash mixing » (Schatz et al., 2004).

#### 4.3.4.3. Synthèse sur les techniques de greffage

Le tableau suivant récapitule l'ensemble des ratios de saturation mesurés par auto-extinction. À des fins de comparaison, le ratio stœchiométrique  $N/E = 1$  avec un chitosane possédant 1000 glucosamines mène au greffage de 200 peptides par chaîne de chitosane pour le 5E et de 100 pour le 10E.

**Tableau 8. Récapitulatif des ratios N/E de saturation mesurés par auto-extinction des fluorophores. La seconde ligne pour chaque peptide correspond au nombre de peptides greffés par chaîne de chitosane. Les saturations sont indiquées par une flèche rouge sur les graphiques d'auto-extinction.**

| Peptide |                                            | Ajout en une injection |          | Ajout goutte à goutte |          |
|---------|--------------------------------------------|------------------------|----------|-----------------------|----------|
|         |                                            | Direct                 | Indirect | Direct                | Indirect |
| 5E      | Ratios de saturation                       | 2.4                    | 2.4      | 1.7                   | 1.8      |
|         | Nombre de peptides par chaîne de chitosane | 83                     | 83       | 118                   | 111      |
| 10E     | Ratios de saturation                       | 2.4                    | 2.4      | 1.7                   | 1.1      |
|         | Nombre de peptides par chaîne de chitosane | 42                     | 42       | 59                    | 91       |

Ainsi, les ratios obtenus sont toujours sur-stœchiométriques. Le procédé en une injection est indépendant de l'ordre d'ajout et conduit à des résultats indépendants du peptide à pH 6.0 dans le MES. De plus, un des problèmes qui pourrait se poser est celui de la précipitation à la saturation des complexes, problème qui ne se pose pas lors de l'ajout en une injection. En effet, en ajoutant goutte à goutte, l'équilibre à la saturation et donc la précipitation ont le temps de s'établir. Ce n'est pas le cas pour l'ajout en une injection, les mécanismes font que les complexes atteignent immédiatement la saturation sans précipitation. (Schatz et al., 2004).

L'ajout direct, soit peptide dans chitosane serait à privilégier pour le greffage car les peptides possèdent alors un comportement indépendant de la longueur de leur étiquette (Tableau 8). Le contrôle du rendement serait alors possiblement facilité.

#### 4.4. Conclusion générale et synthèse du chapitre

L'objectif de cette étude était de mener une caractérisation complète de l'interaction entre le chitosane et une étiquette électrostatique conçue pour le greffage protéique. Deux étiquettes constituées de 5 et 10 acides glutamiques ont été synthétisées et marquées avec de la fluoréscéine. Les mesures réalisées en résonance plasmonique de surface, en microcalorimétrie et en fluorescence nous donnent accès à un portrait détaillé et précis de l'interaction ayant lieu entre deux prototypes d'étiquette électrostatique et le chitosane et de la meilleure façon de préparer ces complexes.

Tout d'abord, un tel greffage est très stable à pH 6.0 et l'interaction exothermique est caractérisée par des constantes thermodynamiques d'association élevées. De plus, un effet de coopération est observé sur l'isotherme du peptide le plus court (5E), coopération entre les peptides liés à la chaîne polymérique du chitosane. L'isotherme du peptide le plus long (10E) ne permet pas directement d'observer une coopération, mais la comparaison avec celui du peptide de même longueur mais non marqué souligne quelques différences qui suggèrent une coopération entre peptides marqués.

La réussite du greffage a également été vérifiée par observation de la décoloration des peptides impliqués dans des complexes; le passage d'une couleur jaune intense à une couleur orange pâle confirme l'association en dimères des fluorophores liés à la surface du chitosane, association que suggéraient les mesures microcalorimétriques.

Finalement, cette association en dimères mène à l'auto-extinction des fluorophores, c'est-à-dire à la perte presque totale de la fluorescence des fluoréscéines associées avec ses voisines. Cet effet a permis d'étudier différentes techniques de formation des complexes et d'émettre des hypothèses sur les mécanismes régissant ceux-ci. Le procédé à privilégier semble être l'ajout en une injection de peptide dans le chitosane, afin d'atteindre la meilleure stabilité du peptide sur le chitosane et d'éviter la

précipitation des complexes. Grâce à cette technique, une proportion de 83 à 42 peptides peuvent être adjoints à chaque chaîne de chitosane suivant le type de peptide.

## **5. Chapitre 5. Développement d'une méthode de séparation des nanoparticules ADN/chitosane**

### **5.1. Contexte et introduction**

Les avantages des particules d'ADN/chitosane pour des applications de livraison de gène ou plus généralement pour l'ingénierie tissulaire sont connus (biocompatibilité, capacité des cellules à défaire le complexe pour récupérer l'ADN, etc.) et sont déjà exploités dans le domaine. La formation spontanée du complexe ADN/chitosane est un de ces avantages. En effet, à partir du moment où les conditions de pH sont satisfaisantes ( $\text{pH} < \text{pK}_a$ ), la mise en présence d'ADN et de chitosane aboutira à leur complexation et à l'encapsulation d'ADN par les chaînes du chitosane. Il a même été démontré que pour un pH de 7.4, donc supérieur au  $\text{pK}_a$  du chitosane, les nanoparticules se forment toujours avec un transfert de protons vers le chitosane (communication personnelle, Pei Lian Ma).

En général, ces particules sont formées dans un excès de chitosane (N : P de 5 très souvent) pour s'assurer que l'ADN est bien encapsulé et donc protégé par le chitosane. Le chitosane non impliqué dans les complexes reste donc en solution dans le milieu, ce qui peut être problématique pour certaines applications. En particulier, si un greffage de protéines à la surface des nanoparticules est souhaité afin de modifier leurs propriétés, la protéine d'intérêt pourrait venir s'adsorber sur les chaînes de chitosane libre et ainsi diminuer la quantité de nanoparticules fonctionnalisées. Ceci est d'autant plus dommageable que les peptides sont onéreux.

Le but poursuivi dans ce chapitre est donc de développer un procédé d'extraction des nanoparticules, c'est-à-dire de séparation des nanoparticules du chitosane libre non impliqué dans des complexes ADN/chitosane.

Les objectifs sont les suivants :

- Développer un procédé simple et ayant un bon rendement

- Être capable de récupérer les particules après passage par toutes les étapes du procédé sans agrégation ou modification de leur composition et structure
- Pouvoir resuspendre ces nanoparticules dans de l'eau

La centrifugation est le procédé le plus utilisé dans la littérature pour effectuer ce type de séparation (Bhattarai et al., 2008; Grenha et al., 2007; Janes et al., 2003; Leong et al., 1998; Z. Liu et al., 2007; Mao et al., 2001). Ce mode opératoire est particulièrement adapté pour une telle application du fait de la grande différence de densités et de masses molaires entre le chitosane, l'ADN et les particules. Un ordre de grandeur des densités « flottées » (buoyant density) dans le sucrose peut être donné pour les deux composants. La densité flottée est mesurée à l'aide d'une centrifugation dans un gradient échelonné; la densité de la couche dans laquelle sédimente le composé est appelée densité flottée de ce dernier. L'ADN sous forme de plasmide a une densité flottée variable, mais dans le cas de petits plasmides ( $< 10,000$  paires de base), sa valeur est comprise entre 1.10 et 1.17 sous forme compacte (Katz et al., 1977). Cette valeur est très sensible au repliement du plasmide et à toutes les transformations qui peuvent l'affecter. Pour le chitosane, deux sources concordantes soulignent que la densité flottée des polysaccharides et même des polymères est légèrement inférieure à celle de l'ADN pour une valeur comprise entre 1.0 et 1.10 (Ralston, 1993; Vauthier et al., 1999). Pour ce qui est des nanoparticules, la condensation du chitosane sur le plasmide engendrera un composé dont la densité sera supérieure, voire très supérieure à celle de ses composants.

Dans le cas de la livraison de principes actifs (« drug delivery »), la centrifugation est utilisée pour isoler les molécules non encapsulées et ainsi déterminer par différence la quantité complexée dans les particules (Bhattarai et al., 2008; Grenha et al., 2007; Janes et al., 2003; Z. Liu et al., 2007). Une centrifugation à haute vitesse, avec parfois un dépôt de glycérol ou de sucrose dans le fond du tube, est réalisée pour faire sédimenter les nanoparticules et éventuellement les lyophiliser par la suite. Cependant, dans ces cas de figure, les particules sont inutilisables après ultracentrifugation car elles

précipitent. Il est alors impossible de les réutiliser comme souhaité le faire dans un procédé de greffage protéique.

Leong et Mao ont présenté dans leurs publications respectives une procédure d'ultracentrifugation visant à séparer les complexes ADN/chitosane (Leong et al., 1998; Mao et al., 2001). La grande différence avec les méthodes précédemment citées réside dans l'ajout d'un gradient de centrifugation composé de sucrose et utilisé pour empêcher la précipitation des complexes. Cette étape est suivie d'une dialyse du sucrose pendant 3 heures.

Il est donc indispensable tout d'abord d'être en mesure de localiser et de suivre tout au long des étapes du procédé les particules dans les tubes de centrifugation. Pour ce faire, le chitosane et/ou l'ADN ont été marqués de façon préliminaire à toute manipulation. De plus, différentes mises au point ont été menées pour rendre le procédé optimal dans toutes ses étapes (centrifugation par gradient, dialyse, etc.). Enfin, le rendement a été quantifié à l'aide de plusieurs techniques.

## **5.2. Matériel et Méthodes**

### **5.2.1. Le chitosane**

Le chitosane utilisé (référence PCCH00075 et CHEM 2461) a été fourni par Biosyntech (Laval, QC). Il se caractérise par un poids moléculaire de 200 kDa et un DDA de 80% et a été dissous dans de l'eau acidifiée avec 22 mM de HCl pour atteindre un ratio de protonation des glucosamines de 1:1 et une concentration de 4.5 mg/ml.

### **5.2.2. L'ADN**

L'ADN utilisé dans les expériences d'ultracentrifugation a été produit et purifié grâce au kit Plasmid Mega Kit de la compagnie Qiagen (Düsseldorf, Allemagne). Toutes les abréviations des tampons se rapportent aux dénominations du kit utilisé.

#### 5.2.2.1. Culture bactérienne et récolte des plasmides

Une colonie bactérienne produisant le plasmide pEGFR-Luc a été inoculée dans 5 ml de milieu de culture LB pendant 8 heures à 37°C et sous forte agitation. 500  $\mu$ l ont ensuite été prélevés de la culture et dilués dans 500 ml de milieu LB dans un flacon de 2 litres. Le tout a été placé à 37°C pendant 12 heures sous forte agitation.

La récolte de la culture a été réalisée par centrifugation à 6,000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot récolté a alors été resuspendu dans 50 ml de tampon P1, suivi d'un ajout de 50 ml de tampon P2. Après une agitation manuelle très forte pendant 30 secondes environ, le mélange a été laissé au repos pendant 5 minutes à température ambiante.

50 ml de tampon P3 refroidi à 4°C ont ensuite été versés sous une agitation manuelle très forte. Après incubation dans la glace pendant 30 minutes, une étape de centrifugation à 20,000 g pendant 30 minutes à 4°C a permis de récolter le surnageant contenant les plasmides d'ADN. Celui-ci a été centrifugé de nouveau à 4°C pendant 15 minutes à 20,000 g, puis récolté.

#### 5.2.2.2. Purification de la récolte

La colonne gravitaire a été tout d'abord équilibrée avec 35 ml de tampon QBT, puis le surnageant a été passé dans celle-ci. Une fois la colonne lavée avec 20 ml de tampon QC, 35 ml de tampon QF ont été ajoutés au milieu purifié pour éluer l'ADN.

A l'aide d'un ajout de 24.5 ml d'isopropanol conservé à température ambiante, l'ADN a été précipité et récolté par centrifugation à 15,000 g pendant 30 minutes à 4°C. Ce culot a été ensuite lavé avec 7 ml d'éthanol 70% et centrifugé de nouveau pendant 10 minutes à 15,000 g et à 4°C. Le surnageant a été soigneusement retiré et le précipité a été laissé à l'air libre pendant 20 minutes pour séchage. Enfin, ce dernier a été resuspendu à 1  $\mu$ g/ $\mu$ l dans l'eau stérile.

### 5.2.3. Marquage du chitosane à la rhodamine B

Le chitosane a été marqué avec un fluorophore fréquemment utilisé pour les marquages biologiques, la rhodamine B aussi appelée Rhodamine 610 ou Basic Violet. Sa structure est présentée sur la figure 38.

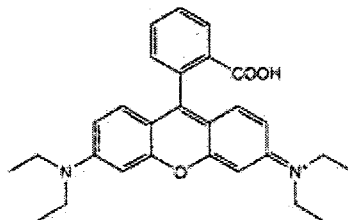


**Figure 38. Structure de la rhodamine B utilisée comme marqueur du chitosane**

Ses caractéristiques spectrales sont les suivantes : longueur d'onde d'excitation 543 nm et d'émission 580 nm, cutoff à 570 nm.

Pour mémoire, la valeur du cutoff est un paramètre du filtre spectral. Tout le rayonnement émis à des longueurs d'onde inférieures à la valeur du cutoff sera éliminé. Il s'agit en fait de la fréquence optique de coupure du filtre passe haut de l'appareil. Ceci permet ainsi d'éliminer dans la mesure tout le rayonnement parasite issu de l'excitation par l'appareil (ici l'excitation est réalisée par une émission de rayonnement ayant 543 nanomètres comme longueur d'onde).

La synthèse du chitosane-rhodamine est réalisée à partir d'un dérivé de la rhodamine, la rhodamine isothiocyanate (Sigma, Oakville, ON, Canada). En effet, ce dérivé possède une fonction isothiocyanate ( $-N=C=S$ ) sur son cycle aromatique individuel, fonction réactive envers les amines déprotonées du chitosane.

Une solution de chitosane 1% (w/v) est préparée sous agitation dans un mélange d'eau et d'acide acétique. Le ratio acide acétique : glucosamine est alors de 70% dans un volume de 20 ml. Le lendemain, un volume de 20 ml de méthanol anhydre est ajouté sous agitation constante pendant 3 heures. La solution est ensuite dégazée par l'injection de  $N_2$  pendant 20 minutes.

Un volume de 5.8 ml d'une solution de rhodamine 6% (w/w) dans le méthanol est ensuite ajouté rapidement au mélange avec précaution, la rhodamine étant toxique. Ce dernier est ensuite placé à 4°C pendant exactement 17 heures.

Environ 3 ml de NaOH 1M sont ajoutés au mélange pour atteindre un pH de 11. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 10,000 g et le surnageant est prélevé. Le précipité est quant à lui redissous dans 50 ml d'eau déionisée.

Une fraction d'un millilitre est extraite du surnageant et une lecture de son absorbance à 556 nanomètres est réalisée. La procédure précédente est répétée tant que l'absorbance est supérieure à 0.01.

Le taux de greffage est évalué par une lecture de l'absorbance à 556 nanomètres ( $\epsilon = 87000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) d'un millilitre de chitosane modifié et redissous dans l'eau.

Enfin, les 50 millilitres de chitosane marqué sont lyophilisés pendant 3 jours et conservés à 4°C.

#### 5.2.4. Marquage de l'ADN au Cy3 ou Cy5

L'ADN a été marqué en utilisant le kit Labeling Cy3/Cy5 fourni par Mirus (Madison, WI).

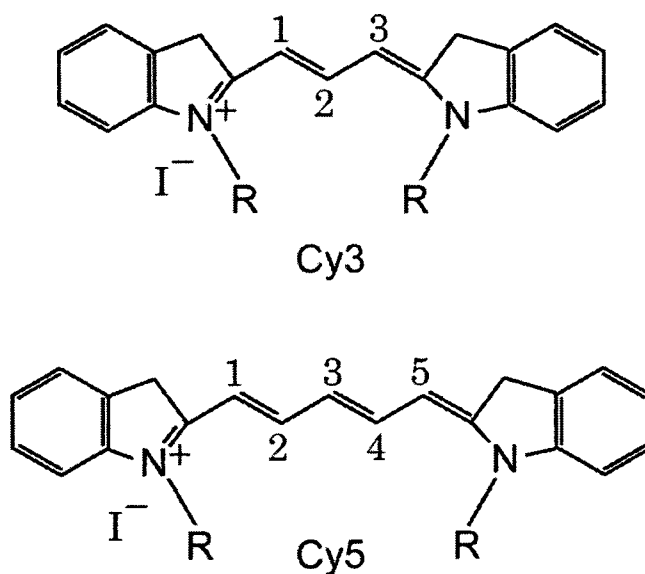


Figure 39. Structures des marqueurs fluorescents Cy3 et Cy5

Après dilution dans de l'eau stérile, un tampon de marquage (dilution 1/10) a été ajouté suivi par 50  $\mu\text{g}$  d'ADN. Enfin, le fluorophore a été rajouté dans une proportion de 10  $\mu\text{l}$  pour 50  $\mu\text{g}$  d'ADN (0.2 : 1). Après une incubation de 3 heures, l'ADN a été précipité par ajout d'un volume de NaCl 5M et de deux volumes d'éthanol glacial 100% et laissé incubé toute la nuit à 4°C.

Le mélange a été centrifugé pendant 20 minutes à 21,000 g et à 4°C dans une microcentrifugeuse MicroCl 21R (Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA). La phase aqueuse a été retirée et le précipité a été relavé avec 500  $\mu\text{l}$  d'éthanol 70% et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions que précédemment. Après extraction de l'éthanol et séchage à l'air du précipité, l'ADN marqué a été resuspendu dans l'eau et aliquoté à 0.33 mg/ml. Le taux de greffage a été testé par UV, il était de 1 fluorophore pour 110 bases pour les différents lots marqués.

#### 5.2.5. Mesure de la fluorescence

La fluorescence a été mesurée en utilisant un lecteur de microplaques Spectramax Gemini XS de Molecular Devices (Sunnyvale, CA).

#### 5.2.6. Mesure des diamètres hydrodynamiques par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)

Les diamètres des nanoparticules avant et après séparation ont été mesurés par DLS. Pour respecter les conditions requises pour des mesures reproductibles, un volume de 200  $\mu\text{l}$  a été prélevé des échantillons et dilué dans 800  $\mu\text{l}$  de MES pH 6.0. La force ionique finale des échantillons était de 20 mM. Ces derniers ont été filtrés et testés 5 fois chacun.

Les diamètres hydrodynamiques ont été obtenus par interpolation des courbes obtenues puis moyennés.

#### 5.2.7. Formation de nanoparticules

L'ADN (marqué ou non) a été dilué dans de l'eau déionisée à une concentration finale de 0.033 mg/ml. La même quantité d'ADN a été ajoutée à chaque dilution de chitosane. L'ultracentrifugation reconcentre les nanoparticules, ce qui pourrait avoir

comme effet de les agréger. Il a donc été choisi de travailler à une dilution plus grande que pour des applications de transfection cellulaire par exemple. De plus, des mesures ont montré que la distribution de taille des complexes formés à cette dilution était plus homogène que dans les cas plus concentrées (communication personnelle, Pei Lian Ma).

Des volumes égaux de chitosane et d'ADN (250  $\mu$ l chacun) ont été mélangés afin d'obtenir des ratios N : P (amine de chitosane versus phosphate de base d'ADN) de 20, 5, 2 et 0.5 (voir Tableau 9). Les échantillons avec un N : P de 20 serviront de témoin positifs pour le chitosane en grande majorité et ceux avec un N : P de 0.5 de témoin négatif, en considérant que tout le chitosane sera sous forme de complexes. Le tableau suivant récapitule les concentrations de chacun des constituants dans le milieu pour les différents N : Ps.

**Tableau 9. Concentrations de chitosane et d'ADN dans les différents milieux**

| N : P | Concentration massique |                 | Concentration molaire |              |
|-------|------------------------|-----------------|-----------------------|--------------|
|       | Chitosane              | ADN             | Glucosamines          | ADN          |
| 0.5   | 5.6 $\mu$ g/ml         | 16.5 $\mu$ g/ml | 26.5 $\mu$ M          | 53.3 $\mu$ M |
| 2     | 22.5 $\mu$ g/ml        | 16.5 $\mu$ g/ml | 106.6 $\mu$ M         | 53.3 $\mu$ M |
| 5     | 56.3 $\mu$ g/ml        | 16.5 $\mu$ g/ml | 267.6 $\mu$ M         | 53.3 $\mu$ M |
| 20    | 225 $\mu$ g/ml         | 16.5 $\mu$ g/ml | 1.1 mM                | 53.3 $\mu$ M |

#### 5.2.8. Centrifugation simple

La première expérience de centrifugation a été menée avec une microcentrifugeuse Micromax (Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA) à 21,000 g pendant 3 heures dans des tubes de 1 ml avec du chitosane marqué à la rhodamine.

Des fractions situées à diverses hauteurs dans le tube ont été pipetées et testées pour observer si une éventuelle discontinuité dans la fluorescence était apparue dans le tube suite à la centrifugation.

#### 5.2.9. Filtration de particules

Une solution de nanoparticules de N : P 5 a été filtrée à la seringue à travers un filtre en PVDF 0.1  $\mu\text{m}$ . Le chitosane était marqué à la rhodamine et la fluorescence du filtrat a été mesurée.

#### 5.2.10. Ultracentrifugation à angle fixe

L'expérience d'ultracentrifugation à angle fixe a été réalisée sur l'ultracentrifugeuse Beckman Optima Max (Fullerton, CA) avec le rotor TLA- 110. La vitesse de rotation était de 25,000 RPM (35,000 g) pendant 20 minutes à 20°C.

Les tubes utilisés étaient de type « thick-wall » et de volume 1.5 ml (Beckman, Fullerton, CA, référence 357 448).

Lorsqu'une couche de sucrose est utilisée, celle-ci était constituée de 100  $\mu\text{l}$  de sucrose 55% (w/w) et a été déposée à la pipette au fond du tube avant ajout de l'échantillon.

#### 5.2.11. Préparation des gradients d'ultracentrifugation

Des solutions de sucrose 35% et 55% (w/w) ont été fraîchement préparées dans de l'eau ou du tampon (MES 6.0, 25 mM) avant chaque centrifugation en rotor à godets mobiles. Ces concentrations ont été choisies par rapport à la densité flottée de l'ADN et du chitosane. En effet, une solution de 35% (w/w) possède une densité de 1.1513 ce qui est très proche de la densité flottée de l'ADN. La couche de 55% est quant à elle beaucoup plus dense (1.2575). Les nanoparticules devraient donc sédimenter à l'interface de ces deux couches ou dans la couche de 55% alors que le chitosane libre restera dans le surnageant. S'il y a présence d'ADN libre, celui-ci restera en solution dans la couche de 35%.

Ces couches ont été déposées avec soin dans le tube à la pipette. La couche de sucrose se dépose en pipetant très doucement le sucrose le long du tube et en s'approchant le plus près possible de l'interface. Ainsi, le mélange entre couches

adjacentes est évité et on obtient un gradient avec des paliers bien délimités. Cela permet aux couches de se déposer les unes sur les autres sans mélange et d'éviter une équilibration du gradient. Les couches déposées avaient toutes un volume de 1 ml. Enfin, l'échantillon a été déposé au dessus des couches de sucrose avec les mêmes précautions.

Il est à noter que la plupart des expériences ont été réalisées en pipetant les couches pour les déposer, mais une des optimisations finales du procédé a consisté à utiliser une seringue de 1 ml.

La figure 40 montre l'ordre de dépôt des couches et leurs volumes respectifs ainsi que les volumes prélevés.

#### 5.2.12. Ultracentrifugation à godets mobiles – Ultracentrifugation par gradient (step gradient)

Les manipulations d'ultracentrifugation par gradient ont été menées sur le même appareil que celles en rotor fixe, mais avec un rotor dit à godets mobiles de référence MLS 50. Les tubes avaient une capacité de 3.2 ml (Beckman, Fullerton, CA, ref. 358 742). La vitesse de rotation était de 30,000 RPM (35,000 g) pendant 20 minutes pour les premières expériences puis une heure à 15°C. Cette vitesse de rotation est choisie de telle façon à obtenir une bonne séparation de composants en un délai raisonnable sans risquer d'agréger les particules centrifugées. De plus, ces paramètres ont été choisis en accord avec ceux de Mao et Leong (Leong et al., 1998; Mao et al., 2001).

##### 5.2.12.1. Étude de la sédimentation de l'ADN et du chitosane libres dans le gradient de sucrose

Des expériences de contrôle ont été réalisées pour vérifier que ni l'ADN ni le chitosane sous leur forme libre ne sédimentait dans le gradient. Les paramètres opératoires étaient les mêmes que ceux des expériences de test ; les concentrations d'ADN puis de chitosane, tous deux marqués, étaient de 7.5  $\mu\text{g/ml}$  et de 225  $\mu\text{g/ml}$  respectivement, ce qui correspond aux concentrations utilisées lors de la préparation des

nanoparticules de ratio N : P 20. Le temps de centrifugation a été allongé de 1 à 3 heures pour le test de l'ADN libre et marqué.

#### 5.2.12.2. Test de sédimentation des nanoparticules ADN/chitosane

Les fractions prélevées et dénotées « surnageant », « 35% », « interface 35/55 » et « 55% » ainsi que leurs volume respectifs sont présentés à la figure 40. La fluorescence de toutes ces fractions a été mesurée ensuite.

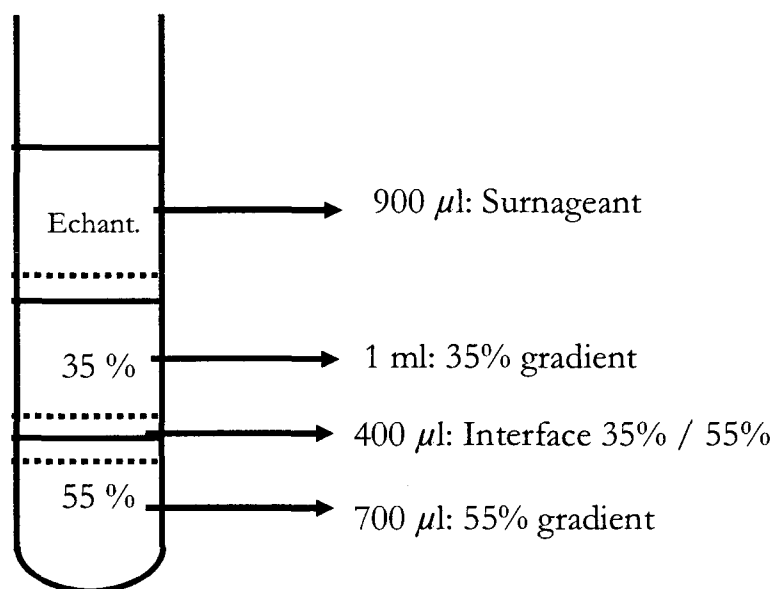


**Figure 40. Répartition des fractions prélevées pour les tests en fluorescence**  
 Les lignes pleines correspondent aux dépôts des différentes couches (de volume 1 ml pour chaque)  
 et les lignes pointillées renvoient aux fractions prélevées de volume variable.

#### 5.2.13. Dialyse du sucrose

Le sucrose présent dans les fractions doit ensuite être dialysé. Cette étape a été réalisée à l'aide du kit Float A Lyzer 1 ml (Spectrum, Rancho Dominguez, CA). La membrane de la capsule possédait un cutoff de 30 kDa. Les échantillons à dialyser, de volume 1 ml, ont été placés dans la capsule et ont été dialysés dans 4 litres d'eau

déionisée pendant une durée variable et optimisée lors du projet (voir section Résultats et Discussion).

Les tests avec les nanoparticules dans le sucrose ont été réalisés en mélangeant une quantité égale de sucrose 15% (w/w) et de nanoparticules préparées comme précédemment et diluées avec 500  $\mu$ l d'eau. Le volume final était de 1 ml. Toutes les valeurs ont été corrigées par leurs dilutions sur les spectres UV/Vis.

Le sucrose absorbant dans l'UV dans la gamme 250-300 nm, des spectres UV ont été acquis sur un spectrophotomètre UNICO S 2100 U (BioRad, Hercules, CA) afin de s'assurer de la disparition du sucrose.

### **5.3. Résultats et discussion**

#### **5.3.1. Tests préliminaires**

Des premiers tests ont été menés pour essayer de simplifier au maximum le protocole proposé par Leong et Mao (Leong et al., 1998; Mao et al., 2001).

Le tout premier test a donc été de tenter de faire sédimenter les nanoparticules suspendues dans l'eau avec une centrifugation simple. Différentes fractions ont été prélevées pour observer si une discontinuité dans la fluorescence était apparue dans le tube suite à la centrifugation, mais aucun résultat concluant ne fut observé, la distribution de fluorescence est demeurée uniforme indiquant que ce type de centrifugation ne suffit pas à séparer les nanoparticules du chitosane libre.

Ensuite, une solution simple aurait été de séparer le chitosane libre par filtration. Grâce à une seringue, les nanoparticules ont été poussées à travers un filtre à 0.1  $\mu$ m en PVDF et le filtrat a été récupéré et testé. Les résultats sont présentés dans le Tableau 10.

Un contrôle a été réalisé en filtrant du chitosane libre et marqué à la rhodamine. Les résultats sont également présentés dans le Tableau 10.

**Tableau 10. Fluorescence dans le filtrat pour les filtrations de nanoparticules et de chitosane libre**

|                 | Concentration de chitosane en solution | Fluorescence dans le filtrat en RFUs | Fluorescence du témoin non filtré en RFUs | Proportion de chitosane dans le filtrat |
|-----------------|----------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Nanoparticules  | 22.5 $\mu\text{g/ml}$                  | 1.316                                | 2142.1                                    | < 1%                                    |
| Chitosane libre | 22.5 $\mu\text{g/ml}$                  | 1935.6                               | 2183                                      | 89%                                     |
|                 | 56.3 $\mu\text{g/ml}$                  | 2348.7                               | 5151                                      | 46%                                     |

Il est à noter que l'expérience a également été réalisée avec du chitosane libre non marqué et les proportions de chitosane dans le filtrat étaient proches de 99% (résultats non montrés).

L'intégralité du chitosane libre ne traverse pas le filtre, il y a interaction entre ce dernier et le PVDF. La proportion de fluorescence perdue est encore plus accentuée pour les nanoparticules puisque ni ces dernières ni l'intégralité du chitosane libre ne traversent le filtre. Du fait que le chitosane non marqué n'adhère pas au filtre, nous avons posé comme hypothèse que la rhodamine est à l'origine de la rétention par le filtre.

Comme on peut l'observer sur la figure 38 présentant la structure de la rhodamine, cette dernière est constituée de nombreux cycles aromatiques ce qui la rend hydrophobe. Or, le PVDF est également hydrophobe. Nos résultats suggèrent donc que le chitosane n'interagit pas avec le filtre du fait de son caractère hydrophile alors que des interactions hydrophobes fortes entre rhodamine et PVDF ont lieu, diminuant de manière marquée les quantités de chitosane libre et de nanoparticules dans le filtrat

### 5.3.2. Extraction par ultracentrifugation

#### 5.3.2.1.Extraction avec le rotor à angle fixe TLA-110

La première expérience a été réalisée avec le rotor à angle fixe de l'ultracentrifugeuse. Comme on peut le voir sur la figure 41, les nanoparticules ont précipité sur les parois du tube, formant une tache violette insoluble. La fluorescence dans le surnageant a bien entendu décru, mais les nanoparticules n'ont pas pu être resuspendues par la suite même après sonication ou chauffage à 55°C.

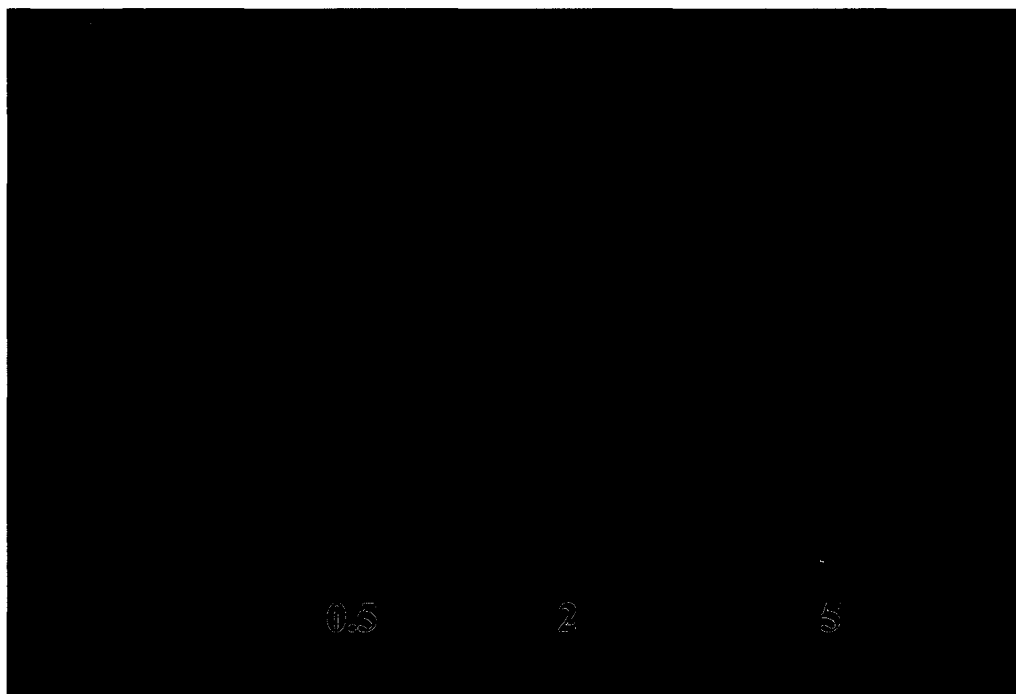


**Figure 41. Précipitation de complexes par ultracentrifugation à angle fixe.**  
Les chiffres sous les tubes correspondent au ratio N :P testé.

Malgré l'impossibilité de récupérer les particules après centrifugation, cette expérience démontre qu'il est possible de séparer les nanoparticules des autres constituants du mélange en raison de leur différence de densité. Le principal problème avec la centrifugation à angle fixe est que les composants qui sédimentent sont entraînés vers la paroi du tube lors du procédé, ce qui, dans le cas des nanoparticules, les abîme et les fait précipiter. D'ailleurs, il est possible d'observer sur les tubes des traînées violettes

le long des parois dues à la sédimentation progressive au cours de la centrifugation des complexes (Figure 41).

Pour éliminer ou tout au moins atténuer ce problème, des solutions à haute teneur en sucrose sont utilisées pour rendre la sédimentation des particules moins éprouvante pour les particules (Z. Liu et al., 2007). Des solutions de glycérol sont parfois également utilisées (Grenha et al., 2007; Janes et al., 2003; Price, 1982). Une couche de ces solutions est déposée au fond du tube pour recueillir les particules sédimentant.

Malheureusement, malgré l'ajout d'une couche de 100  $\mu$ l de sucrose 55% (w/w) dans le fond du tube, aucune différence n'a été remarquée, les traînées sont toujours visibles et les complexes impossible à redissoudre (données non montrées). Comme on peut le voir sur le schéma suivant (Figure 42), le fait d'utiliser un rotor à godets mobiles peut empêcher ce phénomène d'entraînement vers les parois, beaucoup plus qu'un simple ajout de sucrose. C'est cette technique qui est utilisée dans les tests suivants.

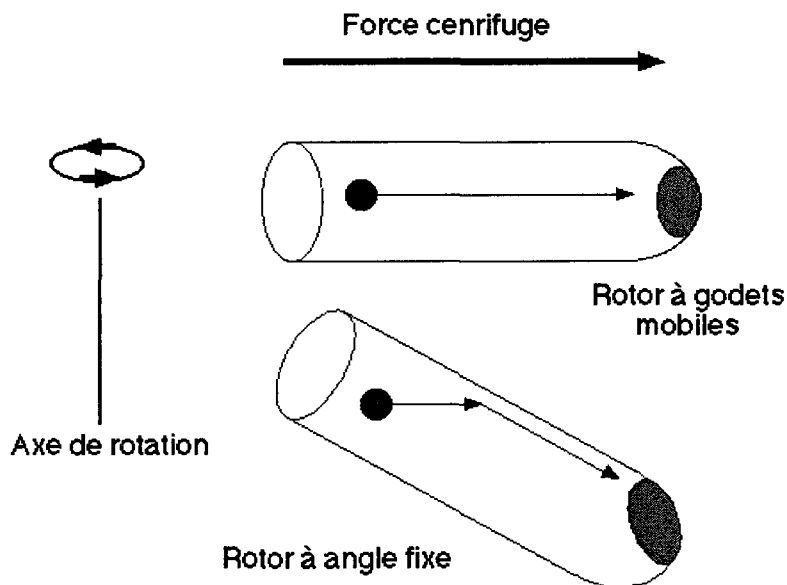


Figure 42. Distribution de particules dans une ultracentrifugation rotor fixe / mobile

<http://www.chimie-biochimie.unoncton.ca/bcb/dg/siitub/centrifugation.html>

### 5.3.3. Séparation avec le rotor à godets mobiles – MLS-50

#### 5.3.3.1. Ultracentrifugation dans un gradient 35/55 par paliers

Ce mode opératoire se rapproche beaucoup de celui décrit par Leong et Mao, même si leur gradient était constitué de 3 couches (15%, 35% et 55%) et le nôtre de seulement deux (35 et 55 %). Cette technique dite de « step gradient » donne de bons résultats pour des centrifugations de durée moyenne et pour des composés dont les densités sont assez éloignées. Dans le cas de longues durées de centrifugation, les différentes fractions de sucrose diffusent rapidement les unes dans les autres pour donner naissance à un gradient linéaire dont il est beaucoup plus difficile d'extraire les composés d'intérêt (Price, 1982; Schachman, 1959).

Les fractions prélevées et dénotées « surnageant », « 35% », « interface 35/55 » et « 55% » sont présentées sur la Figure 40 avec les volumes correspondants.

#### 5.3.3.2. Contrôle 1 - Diffusion de l'ADN libre dans le gradient par paliers

Pour pouvoir s'assurer du bon fonctionnement du procédé et surtout pour pouvoir vérifier que seules les nanoparticules sédimentent au fond du gradient, deux contrôles ont été menés sur les espèces pouvant possiblement se retrouver dans l'échantillon de départ et donc sédimenter lors du procédé : l'ADN libre et le chitosane libre.

Pour le test avec l'ADN, la durée de 3 heures a été choisie pour laisser le temps à l'ADN libre de sédimenter ; dans ce cas l'ADN libre ne reste pas confiné au surnageant, il sédimente dans la couche 35% du gradient (Figures 43 et 44). Le temps a été allongé à 3 heures comparativement à 1 heure dans les autres tests pour s'assurer qu'il ne sédimentera pas plus loin dans le gradient, soit dans les couches d'intérêt pour la purification et récupération de nanoparticules.

Le témoin présenté est un échantillon totalement identique à celui testé par le procédé, mais qui n'a pas été centrifugé.

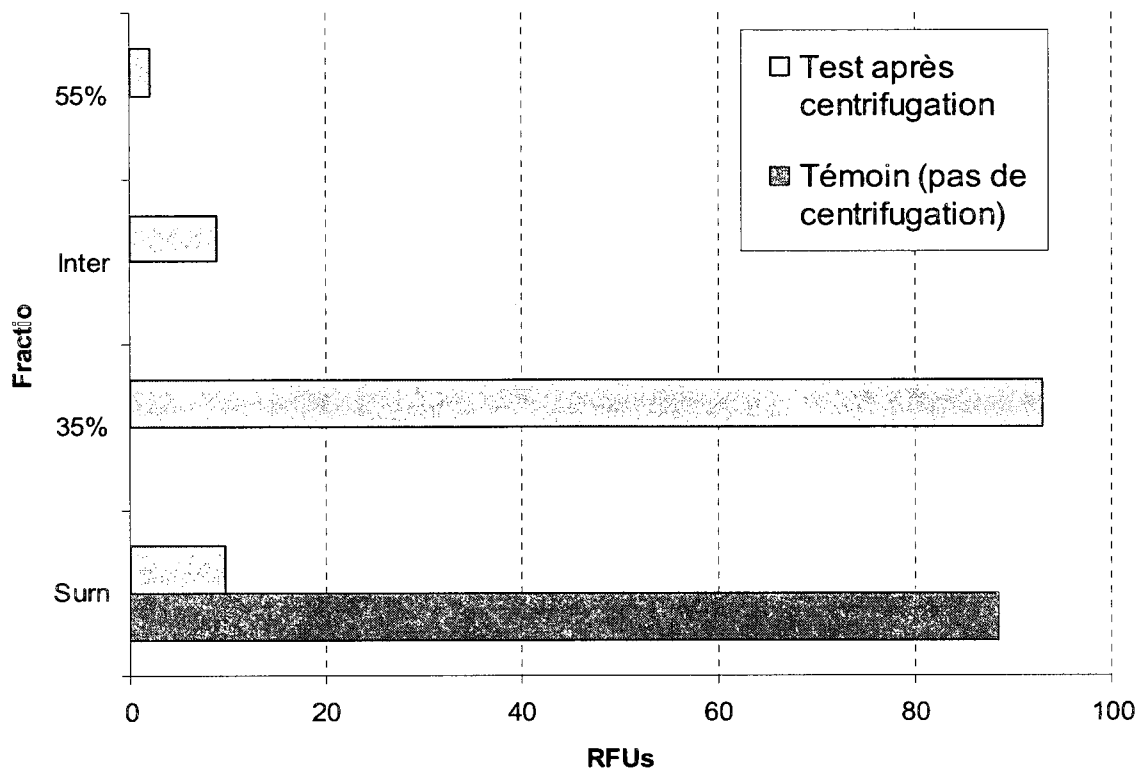


Figure 43. Comparaison des niveaux de fluorescence de l'ADN libre dans les différentes fractions du gradient avec et sans centrifugation. L'expérience a été répétée deux fois. L'ADN libre a été centrifugé pendant 3 heures dans un gradient de sucrose 35 / 55 % à 15°C et à 30,000 RPM.

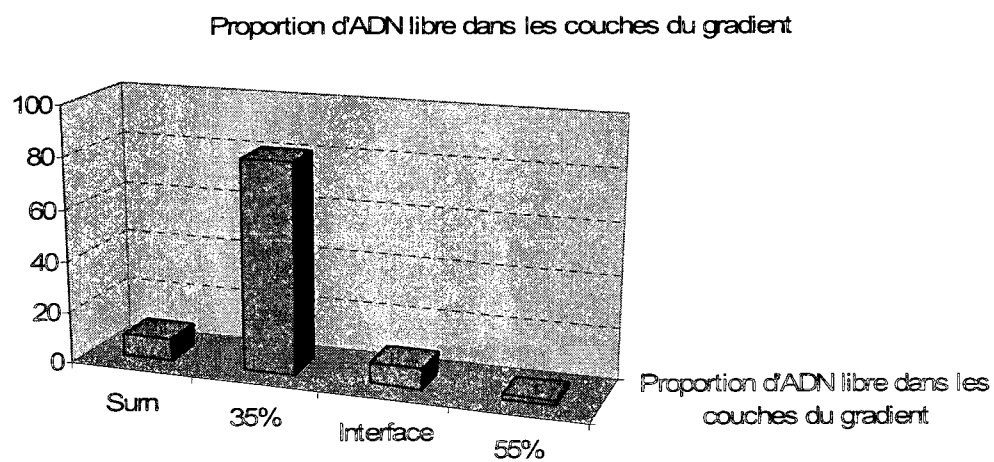


Figure 44. Distribution de l'ADN libre marqué au Cy5 dans le gradient de sucrose

Tout d'abord, il faut remarquer que la somme des fluorescences de l'échantillon vaut 110 comparativement à 90 pour le témoin. Toutefois, cette augmentation peut s'expliquer par la différence de composition de milieu, le sucrose perturbe la mesure optique et augmente légèrement la valeur des fluorescences lues (Price, 1982).

On observe que l'ADN n'est pas allé au-delà de la couche de 35%, ce qui montre que sa densité est tout de même supérieure à celle du chitosane qui reste en majorité dans le surnageant lorsqu'il est libre (voir section 3.2.2.4 suivante). Concrètement, l'ADN se retrouve dans une proportion de seulement 10% dans les couches où sédimentent les nanoparticules (interface et 55%, voir Figure 44). Cette fraction d'ADN présente dans les couches de sédimentation des nanoparticules peut être due à la sédimentation des plasmides, mais elle est plus vraisemblablement la conséquence des perturbations des couches du gradient lors du prélèvement des fractions.

Enfin, il est à noter que l'ADN sédimente dans la couche de sucrose 35%, ce qui lui confère une densité flottée de l'ordre de 1.1513. Cette valeur se situe bien dans l'intervalle donné pour un plasmide, il n'est donc pas étonnant de voir l'ADN sédimenter ici.

#### 5.3.3.3. Contrôle 2 - Diffusion du chitosane libre dans le gradient 35/55

Le même genre de test que pour l'ADN a été réalisé avec le chitosane, l'idée étant toujours de vérifier que le chitosane libre reste confiné dans une partie du gradient suffisamment éloignée des couches inférieures pour qu'on puisse considérer sa sédimentation comme non problématique. Plus précisément, « non problématique » signifie qu'un niveau négligeable de chitosane libre accompagne les nanoparticules dans les fractions où on retrouve ces dernières.

Les résultats sont présentés ci-après dans les figures 45 et 46. Contrairement à l'ADN, il n'y a pas de sédimentation dans une des couches du gradient, le chitosane libre reste dans sa grande majorité dans le surnageant. Une partie sédimente dans la couche de 35%, mais, comme on peut le voir à la figure 46, elle ne représente que 16 % du total et est due en grande partie à la perturbation du gradient lors du prélèvement. La

somme des fluorescences du chitosane rhodamine centrifugé est de nouveau légèrement supérieure à la valeur du témoin pour la raison invoquée pour l'ADN sous forme libre dans la section précédente. Il est à noter que la proportion de chitosane présente dans les dernières couches est inférieure à 1%, ce qui est proche de l'incertitude sur la mesure.

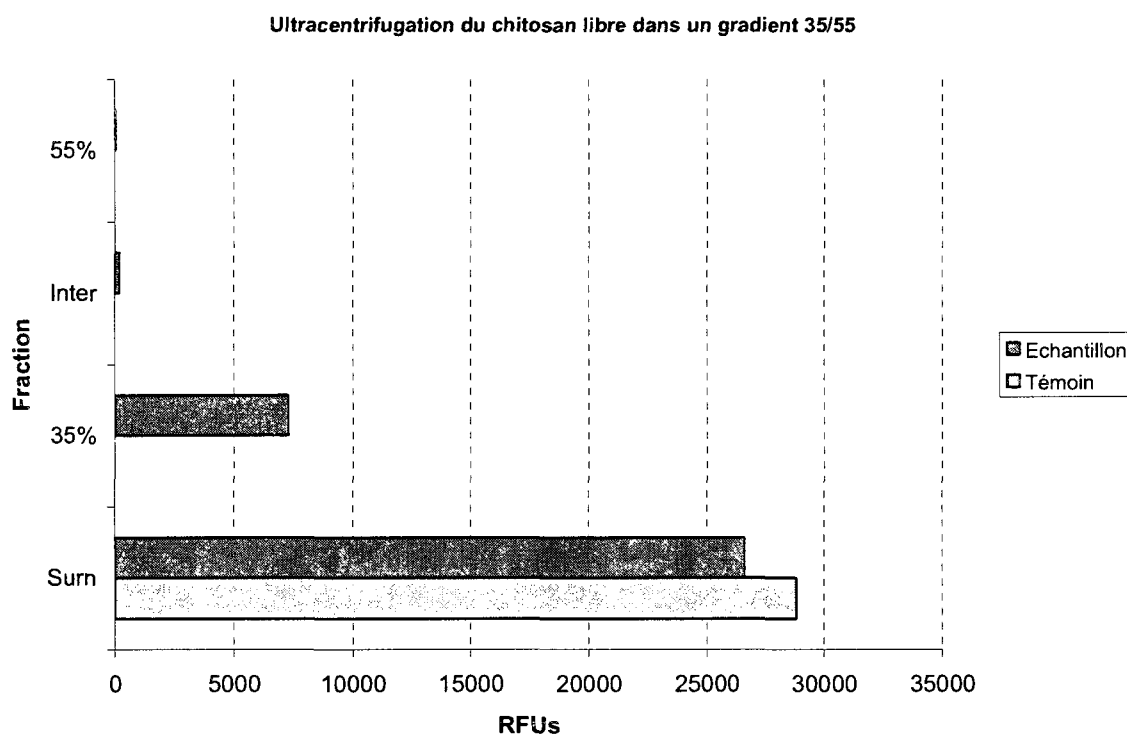


**Figure 45. Comparaison de chitosane rhodamine dans gradient 35/55 avec et sans ultracentrifugation. Le chitosane rhodamine a été centrifugé pendant 1 heure à 30,000 RPM et à une température de 15 °C.**

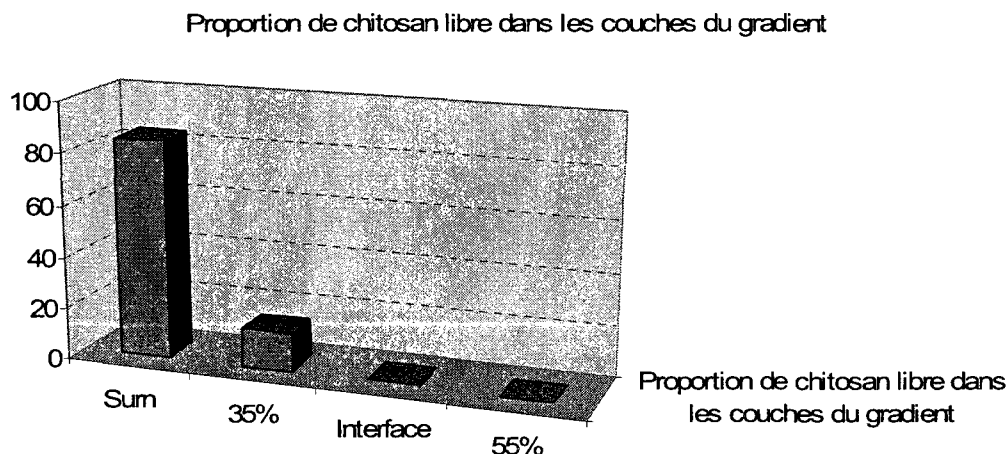


**Figure 46. Proportion de chitosane libre dans les couches du gradient**

Le chitosane possède donc une densité flottée inférieure à celle du sucrose 35%, donc inférieure à 1.1513. Ceci est en accord avec l'intervalle de valeurs proposées pour le chitosane ( $< 1.10$ ).

En conclusion, on ne retrouve que des fractions négligeables d'ADN libre et de chitosane libre dans les fractions dénotées « interface 35/55 » et « grad 55 » qui nous intéressent pour la purification finale des nanoparticules, comme nous le verrons dans les parties suivantes.

#### 5.3.3.4. Optimisation de la durée d'ultracentrifugation

La durée d'ultracentrifugation doit respecter un compromis entre une diffusion limitée des couches du gradient et une sédimentation suffisante des nanoparticules dans celui-ci (Price, 1982; Schachman, 1959). Il s'est avéré qu'après 20 minutes l'essentiel des nanoparticules se retrouvait dans les fractions 35% et à l'interface 35/55. Une partie non négligeable se retrouve également dans le surnageant, une partie des complexes n'a donc pas sédimenté. La figure 47 montre les niveaux de fluorescence mesurés après centrifugation dans les différentes fractions prélevées. La figure 48 présente quant à elle la distribution des nanoparticules dans les couches de sucrose.

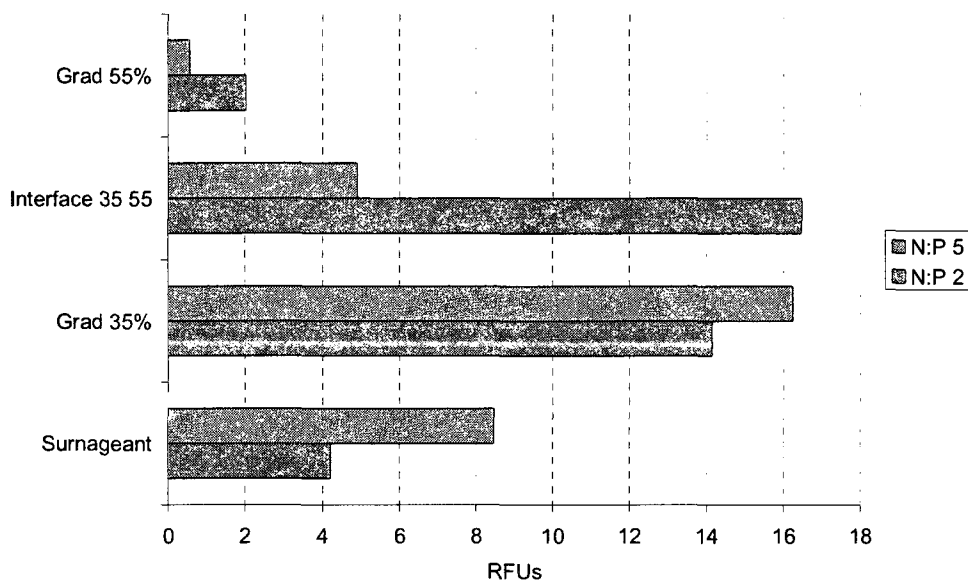


Figure 47. Ultracentrifugation 30,000 RPM, 20 min, 15°C ADN marqué au Cy5

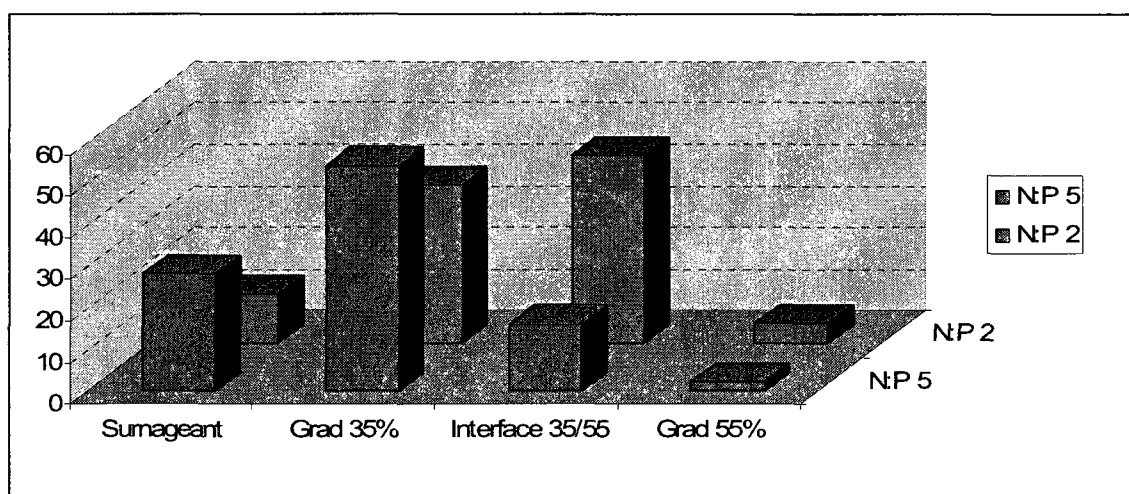


Figure 48. Distribution en pourcentage des nanoparticules après centrifugation de 20 minutes ADN marqué au Cy5

On remarque que la majorité des nanoparticules se retrouvent soit dans l'interface 35/55 dans le cas du N : P 2, soit dans la couche de gradient de 35% pour le cas du N : P 5. L'idéal serait bien entendu d'obtenir une sédimentation complète dans la dernière couche pour récupérer facilement les nanoparticules et se débarrasser tout aussi facilement des contaminants.

La durée de centrifugation a donc été allongée pour obtenir une séparation plus franche des constituants. La figure 49 présente les résultats de centrifugations réalisées dans les mêmes conditions, excepté pour le marquage de l'ADN (marqué au Cy3 et non au Cy5) et pour le temps de centrifugation (1 heure au lieu de 20 min). La barre rouge supplémentaire représente les valeurs d'un témoin réalisé avec du chitosane libre uniquement et non marqué, l'idée étant de supprimer un éventuel bruit de fond. Un histogramme récapitulatif de la distribution finale des nanoparticules dans le gradient est présenté à la figure 50.

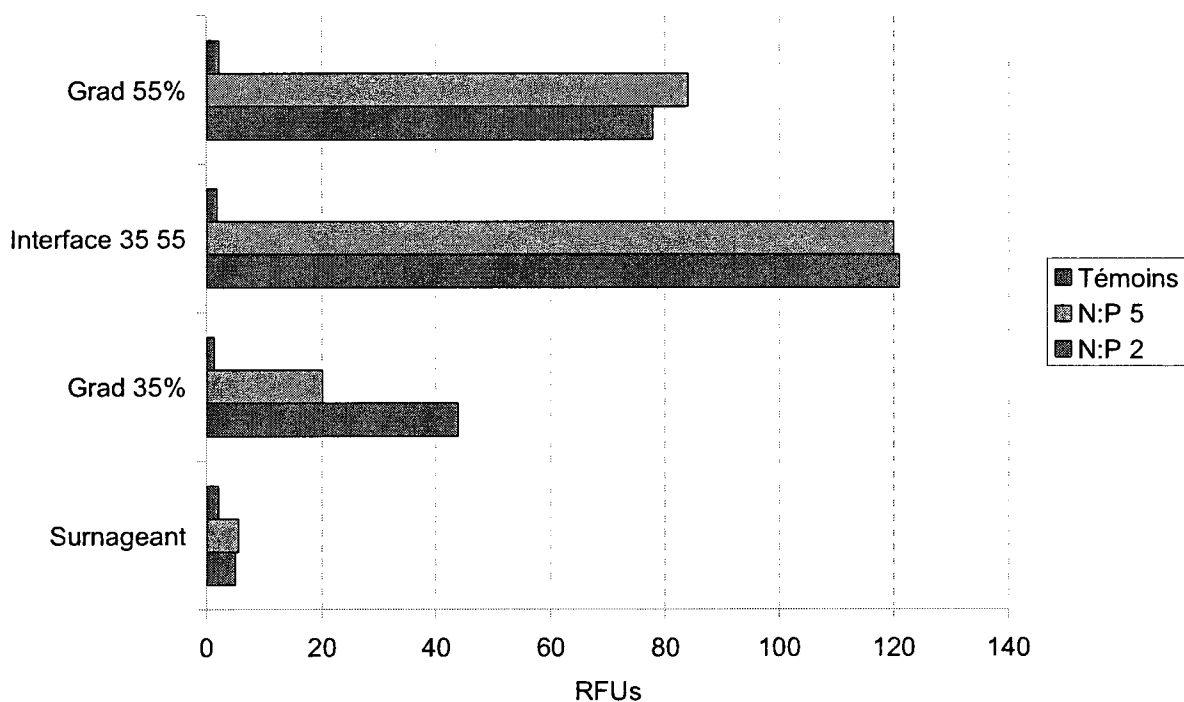


Figure 49. Ultracentrifugation 30,000 RPM 1heure 15°C ADN marqué au Cy3

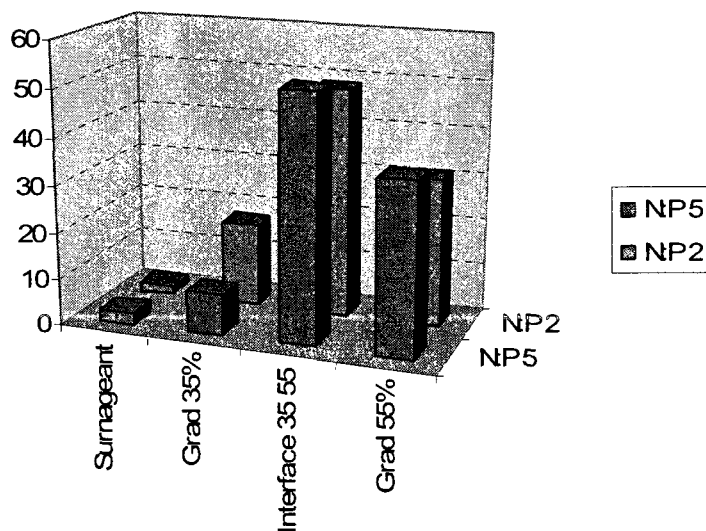


**Figure 50. Distribution en pourcentage des nanoparticules après centrifugation de 1 heure ADN marqué au Cy3**

On peut observer que les quantités d'ADN restant dans le surnageant sont comparables à celle de chitosane libre non marqué, ce qui semble montrer que tout l'ADN a sédimenté. La sédimentation est plus avancée pour une centrifugation d'une heure, ce qui permet d'observer des niveaux de fluorescence importants pour les fractions prélevées au fond des tubes.

Comme la quantité d'ADN ajouté à chaque milieu est restée constante pour chaque élaboration de nanoparticules, la quantité de fluorophores introduits dans le milieu reste la même. Ceci est en accord avec les données de la figure 49, le niveau total de fluorescence reste similaire, soit 230 RFUs pour  $N:P = 5$  et 250 RFUs pour  $N:P = 2$ .

De fait, la majorité des complexes se retrouvent à l'interface 35/55 et le pipetage en introduit une partie dans les fractions adjacentes, tout particulièrement celle de 55%. En fait, lors de manipulations avec un gradient par paliers comme c'est le cas ici, il est préférable de prélever les couches par le bas avec une seringue afin de limiter leur mélange. C'est une amélioration apportée au procédé qui sera appliqué pour les dernières expériences d'ultracentrifugation.

Par ailleurs, la présence de l'ADN dans la couche de 35% observée dans le cas du contrôle d'ADN libre (section 5.3.3.2, Figures 43 et 44) peut permettre de détecter des plasmides libres si un des constituants introduits venait à défaire le chitosane du complexe. Par exemple, si la centrifugation s'avère être un procédé trop brutal pour les particules, alors elles se déferont et l'ADN sera libéré. Il sédimentera alors non pas dans les couches du fond du tube, celles où on retrouvera les nanoparticules intactes, mais dans la couche de 35%. Ainsi, un signal intense de fluorescence dans cette couche sera le signe ou du moins une indication montrant que le procédé a abîmé les nanoparticules. Le test a été réalisé cependant avec une durée de 3 heures, il est donc possible que le signal de fluorescence observé dans cette couche soit moins intense que ce qui a été observé précédemment. La figure 49 de sédimentation des nanoparticules avec ADN marqué ne présente pas cette caractéristique, on peut donc d'ores et déjà conclure que chitosane et ADN sont demeurés complexés. Cette conclusion sera vérifiée par des mesures en diffusion dynamique de la lumière.

Une période de centrifugation de 1 heure a été adoptée pour le procédé final. De plus, comme on peut le voir sur la figure 50, il est nécessaire de prélever les fractions « interface » et « 55% » pour récupérer l'essentiel du produit à purifier. Ces fractions seront ensuite dialysées pour éliminer le sucrose.

Les proportions des différents constituants sont récapitulées dans le tableau 11 suivant. Le procédé d'extraction est donc un procédé a priori valable, il y aura séparation des espèces et ce, comme prévu par les valeurs de densité flottées dans le sucrose de l'ADN et du chitosane. Il s'agit maintenant de pouvoir récupérer les nanoparticules et de les resuspendre dans l'eau, donc finalement de se débarrasser du sucrose.

**Tableau 11. Récapitulatif des proportions d'ADN, chitosane libre et nanoparticules sédimentant dans les dernières couches du gradient de centrifugation (35 000 RPM, 1h pour le chitosane et les nanoparticules, 3h pour l'ADN, 15°C)**

|                 | ADN | Chitosane libre | Nanoparticules     |
|-----------------|-----|-----------------|--------------------|
| Interface 35/55 | 8 % | 0.6 %           | 50 % $\pm$ 2 %     |
| Grad 55         | 2 % | 0.1 %           | 33.5 % $\pm$ 2.5 % |

#### 5.3.4. Purification des fractions – Dialyse du sucrose

##### 5.3.4.1. Détermination des paramètres de dialyse

La première expérience a consisté à retirer du sucrose en solution dans de l'eau pour vérifier que la membrane choisie est adéquate et de déterminer le temps de dialyse nécessaire pour obtenir une bonne pureté. Une solution de sucrose 50% a été dialysée pendant 4 heures et des aliquots du dialysat ont été prélevés à intervalles réguliers. La mesure a été réalisée à 300 nanomètres pour s'éloigner du maximum d'absorbance (260 nm) et éviter ainsi d'avoir à diluer l'échantillon avant les premières mesures.

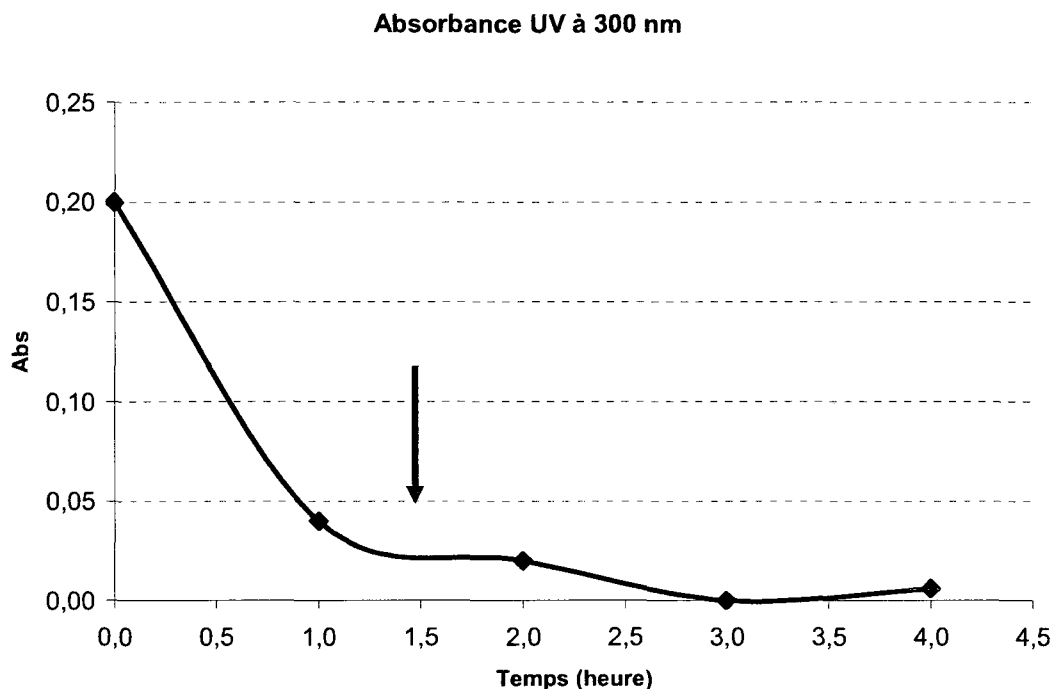


**Figure 51. Mesure de l'absorbance du dialysat de la solution de sucrose pendant la dialyse**  
**La flèche désigne le moment pour lequel l'eau de la cuve a été changée. La mesure a été réalisée à 300 nm.**

Pour maximiser l'efficacité de la dialyse, l'eau a été changée au bout d'une heure. Cependant, ce n'est pas une précaution primordiale vu les grandes différences de volume entre dialysat et cuve. Comme on peut le voir à la figure 51, la décroissance d'absorbance est très marquée dans la première heure et devient négligeable à partir de deux heures et demie. A partir de ces données, on peut calculer la concentration de sucrose encore présente dans l'échantillon après une dialyse de 3 heures.

$$C_{\text{sucrose},3h} = \frac{A_{300nm,3h}}{A_0} \cdot C_0 = \frac{0.01}{0.2} \cdot 50 = 2.5\%$$

Cependant, ce dernier calcul ne tient pas en compte la pénétration d'eau dans la membrane. En effet, le volume dialysé était de 1 ml alors que le volume récolté à la fin de la dialyse était de 1.8 ml, dilution due à la diffusion d'eau dans la membrane.

La correction due à cette dilution donne donc une concentration finale en sucrose de 2.5 %, ce qui représente une diminution d'un facteur 20.

Le kit utilisé semble donc approprié pour purifier le sucrose des solutions aqueuses.

#### 5.3.4.2. Dialyse de nanoparticules non centrifugées

Pour cette expérience, un spectre UV/Vis a été réalisé pour :

- Le sucrose seul à une concentration de 7.5% (w/w)
- Les nanoparticules sans sucrose avant dialyse
- Les nanoparticules non dialysées avec du sucrose (7.5%)
- Les nanoparticules initialement avec sucrose et après 3 heures de dialyse.

On observe sur les spectres suivants (Figure 52) une nette décroissance de l'absorbance dans l'UV après dialyse et les profils des nanoparticules avant et après sucrose sont très similaires avec la bosse à 260 nm qui témoigne de la présence d'ADN. De plus, l'eau est capable d'entrer dans la membrane, ce qui dilue l'échantillon et crée le décalage d'absorbance visible entre les spectres.

### Spectres UV avant et après dialyse

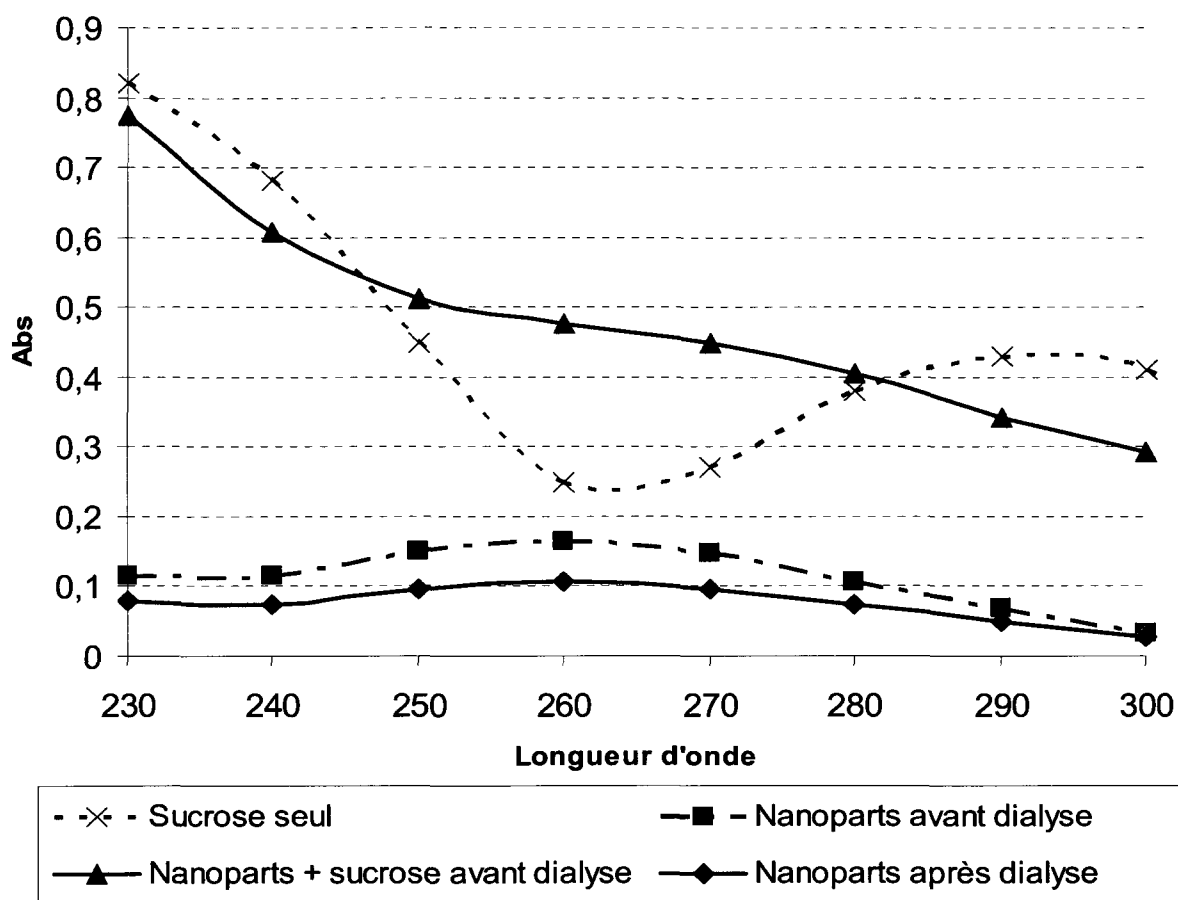


Figure 52. Spectres UV des échantillons avant et après dialyse

#### 5.3.5. Synthèse sur le protocole d'extraction

Tous ces résultats ont mené au protocole suivant :

- Ultracentrifugation en gradient de sucrose par paliers 35% / 55% pendant 1 heure à 30,000 RPM à 15°C
- Dialyse pendant 3 heures contre 4 litres d'eau déionisée des fractions inférieures du gradient de sucrose (« interface 35/55 » et « 55 »)

Pour valider ce protocole, une extraction complète de nanoparticules N : P 2 a été réalisée et suivie grâce au marquage du plasmide au Cy3.

#### 5.3.5.1. Ultracentrifugation

Les résultats sont conformes à ce qui a déjà été observé lors du développement du procédé avec une accumulation des nanoparticules dans les couches inférieures, comme on peut le voir sur le diagramme suivant.

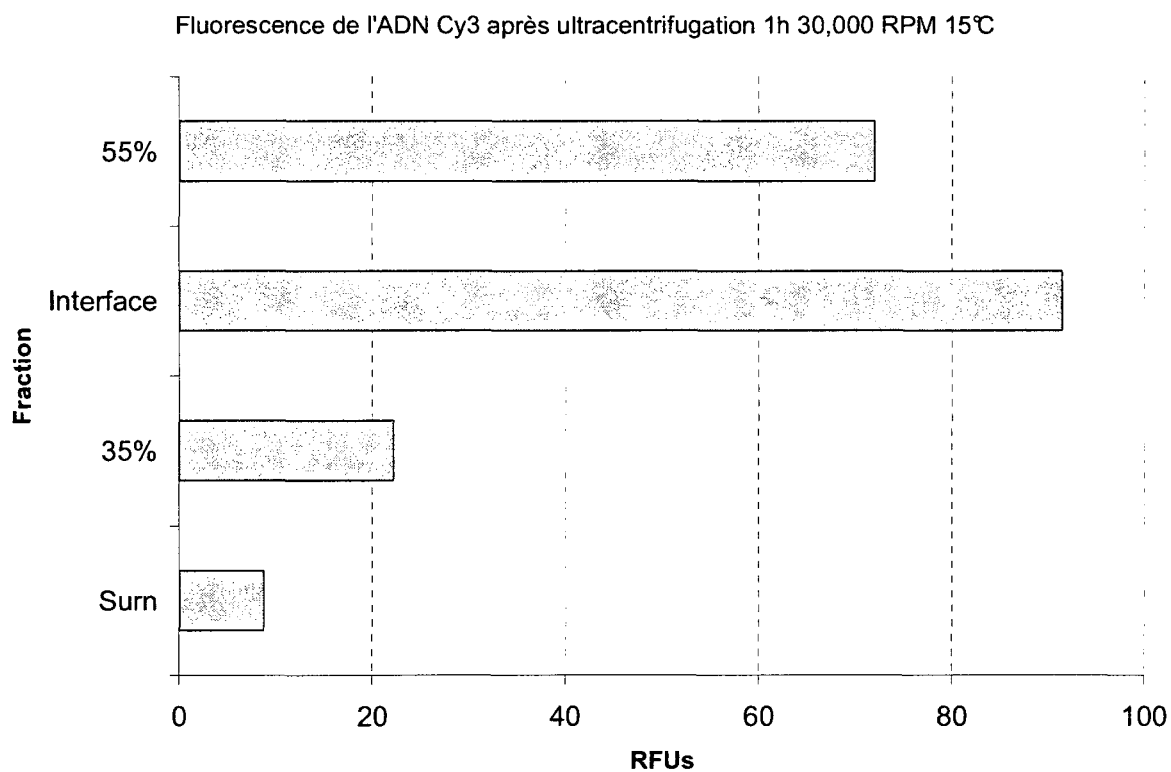


Figure 53. Ultracentrifugation 1h 30,000 RPM 15°C ADN Cy3 pour des nanoparticules N:P 2

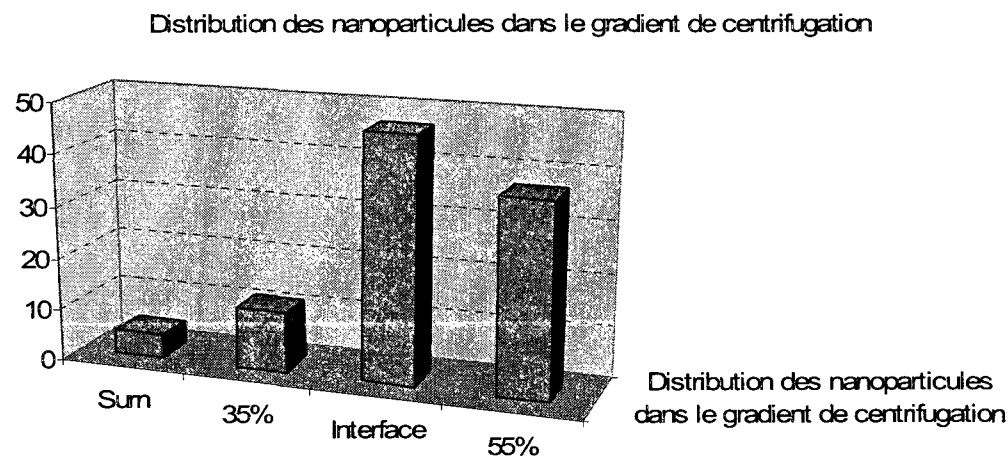


**Figure 54. Centrifugation 35 000 RPM 1h 15°C - Proportion de nanoparticules dans chacune des fractions**

Conformément à ce qui avait été observé auparavant pour les manipulations réalisées avec de l'ADN marqué au Cy3, aucune perte de fluorescence n'est observée. De plus, on peut observer (Figure 54) que la distribution est très similaire à ce qui avait été observé dans les expériences préliminaires d'optimisation du protocole.

Les deux fractions inférieures ont été mélangées et dialysées en même temps. 80% de la fluorescence globale se retrouve dans cet échantillon.

La figure 55 présente un extrait du spectre UV des nanoparticules avant et après dialyse.

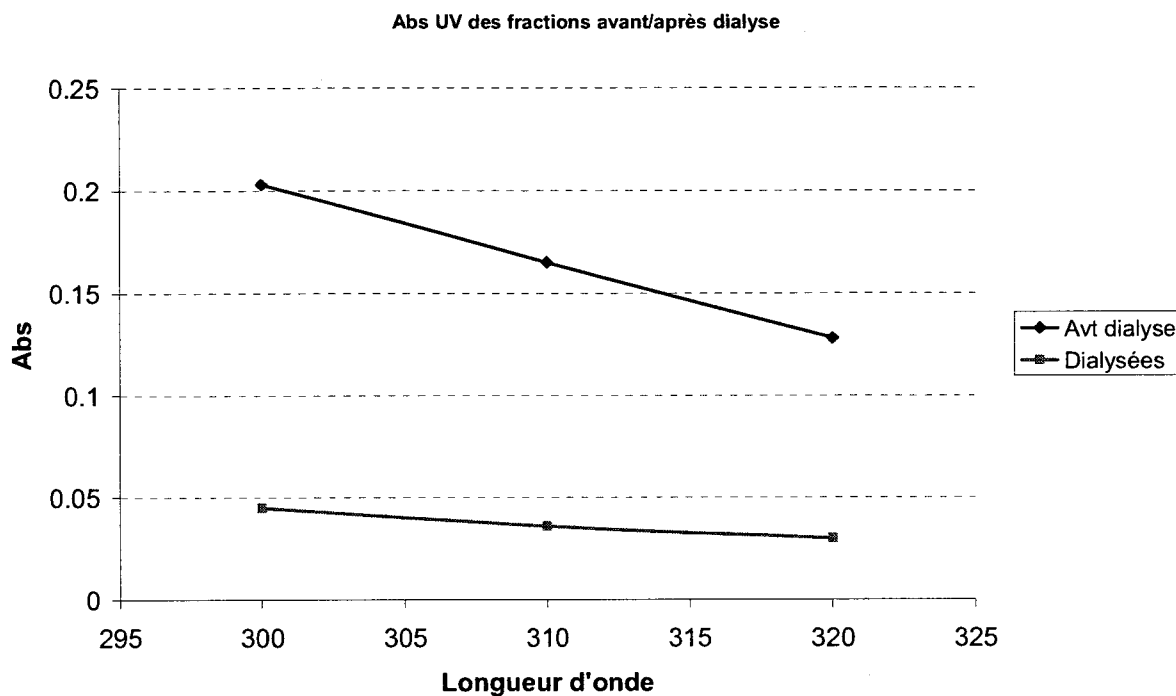


**Figure 55. Spectre UV des fractions dialysées et non dialysées après centrifugation**

De nouveau, on observe la décroissance nette de l'absorbance, le sucrose a bien disparu.

Si on effectue le même calcul qu'auparavant pour quantifier la disparition de sucrose et en appliquant le même facteur de dilution (on passe de nouveau de 1 ml à 1.8 ml) :

$$C_{\text{sucrose},3h} = C_0 \cdot \frac{A_{300,3h}}{A_0} \cdot 1.8 = 50 \cdot \frac{0.045}{0.203} \cdot 1.8 = 0.40\%$$

On retrouve donc 0.40 % (w/w) de sucrose seulement après dialyse.

Une mesure de fluorescence a également été réalisée sur les nanoparticules dialysées. Le tableau ci-dessous résume les valeurs en RFUs mesurées pendant les différentes étapes du procédé ainsi que la proportion récupérée pendant le procédé.

**Tableau 12. Évolution de la quantité de fluorescence récupérée tout au long du procédé**

| Nanoparticules brutes | Après centrifugation | Après dialyse | Après correction de dilution |
|-----------------------|----------------------|---------------|------------------------------|
| 194.4                 | 150.5                | 77            | 125.5                        |
| 100%                  | 77%                  | N.A.          | 65%                          |

Pour terminer la validation du procédé, des mesures en DLS ont été réalisées sur les particules avant et après traitement (centrifugation + dialyse) afin de vérifier l'intégrité des complexes après traitement. Les résultats sont présentés ci-dessous.

#### Mesure du rayon hydrodynamique des complexes avant traitement

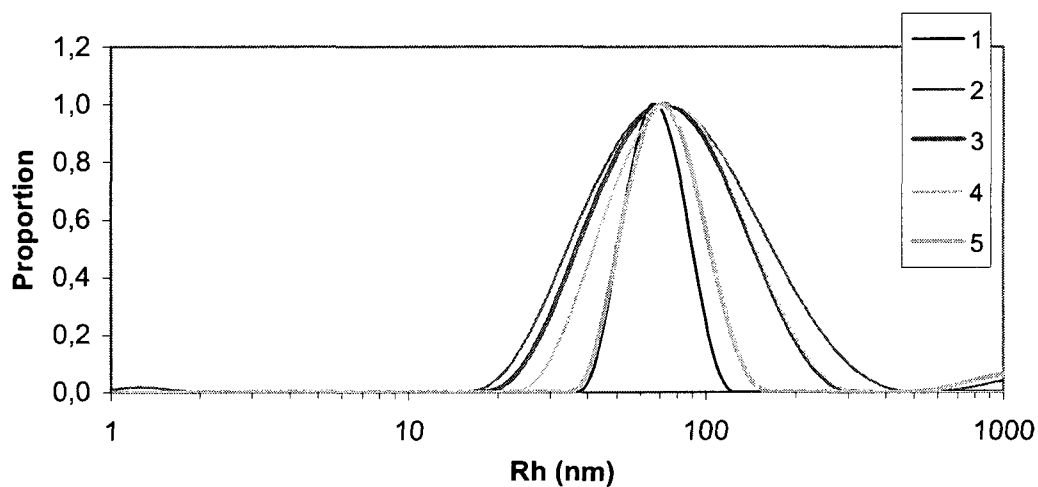


**Figure 56. Pics obtenus pour la mesure du rayon hydrodynamique des nanoparticules avant traitement. Les 5 échantillons prélevés étaient dilués dans le MES à pH 6.0 pour une force ionique de 20 mM. Rh représente le rayon hydrodynamique des complexes.**

### Mesure du rayon hydrodynamique des complexes après traitement

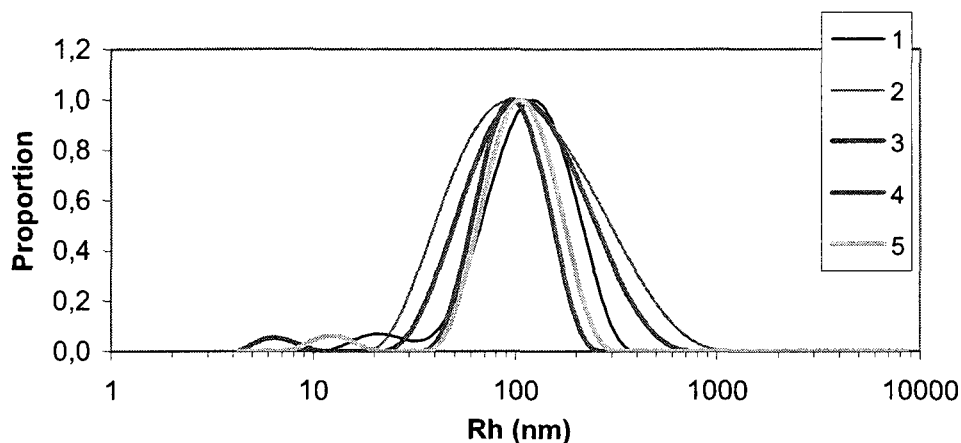


**Figure 57. Pics obtenus pour la mesure du rayon hydrodynamique des nanoparticules après traitement. Les échantillons étaient dilués dans le MES à pH 6.0 pour une force ionique de 20 mM. Rh représente le rayon hydrodynamique des complexes.**

Il est possible d'observer que l'étendue des pics a diminué suite au traitement par ultracentrifugation (Figures 56 et 57). Cette observation est confirmée par le calcul de l'écart type qui, dans une distribution gaussienne comme celle-ci, quantifie la dispersion des valeurs autour de la moyenne et donc l'étendue du pic. Pour les nanoparticules avant traitement, l'écart type sur les valeurs était de 18 nm et il a diminué à 7 nm après traitement. Cette diminution est due au nettoyage des nanoparticules : le traitement par ultracentrifugation a permis de se débarrasser non seulement du chitosane libre mais également des impuretés présentes au départ dans le chitosane. Ainsi, les valeurs de rayon hydrodynamique sont centrées avec un écart type plus faible autour de la valeur moyenne.

**Tableau 13. Rayons hydrodynamiques mesurés pour chacun des tests réalisés après et avant traitement (centrifugation + dialyse)**

|                  | 1   | 2   | 3   | 4  | 5   | Moyenne |
|------------------|-----|-----|-----|----|-----|---------|
| Avant traitement | 118 | 101 | 73  | 80 | 94  | 93      |
| Après traitement | 109 | 114 | 115 | 96 | 107 | 109     |

Les rayons hydrodynamiques mesurés montrent une distribution assez dispersée avant traitement alors que celle-ci est beaucoup plus resserrée après traitement, ce qui vient confirmer ce qui avait été expliqué en observant l'allure des pics.

Le traitement ne perturbe pas le rayon hydrodynamique des particules, il n'augmente en moyenne que de 15 % ce qui reste faible. Ce résultat signifie donc que le procédé ne défait pas les complexes et ne les déstabilise pas, les nanoparticules récupérées à la fin du traitement seront similaires à celles non purifiées.

#### **5.4. Résultats et discussion - Perte de fluorescence du chitosane marqué à la rhodamine lors des expériences d'ultracentrifugation**

L'obstacle majeur auquel nous nous sommes heurtés pendant le développement des expériences est la perte quasi-totale dans certains cas de la fluorescence du chitosane marqué à la rhodamine, ce qui nous a obligés à changer de stratégie et à préférer un marquage des plasmides tel que décrit dans les sections précédentes.

Cette section présente les résultats des expériences réalisées pour essayer de comprendre d'où provenait cette perte et s'il était possible d'y remédier.

##### **5.4.1. Observation des pertes en fluorescence**

L'intensité de ce phénomène de perte était assez variable ; il était parfois complet, une perte de 90% de la fluorescence initiale comme présenté sur la figure ci-

dessous était observée. Elle était parfois plus faible comme on le verra plus loin sur les spectres. Il est à noter que la perte de fluorescence n'a pas été observée pour le chitosane pur, non complexé. Par contre,, ce phénomène a été observé pour toutes les valeurs de N : P, tout particulièrement pour 2 et 5.

La figure suivante (Figure 59) montre cette perte de fluorescence dans le cas d'un échantillon N : P 2 centrifugé selon les conditions définies précédemment pour les procédés de séparation de nanoparticules. Le chitosane était marqué à la rhodamine.

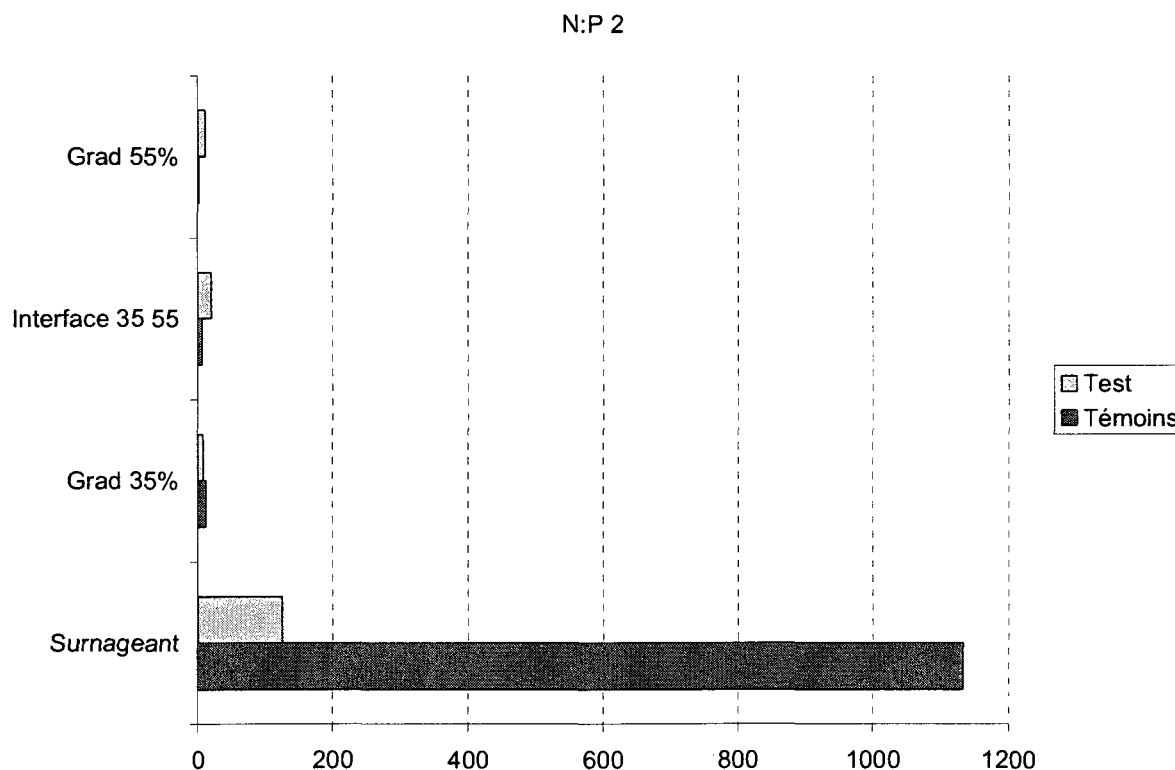


**Figure 58. Fluorescence du chitosane rhodamine après centrifugation 30,000 RPM 20 min 15°C (N : P 2)**

Dans la figure précédente, le témoin était du chitosane libre à la même concentration (22.5  $\mu\text{g/ml}$ ) que ce qui avait été ajouté pour former des nanoparticules à  $N/P = 2$ . Comme on peut s'en apercevoir, la diminution de fluorescence est nette et très marquée (environ 86% de perte).

On peut noter que cette perte n'est par contre pas du tout observée pour l'ADN Cy3. En revenant à la figure 43, on peut observer que le nombre total de RFUs pour le témoin non centrifugé est de 88 RFUs alors qu'il est de 103 RFUs pour le total des fractions testées. Cette différence de 15 RFUs est faible par rapport aux pertes observées dans le cas du chitosane marqué à la rhodamine (voir partie 5.4). D'ailleurs, la tendance est à l'augmentation de la fluorescence et non à son extinction comme dans le cas du chitosane. De plus, on observe une telle valeur de fluorescence pour du chitosane libre ou de l'ADN libre non marqués (Figure 49), il est donc possible qu'il ne s'agisse que d'un bruit de fond.

Ainsi, la perte observée pour le cas du chitosane rhodamine n'est pas observée pour l'ADN Cy3/5.

#### 5.4.2. Tests sans centrifugation

##### 5.4.2.1. Tests en fluorescence

Après plusieurs tests préliminaires, il s'avère que la centrifugation n'est pas la principale responsable de ces pertes, la formation des nanoparticules est plutôt en cause. Pour élucider cela, des tests ont été réalisés sans centrifugation, en produisant uniquement des nanoparticules avec ou sans sucrose ajouté pour reproduire les conditions de centrifugation.

Tout d'abord, une étude a été menée à un ratio N : P de 2, c'est-à-dire dans les conditions utilisées pour produire des nanoparticules. Quatre conditions ont été examinées, soit :

- Chitosane libre dans l'eau
- Chitosane libre dans le sucrose
- Nanoparticules dans l'eau
- Nanoparticules dans le sucrose.

### Comparaison de différentes conditions pour la fluorescence du chitosane rhodamine

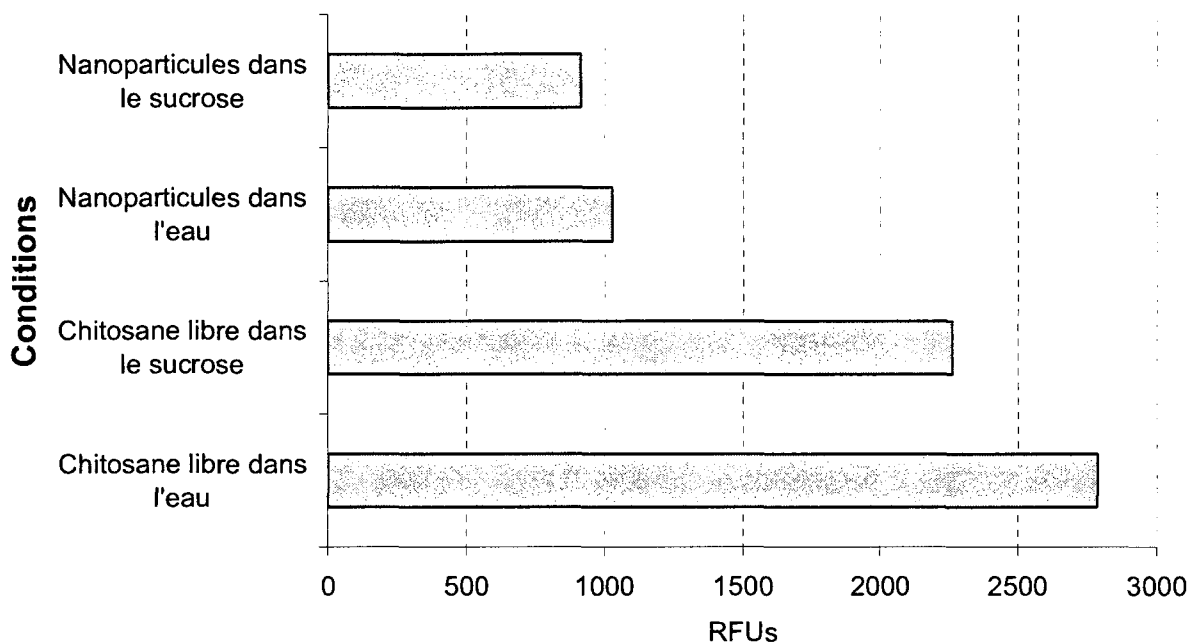


**Figure 59.** Comparaison de la fluorescence du chitosane rhodamine dans différentes conditions. Les nanoparticules sont à un ratio N/P de 2.

Les pertes sont de 400 RFUs lors du passage dans le sucre, puis de 1000 RFUs lors de la formation des complexes et enfin de 100 RFUs seulement lorsque ceux-ci sont en solution dans le sucre. L'effet moteur de la perte de fluorescence est donc a priori la formation des complexes, suivi par la présence de sucre qui perturbe également la fluorescence.

Les résultats présentés ci-dessous sont des spectres d'émission en fluorescence ; ils ont été acquis pour éliminer les possibilités de déplacement du maximum d'émission. En effet, il est possible que la formation de nanoparticules déplace tant le pic que les niveaux mesurés à 580 nm soient alors sous-estimés.

Ces mesures ont été réalisées pour un ratio N : P de 1.2, ce qui correspond à pratiquement la stœchiométrie du chitosane dans les nanoparticules formées avec du pEGFP-Luc (Pei Lian Ma, résultats en cours de publication). Choisir ce ratio permet de caractériser véritablement la fluorescence des nanoparticules sans que celle-ci soit influencée par la présence dans le milieu de chitosane libre.

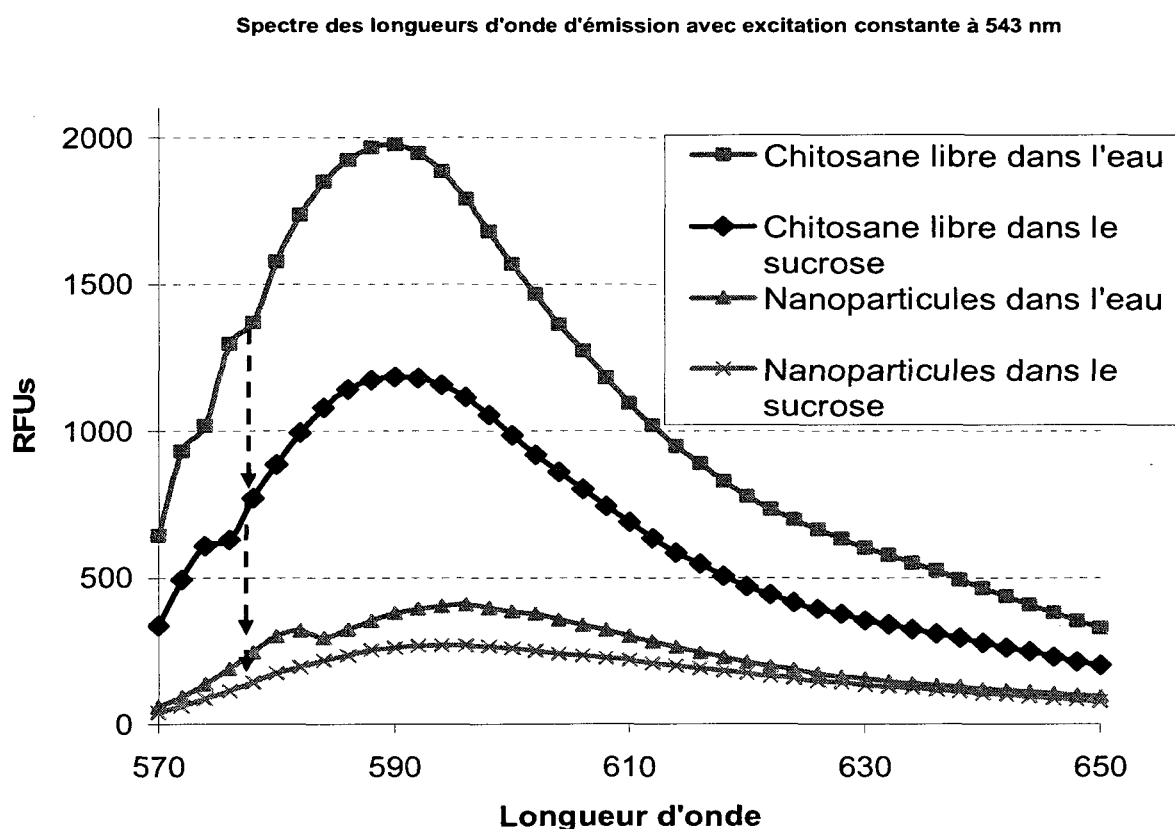


**Figure 60.** Spectres d'émission de la rhodamine sans centrifugation et en présence ou non de sucre/ADN

Comme on peut l'observer sur les spectres, ce n'est cependant pas le cas ici. On observe un léger déplacement (6 nanomètres environ) pour les nanoparticules, mais il n'est pas suffisant pour expliquer une aussi grande perte de fluorescence.

On peut voir ici également que les effets observés en mesurant à une seule longueur d'onde d'émission (Figure 60) se retrouvent sur les spectres.

#### 5.4.2.2. Tests en UV/Visible

Afin de compléter l'étude et vérifier la validité de nos hypothèses sur l'interprétation de ce phénomène de perte de fluorescence, des spectres UV/Vis ont également été acquis. En effet, la rhodamine absorbe le rayonnement visible autour de 540 nm (absorption maximale,  $\epsilon = 90\,000\text{ cm}^{-1}$ ) (Geoghegan et al., 2000) ce qui constitue une autre façon de la doser.

Les spectres suivants ont été acquis sans centrifugation et dans des conditions reproduisant un traitement par ultracentrifugation.

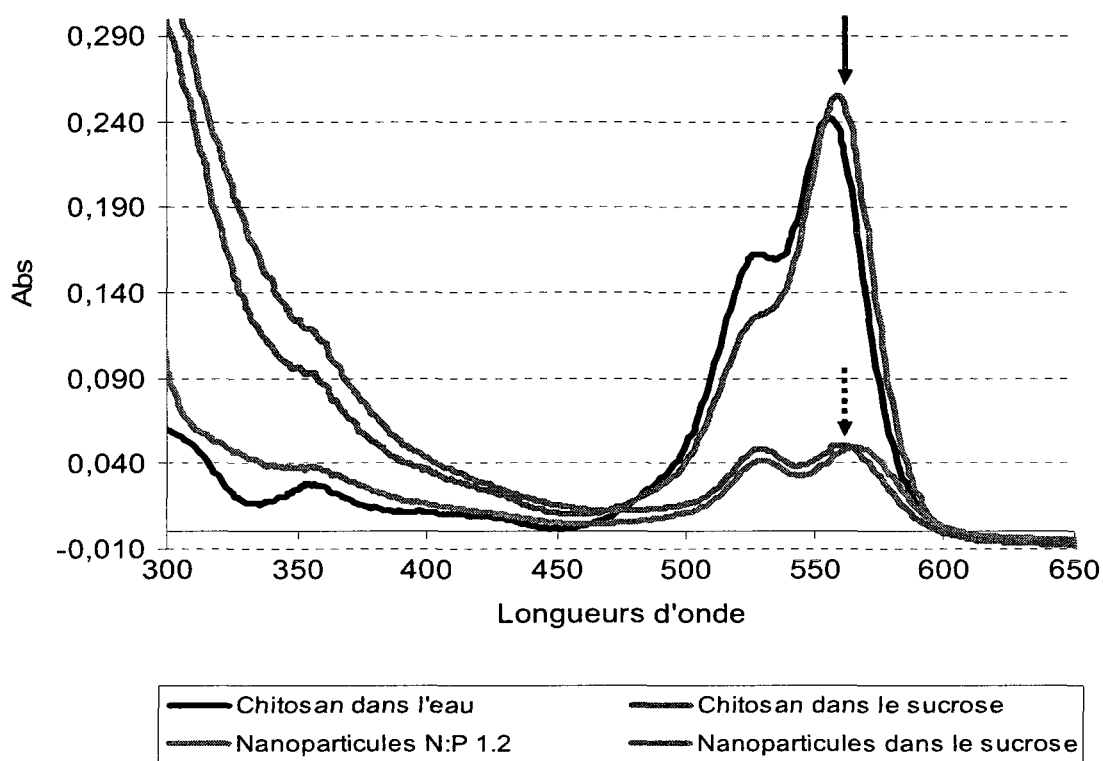


**Figure 61. Spectres UV/Vis dans différentes conditions Chitosane-Rhodamine/ADN N : P = 1.2**

La flèche pleine pointe le maximum d'absorbance pour le chitosane libre et la flèche en pointillés celui pour les nanoparticules.

Un point à noter est que la perte d'absorbance est également de près de 80%, exactement comme dans le cas de la fluorescence comme le montre le calcul suivant :

$$\%_{\text{rés}} = \frac{A_{\text{max, nanoparticules}}}{A_{\text{max, chitosan libre}}} \cdot 100 = \frac{0.048}{0.254} \cdot 100 = 18.9\% \text{ donc une perte de } 80\% \text{ de}$$

l'absorbance initiale.

### 5.4.3. Interprétation et discussion

#### 5.4.3.1. Effets de quenching et de shielding

Les spectres et les résultats des mesures pour une seule longueur d'onde montrent clairement que le chitosane impliqué dans les nanoparticules émet beaucoup moins que sous sa forme libre. La fluorescence est diminuée dans les nanoparticules et dans les différentes expériences réalisées, la perte va de 65 à 80% du niveau de fluorescence de départ. Il semblerait que seuls 20% des rhodamines disponibles soient encore capables d'émettre à la surface des nanoparticules.

Cet effet est caractéristique des marqueurs fluorescents comme la rhodamine. Cette dernière est constituée d'un enchaînement de 3 cycles aromatiques appelé xanthène (voir Figure 38) qui est le centre responsable de la fluorescence de la molécule. On retrouve cette fonction également chez la fluoréscéine par exemple et l'auto-extinction de celle-ci est décrite en détail dans le chapitre 4.

Brièvement, tout comme dans le cas de la fluoréscéine, cette partie de la molécule est impliquée dans l'homo-aggrégation des marqueurs, c'est-à-dire l'interaction entre fluorophores du même type (Valdes-Aguilera et al., 1989). Des études ont montré que les rhodamines interagissent entre elles pour former des dimères de géométrie complexes (Ilich et al., 1996; Valdes-Aguilera et al., 1989). Ces dimères se forment dans l'eau et sont le fruit d'interactions hydrophobes. Des liaisons hydrogènes et électrostatiques sont également impliquées avec une constante  $K_A = 1.3-1.5.10^3 \text{ M}^{-1}$ .

Ces dimères sont non fluorescents et des études ont montré que la perte de fluorescence dans l'eau pouvait être drastique (plus de 90%) (Geoghegan et al., 2000). La formation de dimères engendre un déplacement du pic d'émission de fluorescence ainsi que du pic d'absorption maximale, effet qui permet l'identification de la formation de dimères dans une solution. Plus précisément, les dimères émettent à une longueur d'onde plus élevée que les monomères, ce qu'on peut observer sur les spectres de la figure 61 ainsi que sur les spectres précédents de la fluoréscéine.

Il est également à noter que les dimères absorbent moins le rayonnement visible que les monomères (Geoghegan et al., 2000) ce qui est un effet également observé sur les spectres de la figure 61.

Sous forme libre et à concentration modérée, l'effet d'auto-extinction n'est pas observé au niveau des rhodamines, la dimérisation des formes libres est un effet négligeable. De plus, les chaînes du biopolymère se repoussent, ce qui ne permet pas aux rhodamines d'être suffisamment rapprochées pour interagir et former des dimères en solution. Par contre, dans les nanoparticules, les fluorophores sont localement très concentrés ce qui favorise l'équilibre vers la complexation et la baisse de fluorescence.

Cet effet d'autoextinction est l'effet moteur de la perte de fluorescence observée dans le cas de la rhodamine, effet qui peut atteindre 90% du niveau initial tout comme dans le cas de la fluoréscéine.

#### 5.4.3.2. Effet du sucre

Une des interprétations de la perte de fluorescence lors de la présence de sucre dans le milieu serait une interaction entre les molécules de sucre et le marqueur fluorescent. Une publication de Visser et al. souligne la possibilité d'une interaction sucre-rhodamine (Visser et al., 1999). Il s'agit d'un problème de dissipation d'énergie liée à la présence de sucre, l'énergie d'émission serait perdue dans des interactions secondaires entre dipôles transitoires formés par les molécules de rhodamine et de sucre. Plus précisément, le sucre influence directement la capacité des dipôles à émettre un rayonnement de durée suffisante pour être détecté dans son intégralité ; la durée de vie de l'émission est rapidement diminuée avec la présence de hautes concentrations de sucre. Par exemple, pour une molécule de rhodamine présente dans l'eau, l'émission a une durée de vie de 4 nanosecondes environ, durée diminuée à 3.5 nanosecondes dans une solution de sucre 50% (w/w). Cette diminution de la durée de vie de la fluorescence peut aussi être le signe d'une perte du rayonnement émis et donc une perte au niveau du rayonnement détecté. Les dipôles transitoires formés entre sucre et rhodamine dissipent une partie de l'énergie.

#### 5.4.3.3. Effet de l'ultracentrifugation

D'après ce qui a pu être observé en l'absence d'ultracentrifugation, il est difficile de distinguer l'influence de la centrifugation dans la perte de fluorescence. En d'autres termes, si les particules venaient à s'agréger, la diminution de fluorescence serait faible tout comme le niveau de départ. De plus, la fluorescence avec de l'ADN marqué ne serait probablement pas affectée par une agrégation quelconque, puisque le Cy3 semble fluorescer dans toutes les situations, donc également si plusieurs plasmides se retrouvaient dans une même particule. Cependant, en centrifugation avec gradient, les particules sont séparées les unes des autres par le sucrose pendant le procédé, ce qui devrait en théorie diminuer leur agrégation (Price, 1982). Cette hypothèse est confirmée par les mesures réalisées en DLS (section 5.3.5). Aucun agrégat n'est observé après centrifugation qui n'est donc pas en cause dans la perte de fluorescence.

### 5.5. Conclusion générale

Il est donc possible de séparer les nanoparticules ADN / chitosane du chitosane non complexé lors de l'ajout d'ADN. Cette technique permet également de se débarrasser des impuretés du chitosane présentes initialement.

Les mesures en fluorescence de la rhodamine pour le chitosane marqué et du Cy3 pour l'ADN marqué montrent que les complexes sédimentent dans les couches inférieures d'un gradient de sucrose 35% / 55 % (w/w) lors d'une étape d'ultracentrifugation d'une heure à 30,000 RPM. Parallèlement, la sédimentation des composés non liés comme le chitosane ou l'ADN libres n'est pas observée au-delà de la couche supérieure du gradient.

L'étape de dialyse permet de purifier le milieu final du sucrose présent suite à l'ultracentrifugation pour obtenir un rendement final de 65% (particules récupérées par rapport aux particules initialement présentes). Il est à noter que l'étape de purification du sucrose n'est pas toujours nécessaire. Par exemple, pour la transfection directe de nanoparticules purifiées, le sucrose n'a a priori aucun effet néfaste. Il est de plus inerte chimiquement. Cependant, son ajout augmente la densité des milieux, ce qui rend sa purification nécessaire dans le cas de greffage protéique pour la bonne diffusion des petits peptides vers les complexes.

De plus, les mesures en diffusion dynamique de la lumière ont permis d'établir avec certitude que les nanoparticules n'étaient ni défaites ni agrégées par le procédé. La récupération de nanoparticules dans leur forme initiale est donc possible grâce au traitement. Enfin, une conclusion supplémentaire de cette étude est que l'utilisation de chitosane rhodamine à des fins de quantification est très délicate, de nombreux effets ont lieu et rendent les niveaux de fluorescence parfois ininterprétables. Cet effet d'auto-extinction avait été exploité dans le chapitre précédent pour quantifier la saturation du chitosane par le peptide marqué avec une étiquette électrostatique, mais il devient du coup impossible ensuite de quantifier la présence de ces complexes en utilisant la fluorescence. Il est préférable d'utiliser de l'ADN marqué, même si cela est plus contraignant et plus cher au niveau de la préparation du matériel de départ.

La mise au point de ce procédé de séparation permettra donc de réaliser les tests sur des nanoparticules purifiées en solution exemptes de chitosane libre, espèce pouvant potentiellement interférer dans le procédé de greffage. La vérification et la caractérisation du greffage électrostatique sur des complexes ADN / chitosane représente maintenant l'étape suivante dans la mise en place de l'utilisation de chitosane modifié pour la livraison de gène.

## 6. Chapitre 6. Discussion générale

Le chitosane est un des biopolymères les plus étudiés pour ses propriétés comme vecteur de transfection en livraison de gène. Mais, afin d'accroître encore la gamme de ses applications, il s'avère nécessaire de le fonctionnaliser par l'ajout d'une protéine ou d'une molécule active. L'objectif général de ce projet consistait en l'étude d'étiquettes électrostatiques à des fins de greffage protéique sur du chitosane et à la préparation de l'étape suivante, soit le greffage sur des nanoparticules pour des applications de livraison de gène.

Dans un premier temps, il a été démontré que le domaine coiled-coil constitue une alternative intéressante. En effet, suite au greffage covalent d'un des partenaires (peptide Kcoil) sur le chitosane, la capacité du peptide K à se lier à son partenaire complémentaire (peptide E) est conservée et ainsi, toute protéine marquée avec ce dernier possède la capacité de s'associer avec le chitosane et de former un complexe protéine /chitosane sans modifier les propriétés du polysaccharide.

Les propriétés électrostatiques du chitosane ont constitué la base de la deuxième approche. Un peptide muni d'une étiquette électrostatique chargée négativement vient s'adjoindre au chitosane de façon directe et spontanée avec une grande stabilité en milieu aqueux. De plus, la technique d'ajout en une injection du peptide sur le chitosane a montré les meilleurs résultats pour l'obtention de complexes peptide/chitosane stables.

Ces deux méthodes ont de nombreux points communs, à commencer par l'universalité de leur utilisation. Ces protocoles sont en effet applicables pour toute protéine possédant une de ces étiquettes. En d'autres termes, l'application de ces procédés est absolument indépendante du type de protéines, peptides ou molécules à greffer au chitosane. De plus, l'utilisation de ces étiquettes permet d'éviter l'application de procédés chimiques aux protéines, qui sont fragiles et sensibles à ce genre de traitement. Autant dans le cas du domaine coiled-coil que dans celui du greffage électrostatique, les protéines demeurent toujours dans les conditions pour lesquelles elles seront stables et bioactives. Enfin, un des avantages qu'il convient de souligner

pour ces deux techniques est leur simplicité; aucun procédé de purification complexe n'est nécessaire et le greffage prend dans chacun des cas entre 30 minutes et 3 heures.

Toutefois, ces techniques comportent quelques inconvénients qui ne les rendent pas pour autant antagonistes mais complémentaires. Ainsi, la fonctionnalisation d'un chitosane par des peptides coils est assez simple, mais il n'en va pas toujours de même pour la synthèse biologique de protéines complexes étiquetées avec le peptide coil. Il est difficile pour l'instant de prédire si la production de protéines étiquetées avec une terminaison anionique sera plus aisée à réaliser, mais le fait que l'étiquette soit plus courte et sans activité biologique particulière semble abonder dans ce sens. Cependant, dans le cas de peptides courts, une synthèse chimique est possible tant pour la technique utilisant les peptides coils que pour celle utilisant les étiquettes électrostatiques.

En dépit de cet avantage de synthèse, l'approche électrostatique comporte une interrogation, celle de la stabilité à pH physiologique qui n'a pas été testée. Le domaine coiled-coil est reconnu comme étant stable à pH physiologique et donc capable de lier des peptides étiquetés au chitosane dans ces conditions. Les étiquettes électrostatiques s'appuient sur une certaine densité de protonation du chitosane, densité réduite à des valeurs faibles à pH physiologique, ce qui pourrait avoir pour conséquence de diminuer substantiellement la stabilité de l'interaction. Cependant, la stabilité des complexes ADN / chitosane a été prouvée (Communication personnelle, Pei Lian Ma), ce qui est de bonne augure pour un greffage électrostatique avec le chitosane. La stabilité du domaine électrostatique est plus forte que celle du domaine coiled-coil à pH 6.0, mais il est encore un peu prématuré de statuer ce qu'il en sera dans des conditions physiologiques. Cependant, la transfection cellulaire a été montrée comme étant plus efficace à pH 6.0 pour un vecteur comme le chitosane (Mao et al., 2001), ce qui rehausse l'intérêt pour un procédé de haute stabilité dans ces conditions de pH. Grâce à ces deux techniques, le greffage protéique sur le chitosane est stable pour une valeur de pH fixée par l'application visée.

Enfin, l'étape suivante consiste à étudier les conditions pour un greffage direct sur les nanoparticules. Les résultats acquis pour le chitosane sous forme libre sont

préliminaires à la modification de complexes ADN / chitosane pour des applications de livraison de gène et à la vérification ultérieure de l'efficacité d'un chitosane modifié par nos techniques au niveau cellulaire.

Du fait du coût des peptides utilisés et surtout de la nécessité de contrôler le rendement du greffage sur les nanoparticules, développer une méthode de séparation des complexes est devenu crucial. En effet, le peptide ayant une très bonne affinité pour le chitosane par l'intermédiaire de son étiquette, celui-ci aura tendance à venir s'adsorber sur les chaînes de chitosane libre et laisser les complexes sous forme naturelle, non modifiée. La technique de purification par ultracentrifugation et dialyse donne d'excellents résultats, tant dans la séparation des produits que dans la préservation de la structure des nanoparticules. Un nouvel axe de recherche est maintenant accessible, ouvrant la voie à des applications beaucoup plus ciblées pour la livraison de gène.

## 7. Conclusion et Recommandations

Les recommandations suivantes pourront aider à l'amélioration du procédé de greffage sur le chitosane libre et au développement ultérieur d'un protocole pour la fonctionnalisation directe des nanoparticules ADN / chitosane.

Tout d'abord, pour éviter de dégrader les nanoparticules, il est préférable d'utiliser du chitosane déjà fonctionnalisé avec un peptide coil avant de former le complexe avec l'ADN. L'approche alternative consisterait à modifier le biopolymère selon le protocole développé après complexation de l'ADN, mais le procédé de purification ne serait alors plus applicable. Un test par microcalorimétrie pourrait ensuite permettre de vérifier que les coils sont bien exposés en majorité à l'extérieur de la particule et sont capables de lier leur partenaire. Enfin, pour utiliser un tel système, il est conseillé d'utiliser du Kcoil chitosane pour éviter toute interaction entre le chitosane et le peptide.

Ensuite, dans le cas du greffage direct par interaction électrostatique, l'étude du complexe formé par le peptide étiqueté et le chitosane dans des conditions plus proches des conditions physiologiques (pH 7.4, 150 mM de NaCl) pourrait être souhaitable pour préparer la fonctionnalisation de particules ADN / chitosane. Les essais pour démontrer la conjugaison avec des complexes ADN / chitosane chargés pourront être calqués sur ceux réalisés avec le chitosane moyennant quelques adaptations nécessaires pour prendre en compte la densité de charges inférieure des nanoparticules. Les expériences en microcalorimétrie pourraient s'avérer problématiques, du fait des faibles niveaux des dégagements d'énergie, mais les tests en auto-extinction et éventuellement en UV restent réalisables et donneront accès à une bonne quantification des taux de greffage sur les complexes. Des tests préliminaires pour les particules ont déjà montré une perte de fluorescence semblable à ce qui a été observé avec le chitosane. L'étude des mécanismes de formation pourrait également être approfondie par des mesures de potentiel électrostatique. Ainsi, grâce à l'évolution du potentiel pendant le titrage, il sera possible de mieux comprendre les étapes du mécanisme de formation de complexes peptide étiqueté / chitosan.

Enfin, la méthode de séparation de nanoparticules sera particulièrement utilisée pour la fonctionnalisation par interaction électrostatique et il peut être intéressant de modifier les conditions de préparation de celles-ci (ratio N : P initial, pH, etc.) pour optimiser leur purification. L'ajout d'une 3<sup>ème</sup> couche au gradient de densité environ 1.05 pourrait être également envisageable pour récupérer le chitosane sous sa forme libre.

Ce projet permet d'avoir maintenant accès à deux procédés pour la fonctionnalisation du chitosane et prépare l'étape suivante pour les complexes ADN / chitosane. Elles présentent l'avantage crucial de ne pas dépendre de la protéine ou molécule adjointe au chitosane, ce qui offre un grand nombre de modifications possibles suivant l'application cherchée et donc un panel très large d'actions au niveau cellulaire.

## RÉFÉRENCES

- Aguilar, M. R., Gallardo, A., Lechuga, L. M., Calle, A., & San Roman, J. (2004). Modulation of proteins adsorption onto the surface of chitosan complexed with anionic copolymers. Real time analysis by surface plasmon resonance. *Macromolecular Bioscience*, 4(7), 631-638.
- Ahmadi, R., & De Bruijn, J. D. (2008). Biocompatibility and gelation of chitosan-glycerol phosphate hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 86(3), 824-832.
- Aiedeh, K., & Taha, M. O. (2001). Synthesis of iron-crosslinked chitosan succinate and iron-crosslinked hydroxamated chitosan succinate and their in vitro evaluation as potential matrix materials for oral theophylline sustained-release beads. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 159-168.
- Anghileri, A., Lantto, R., Kruus, K., Arosio, C., & Freddi, G. (2007). Tyrosinase-catalyzed grafting of sericin peptides onto chitosan and production of protein-polysaccharide bioconjugates. *Journal of Biotechnology*, 127(3), 508-519.
- Arp, Z., Autrey, D., Laane, J., Overman, S. A., & Thomas, G. J. (2001). Tyrosine Raman Signatures of the Filamentous Virus Ff Are Diagnostic of Non-Hydrogen-Bonded Phenoxyls: Demonstration by Raman and Infrared Spectroscopy of p-Cresol Vapor. *Biochemistry*, 40(8), 2522-2529.
- Bayat, A., Larijani, B., Ahmadian, S., Junginger, H. E., & Rafiee-Tehrani, M. (2008). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and its quaternized derivatives. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4(2), 115-120.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 19-34.

- Bernkop-Schnurch, A. (2005). Thiomers: A new generation of mucoadhesive polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1569-1582.
- Berscht, P. C., Nies, B., Liebendoerfer, A., & Kreuter, J. (1995). In vitro evaluation of biocompatibility of different wound dressing materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 6(4), 201-205.
- Bhattacharai, S. R., K.C, R. B., Aryal, S., Bhattacharai, N., Kim, S. Y., Yi, H. K., et al. (2008). Hydrophobically modified chitosan/gold nanoparticles for DNA delivery. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(1), 151-162.
- Boucard, N., Viton, C., Agay, D., Mari, E., Roger, T., Chancerelle, Y., et al. (2007). The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials*, 28(24), 3478-3488.
- Boucher, C., St-Laurent, G., Loignon, M., Jolicoeur, M., Crescenzo, G. D., & Durocher, Y. (2008). The Bioactivity and Receptor Affinity of Recombinant Tagged EGF Designed for Tissue Engineering Applications Is Defined by the Nature and Position of the Tags. *Tissue Engineering Part A*, 24, 24.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., et al. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7297-7301.
- Campos, M., Cordi, L., Durdn, N., & Me, L. (2007). *Antibacterial activity of chitosan solutions for wound dressing*, Rio de Janeiro, Brazil.
- Chang, K. L. B., Tsai, G., Lee, J., & Fu, W.-R. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*, 303(3), 327-332.
- Chen, T., Embree, H. D., Wu, L.-Q., & Payne, G. F. (2002). In vitro protein-polysaccharide conjugation: Tyrosinase-catalyzed conjugation of gelatin and chitosan. *Biopolymers*, 64(6), 292-302.
- Chenite, A., Buschmann, M., Wang, D., Chaput, C., & Kandani, N. (2001). Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydrate Polymers*, 46(1), 39-47.

- Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M. D., Hoemann, C. D., et al. (2000). Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, 21(21), 2155-2161.
- Chevrier, A., Hoemann, C. D., Sun, J., & Buschmann, M. D. (2007). Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage*, 15(3), 316-327.
- Choi, C. Y., Kim, S. B., Pak, P. K., Yoo, D. I., & Chung, Y. S. (2007). Effect of N-acetylation on structure and properties of chitosan fibers. *Carbohydrate Polymers*, 68(1), 122-127.
- Corsi, K., Chellat, F., Yahia, L., & Fernandes, J. C. (2003). Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials*, 24(7), 1255-1264.
- Cotten, M., Langle-Rouault, F., Kirlappos, H., Wagner, E., Mechtler, K., Zenke, M., et al. (1990). Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(11), 4033-4037.
- Dai, Z., Jingbo, Y., Shifeng, Y., Tian, C., Jia, M., & Xuesi, C. (2007). Polyelectrolyte complexes based on chitosan and poly(L-glutamic acid). *Polymer International*, 56(9), 1122-1127.
- Dang, J. M., & Leong, K. W. (2006). Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(4), 487-499.
- Dash, P. R., Read, M. L., Barrett, L. B., Wolfert, M. A., & Seymour, L. W. (1999). Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Therapy*, 6(4), 643-650.
- De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed

- coiled-coils: Effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry*, 42(6), 1754-1763.
- de Oliveira, H. C., Fonseca, J. L., & Pereira, M. R. (2008). Chitosan-poly(acrylic acid) polyelectrolyte complex membranes: preparation, characterization and permeability studies. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 19(2), 143-160.
- Denkbas E , & Odabas M. (2000). Chitosan microspheres and sponges: Preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 76(11), 1637-1643.
- Dodane, V., Amin Khan, M., & Merwin, J. R. (1999). Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm*, 182(1), 21-32.
- Drogoz, A., David, L., Rochas, C., Domard, A., & Delair, T. (2007). Polyelectrolyte Complexes from Polysaccharides: Formation and Stoichiometry Monitoring. *Langmuir*, 23(22), 10950-10958.
- Egawa, Y., Hayashida, R., Seki, T., & Anzai, J. (2008). Fluorometric determination of heparin based on self-quenching of fluorescein-labeled protamine. *Talanta*, 76(4), 736-741.
- Ehtezazi, T., Govender, T., & Stolnik, S. (2000). Hydrogen bonding and electrostatic interaction contributions to the interaction of a cationic drug with polyaspartic acid. *Pharmaceutical Research*, 17(7), 871-878.
- Erbacher, P., Zou, S., Bettinger, T., Steffan, A. M., & Remy, J. S. (1998). Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharmaceutical Research*, 15(9), 1332-1339.
- Fan, V. H., Tamama, K., Au, A., Littrell, R., Richardson, L. B., Wright, J. W., et al. (2007). Tethered epidermal growth factor provides a survival advantage to mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 25(5), 1241-1251.
- Felix, L., Hernandez, J., Arguelles, W. M., & Goycoolea, F. M. (2005). Kinetics of gelation and thermal sensitivity of N-isobutryryl chitosan hydrogels. *Biomacromolecules*, 6(5), 2408-2415.

- Filion, D., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2007). Ionization and Solubility of Chitosan Solutions Related to Thermosensitive Chitosan/Glycerol-Phosphate Systems. *Biomacromolecules*, 8(10), 3224-3234.
- Fischer, T. H., Bode, A. P., Demcheva, M., & Vournakis, J. N. (2007). Hemostatic properties of glucosamine-based materials. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 80(1), 167-174.
- Freddi, G., Anghileri, A., Sampaio, S., Buchert, J., Monti, P., & Taddei, P. (2006). Tyrosinase-catalyzed modification of Bombyx mori silk fibroin: Grafting of chitosan under heterogeneous reaction conditions. *Journal of Biotechnology*, 125(2), 281-294.
- Geoghegan, K. F., Rosner, P. J., & Hoth, L. R. (2000). Dye-pair reporter systems for protein-peptide molecular interactions. *Bioconjugate Chemistry*, 11(1), 71-77.
- Grenha, A., Seijo, B., Serra, C., & Remunan-Lopez, C. (2007). Chitosan nanoparticle-loaded mannitol microspheres: Structure and surface characterization. *Biomacromolecules*, 8(7), 2072-2079.
- Gruber, J. V., Rutar, V., Bandekar, J., & Konish, P. N. (1995). Synthesis of N-[(3'-Hydroxy-2',3'-dicarboxy)- ethyl]chitosan: A New, Water-Soluble Chitosan Derivative. *Macromolecules*, 28(26), 8865-8867.
- Gupta, A., Tandon, P., Gupta, V. D., & Rastogi, S. (1997). Vibrational dynamics and heat capacity of beta-poly(L-serine). *Polymer*, 38(10), 2389-2397.
- Hajdu, I., Bodnar, M., Filipcsei, G., Hartmann, J., Daroczi, L., Zrinyi, M., et al. (2008). Nanoparticles prepared by self-assembly of Chitosan and poly-&gamma;-glutamic acid. *Colloid and Polymer Science*, 286(3), 343-350.
- Hamilton, V., Yuan, Y., Rigney, D., Puckett, A., Ong, J., Yang, Y., et al. (2006). Characterization of chitosan films and effects on fibroblast cell attachment and proliferation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(12), 1373-1381.

- Hangody, L., Kish, G., Modis, L., Szerb, I., Gaspar, L., Dioszegi, Z., et al. (2001). Mosaicplasty for the treatment of osteochondritis dissecans of the talus: two to seven year results in 36 patients. *Foot Ankle Surgery*, 22(7), 552-558.
- Hirano, S., Tsuchida, H., & Nagao, N. (1989). N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials*, 10(8), 574-576.
- Hoemann, C. D., Chenite, A., Sun, J., Hurtig, M., Serreqi, A., Lu, Z., et al. (2007). Cytocompatible gel formation of chitosan-glycerol phosphate solutions supplemented with hydroxyl ethyl cellulose is due to the presence of glyoxal. *J Biomed Mater Res A*, 83(2), 521-529.
- Hoemann, C. D., Hurtig, M., Rossomacha, E., Sun, J., Chevrier, A., Shive, M. S., et al. (2005). Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am*, 87(12), 2671-2686.
- Hoemann, C. D., Sun, J., McKee, M. D., Chevrier, A., Rossomacha, E., Rivard, G. E., et al. (2007). Chitosan-glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. *Osteoarthritis Cartilage*, 15(1), 78-89.
- Horton, R., Moran, L., Ochs, R., Rawn, D., & Scrimgeour, K. (2002). *Principles of biochemistry (3rd Edition)* (Vol. 1): Prentice Hall.
- Hsieh, S.-H., Huang, Z. K., Huang, Z. Z., & Tseng, Z. S. (2004). Antimicrobial and physical properties of woolen fabrics cured with citric acid and chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 94(5), 1999-2007.
- Hu, F.-Q., Zhao, M.-D., Yuan, H., You, J., Du, Y.-Z., & Zeng, S. (2006). A novel chitosan oligosaccharide-stearic acid micelles for gene delivery: Properties and in vitro transfection studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 315(1-2), 158-166.
- Huang, M., Khor, E., & Lim, L.-Y. (2004). Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 344-353.

- Ilich, P., Mishra, P. K., Macura, S., & Burghardt, T. P. (1996). Direct observation of rhodamine dimer structures in water. *Spectrochimica Acta, Part A (Molecular and Biomolecular Spectroscopy)*, 52A(10), 1323-1330.
- Issa, M. M., Köping-Höggård, M., Tømmerraas, K., Vårum, K. M., Christensen, B. E., Strand, S. P., et al. (2006). Targeted gene delivery with trisaccharide-substituted chitosan oligomers in vitro and after lung administration in vivo. *Journal of Controlled Release*, 115(1), 103-112.
- Janes, K. A., & Alonso, M. J. (2003). Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: Preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 88(12), 2769-2776.
- Jiang, H.-L., Kim, Y.-K., Arote, R., Nah, J.-W., Cho, M.-H., Choi, Y.-J., et al. (2007). Chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier. *Journal of Controlled Release*, 117(2), 273-280.
- Jones, G., & Qian, X. (1998). Emission quenching via intramolecular electron transfer for fluorescein conjugates. Dependences on driving force and medium. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, 113(2), 125.
- Jong-Ho, K., Yoo-Shin, K., Kyeongsoon, P., Eunah, K., Seulki, L., Hae Yun, N., et al. (2008). Self-assembled glycol chitosan nanoparticles for the sustained and prolonged delivery of antiangiogenic small peptide drugs in cancer therapy. *Biomaterials*, 29(12), 1920-1930.
- Kabanov, K. A., & Zezin, A. B. (1984). Soluble Interpolymeric Complexes as a new Class of Synthetic Polyelectrolytes. *Pure and Applied Chemistry*, 56(3), 343-354.
- Kafedjiiski, K., Hoffer, M., Werle, M., & Bernkop-Schnurch, A. (2006). Improved synthesis and in vitro characterization of chitosan- thioethylamidine conjugate. *Biomaterials*, 27(1), 127-135.
- Kast, C. E., & Bernkop-Schnurch, A. (2001). Thiolated polymers - thiomers: Development and in vitro evaluation of chitosan-thioglycolic acid conjugates. *Biomaterials*, 22(17), 2345-2352.

- Katz, L., Williams, P., Sato, S., Leavitt, R., & Helinski, D. (1977). Replicative intermediates of Cole1 DNA. *Biochemistry*, 16(8), 1677-1684.
- Kean, T., Roth, S., & Thanou, M. (2005). Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: Cytotoxicity and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 103(3), 643-653.
- Kim, I.-Y., Seo, S.-J., Moon, H.-S., Yoo, M.-K., Park, I.-Y., Kim, B.-C., et al. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26(1), 1-21.
- Kim, T.-H., Jiang, H.-L., Jere, D., Park, I.-K., Cho, M.-H., Nah, J.-W., et al. (2007). Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 32(7), 726-753.
- Kim, T. H., Hua, J., Kim, H. W., Cho, M. H., Nah, J. W., Choi, Y. J., et al. (2007). *Receptor-mediated gene delivery using chitosan derivatives in vitro and in vivo*, Vancouver, Canada.
- Kim, T. H., Ihm, J. E., Choi, Y. J., Nah, J. W., & Cho, C. S. (2003). Efficient gene delivery by urocanic acid-modified chitosan. *Journal of Controlled Release*, 93(3), 389-402.
- Knill, C., Kennedy, J. F., Mistry, J., Mirafteb, M., Smart, G., Grocock, M. R., et al. (2005). Acid hydrolysis of commercial chitosans. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(11), 1291-1296.
- Kolyadina, O., Murinov, K., Kuramshina, A., Kabal'nova, N., & Murinov, Y. (2006). Adsorption properties of complexes of chitosan with copper and zinc chlorides and copper sulfate. *Russian Journal of Physical Chemistry A, Focus on Chemistry*, 80(12), 2002-2006.
- Köping-Höggård, M., Mel'nikova, Y. S., Vårum, K. M., Lindman, B., & Artursson, P. (2003). Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vivo and in vivo. *The Journal of Gene Medicine*, 5(2), 130-141.

- Koping-Hoggard, M., Varum, K. M., Issa, M., Danielsen, S., Christensen, B. E., Stokke, B. T., et al. (2004). Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Therapy*, 11(19), 1441-1452.
- Kubota. (1998). Facile Preparation of Water-Soluble N-Acetylated Chitosan and Molecular Weight Dependence of Its Water-Solubility. *Polymer Journal*, 29(2), 123-127.
- Kuhl, P. R., & Griffith-Cima, L. G. (1996). Tethered epidermal growth factor as a paradigm for growth factor-induced stimulation from the solid phase. *Nature Medicine*, 2(9), 1022-1027.
- Kumar, G., Smith, P. J., & Payne, G. F. (1999). Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(2), 154-165.
- Kumar, M. N., Muzzarelli, R. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev*, 104(12), 6017-6084.
- Kumar, P., Wu, H., McBride, J. L., Jung, K.-E., Hee Kim, M., Davidson, B. L., et al. (2007). Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*, 448(7149), 39-43.
- Lavertu, M., Fillion, D., & Buschmann, M. D. (2008). Heat-Induced Transfer of Protons from Chitosan to Glycerol Phosphate Produces Chitosan Precipitation and Gelation. *Biomacromolecules*, 9(2), 640-650.
- Lavertu, M., Methot, S., Tran-Khanh, N., & Buschmann, M. D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 27(27), 4815-4824.
- Lee, J. E., Kim, K. E., Kwon, I. C., Ahn, H. J., Lee, S.-H., Cho, H., et al. (2004). Effects of the controlled-released TGF- $\beta$ 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. *Biomaterials*, 25(18), 4163-4173.

- Lee, K. Y., Kwon, I. C., Kim, Y. H., Jo, W. H., & Jeong, S. Y. (1998). Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system. *Journal of Controlled Release*, 51(2-3), 213-220.
- Lenhart, J. L., Chaubal, M. V., Payne, G. F., & Barbari, T. A. (1998). Enzymatic Modification of Chitosan by Tyrosinase. *ACS Symposium Series*, 684, 188-198.
- Leong, K. W., Mao, H. Q., Truong-Le, V. L., & Roy, K. (1998). DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *Journal of Controlled Release*, 53(1), 183.
- Li, J., Revol, J. F., & Marchessault, R. H. (1996). Rheological Properties of Aqueous Suspensions of Chitin Crystallites. *Journal of Colloid Interface Science*, 183(2), 365-373.
- Lin, C.-F., Wu, C.-H., & Lai, H.-T. (2008). Dissolved organic matter and arsenic removal with coupled chitosan/UF operation. *Separation and Purification Technology*, 60(3), 292-298.
- Litowski, J. R., & Hodges, R. S. (2002). Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils. Effects of hydrophobicity and alpha-helical propensity on protein folding, stability, and specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37272-37279.
- Liu, X. D., Tokura, S., Haruki, M., Nishi, N., & Sakairi, N. (2002). Surface modification of nonporous glass beads with chitosan and their adsorption property for transition metal ions. *Carbohydrate Polymers*, 49(2), 103-108.
- Liu, Z., Jiao, Y., Liu, F., & Z., Z. (2007). Heparin/chitosan nanoparticle carriers prepared by polyelectrolyte complexation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 83A(3), 806-812.
- Lopez Arbeloa, I., & Ruiz Ojeda, P. (1982). Dimeric states of rhodamine B. *Chemical Physics Letters*, 87(6), 556-560.
- Luo, K., Yin, J., Song, Z., Cui, L., Cao, B., & Chen, X. (2008). Biodegradable Interpolyelectrolyte Complexes Based on Methoxy Poly(ethylene glycol)-b-poly(gamma,L-glutamic acid) and Chitosan. *Biomacromolecules*.

- Malafaya, P., Santos, T., van Griensven, M., & Reis, R. L. (2008). Morphology, mechanical characterization and in vivo neo-vascularization of chitosan particle aggregated scaffolds architectures. *Biomaterials*, 29(29), 3914-3926.
- Mao, H.-Q., Roy, K., Troung-Le, V. L., Janes, K. A., Lin, K. Y., Wang, Y., et al. (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 70(3), 399-421.
- Masuko, T., Iwasaki, N., Yamane, S., Funakoshi, T., Majima, T., Minami, A., et al. (2005). Chitosan-RGDSGGC conjugate as a scaffold material for musculoskeletal tissue engineering. *Biomaterials*, 26(26), 5339-5347.
- Matsuda, A., Kobayashi, H., Itoh, S., Kataoka, K., & Tanaka, J. (2005). Immobilization of laminin peptide in molecularly aligned chitosan by covalent bonding. *Biomaterials*, 26(15), 2273-2279.
- Mattioli-Belmonte, M., Gigante, A., Muzzarelli, R. A., Politano, R., De Benedittis, A., Specchia, N., et al. (1999). N,N-dicarboxymethyl chitosan as delivery agent for bone morphogenetic protein in the repair of articular cartilage. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 37(1), 130-134.
- McGhee, J. D., & Von Hippel, P. H. (1974). Theoretical aspects of DNA-protein interaction: cooperative and non cooperative binding of large ligands to a non-dimensionnal homogeneous lattice. *Journal of Molecular Biology*, 86, 469-489.
- Messner, K., & Gao, J. (1998). The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment. *Journal of Anatomy*, 193 (Pt 2)(Pt 2), 161-178.
- Mi, F.-L., Shyu, S.-S., Kuan, C.-Y., Lee, S.-T., Lu, K.-T., & Jang, S.-F. (1999). Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. I. Effect of phosphorus polyelectrolyte complex and enzymatic hydrolysis of polymer. *Journal of Applied Polymer Science*, 74(7), 1868-1879.

- Mori, T., Okumura, M., Matsuura, M., Ueno, K., Tokura, S., Okamoto, Y., et al. (1997). Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 18(13), 947-951.
- Morimoto, M., Saimoto, H., & Shigemase, Y. (2002). Control of functions of chitin and chitosan by chemical modification. *Trends in Glycoscience and Glycotechnologies*, 14(78), 205 -222.
- Muzzarelli, R. (1995). *Chitin and the human body*. Paper presented at the First International Conference of the European Chitin Science.
- Muzzarelli, R. A., Jeuniaux, C., & Gooday, G. W. (1986). *Chitin in nature and technology*. New York.
- Muzzarelli, R. A. A., Ramos, V., Stanic, V., Dubini, B., Mattioli-Belmonte, M., Tosi, G., et al. (1998). Osteogenesis promoted by calcium phosphate N,N-dicarboxymethyl chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 36(4), 267-276.
- National Center for Health Statistics. (2005). *Rate of total knee replacement for aged persons in the united States, 1979-2002*.
- Onishi, H., & Machida, Y. (1999). Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*, 20(2), 175-182.
- Papadimitriou, S., Bikiaris, D., Avgoustakis, K., Karavas, E., & Georgarakis, M. (2008). Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 44-54.
- Park, I. K., Ihm, J. E., Park, Y. H., Choi, Y. J., Kim, S. I., Kim, W. J., et al. (2003). Galactosylated chitosan (GC)-graft-poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) as hepatocyte-targeting DNA carrier: Preparation and physicochemical characterization of GC-graft-PVP/DNA complex (1). *Journal of Controlled Release*, 86(2-3), 349-359.
- Park, I. K., Kim, T. H., Park, Y. H., Shin, B. A., Choi, E. S., Chowdhury, E. H., et al. (2001). Galactosylated chitosan-graft-poly(ethylene glycol) as hepatocyte-targeting DNA carrier. *Journal of Controlled Release*, 76(3), 349-362.

- Park, Y. K., Park, Y. H., Shin, B. A., Choi, E. S., Park, Y. R., Akaike, T., et al. (2000). Galactosylated chitosan-graft-dextran as hepatocyte-targeting DNA carrier. *Journal of Controlled Release*, 69(1), 97-108.
- Peniche, C., Arguelles-Monal, W., Peniche, H., & Acosta, N. (2003). Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 511-520.
- Price, C. A. (1982). *Centrifugation in density gradient*: N.Y. Academic Press.
- Ralston, G. (1993). *Introduction to Analytical Ultracentrifugation - Beckman Coulter*.
- Rispens, T., Lakemond, C. M., Derksen, N. I., & Aalberse, R. C. (2008). Detection of conformational changes in immunoglobulin G using isothermal titration calorimetry with low-molecular-weight probes. *Analytical Biochemistry*, 380(2), 303-309.
- Rohatgi, K. K., & Singhal, G. S. (1965). Thermodynamic criteria of nature of bonding in dye aggregates. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 24(12), 623-625.
- Sæther, H. V., Holme, H. K., Maurstad, G., Smidsrød, O., & Stokke, B. T. (2008). Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 813-821.
- Sampaio, S., Taddei, P., Monti, P., Buchert, J., & Freddi, G. (2005). Enzymatic grafting of chitosan onto Bombyx mori silk fibroin: Kinetic and IR vibrational studies. *Journal of Biotechnology*, 116(1), 21-33.
- Sashiwa, H., Yamamori, N., Ichinose, Y., Sunamoto, J., & Aiba, S. i. (2003). Michael Reaction of Chitosan with Various Acryl Reagents in Water. *Biomacromolecules*, 4(5), 1250-1254.
- Sato, K., & Anzai, J.-i. (2006). Fluorometric determination of sugars using fluorescein-labeled concanavalin A-glycogen conjugates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(6), 1297-1301.
- Schachman, H. (1959). *Ultracentrifugation in biochemistry*: N.Y. Academic Press.

- Schatz, C., Domard, A., Viton, C., Pichot, C., & Delair, T. (2004). Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules*, 5(5), 1882-1892.
- Scolnik, Y., Portnaya, I., Cogan, U., Tal, S., Haimovitz, R., Fridkin, M., et al. (2006). Subtle differences in structural transitions between poly-L- and poly-D-amino acids of equal length in water. *Physical Chemistry*, 8(3), 333-339.
- Serizawa, T., Yamaguchi, M., Matsuyama, T., & Akashi, M. (2000). Alternating bioactivity of polymeric layer-by-layer assemblies: Anti-vs procoagulation of human blood on chitosan and dextran sulfate layers. *Biomacromolecules*, 1(3), 306-309.
- Silva, C. L., Pereira, J. C., Ramalho, A., Pais, A. A. C. C., & Sousa, J. J. S. (2008). Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization. *Journal of Membrane Science*, 320(1-2), 268-279.
- Sinswat, P., & Tengamnuay, P. (2003). Enhancing effect of chitosan on nasal absorption of salmon calcitonin in rats: comparison with hydroxypropyl- and dimethyl-beta-cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 257(1-2), 15-22.
- Sjoberg, R., Nygren, J., & Kubista, M. (1998). Characterization of fluorescein-oligonucleotide conjugates and measurement of local electrostatic potential. *Biopolymers*, 46(7), 445-453.
- Smith, A. E. (1995). Viral vectors in gene therapy. *Annual Review of Microbiology*, 49, 807-838.
- Socrates, G. (1995). Infrared characteristic group frequencies, second edition. Tables and charts. *Journal of the American Chemical Society*, 117(5), 1671.
- Steadman, J. R., Briggs, K. K., Rodrigo, J. J., Kocher, M. S., Gill, T. J., & Rodkey, W. G. (2003). Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy*, 19(5), 477-484.
- Tang, Y. C., & Deber, C. M. (2004). Aqueous solubility and membrane interactions of hydrophobic peptides with peptoid tags. *Biopolymers*, 76(2), 110-118.

- Tripet, B., De Crescenzo, G., Grothe, S., O'Connor-McCourt, M., & Hodges, R. S. (2002). Kinetic analysis of the interactions between troponin C and the C-terminal troponin I regulatory region and validation of a new peptide delivery/capture system used for surface plasmon resonance. *Journal of Molecular Biology*, 323(2), 345-362.
- Tripet, B., De Crescenzo, G., Grothe, S., O'Connor-McCourt, M., & Hodges, R. S. (2003). Kinetic analysis of the interactions between troponin C (TnC) and troponin I (TnI) binding peptides: evidence for separate binding sites for the 'structural' N-terminus and the 'regulatory' C-terminus of TnI on TnC. *Journal of Molecular Recognition*, 16(1), 37-53.
- Tsuchida, E., & Abe, K. (1982). Interactions between macromolecules in solution and intermacromolecular complexes. In *Interactions Between Macromolecules in Solution and Intermacromolecular Complexes* (pp. 1-119).
- Uemura, S., Rothbard, J. B., Matsushita, H., Tsao, P. S., Fathman, C. G., & Cooke, J. P. (2002). Short polymers of arginine rapidly translocate into vascular cells: effects on nitric oxide synthesis. *Journal of Circulation*, 66(12), 1155-1160.
- Valdes-Aguilera, O., & Neckers, D. C. (1989). Aggregation phenomena in xanthene dyes. *Accounts of Chemical Research*, 22(5), 171-177.
- VandeVord, P. J., Matthew, H. W., DeSilva, S. P., Mayton, L., Wu, B., & Wooley, P. H. (2002). Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J Biomed Mater Res*, 59(3), 585-590.
- Vauthier, C., Schmidt, C., & Couvreur, P. (1999). Measurement of the density of polymeric nanoparticulate drug carriers by isopycnic centrifugation. *Journal of Nanoparticle Research*, 1, 411-418.
- Velazquez-Campoy, A. (2006). Ligand binding to one-dimensional lattice-like macromolecules: analysis of the McGhee-von Hippel theory implemented in isothermal titration calorimetry. *Analytical Biochemistry*, 348(1), 94-104.
- Visser, N., Hisser, M., Van Hoer, A., & Visser, A. (1999). Comparison Between Fluorescence Correlation Spectroscopy and Time-Resolved Fluorescence

- Anisotropy as Illustrated with a Fluorescent Dextran Conjugate. *Journal of Fluorescence*, 3, 251-256.
- Voige, W. H. (1997). Principles of Biochemistry, Second Edition by H. Robert Horton, Laurence A. Moran, Raymond S. Ochs, J. David Rawn, K. Gray Scrimgeour. *Journal of Chemical Education*, 74(2), 190.
- Wydro, P., Krajewska, B., & Hac-Wydro, K. (2007). Chitosan as a lipid binder: A langmuir monolayer study of chitosan-lipid interactions. *Biomacromolecules*, 8(8), 2611-2617.
- Yi, H., Wu, L.-Q., Bentley, W. E., Ghodssi, R., Rubloff, G. W., Culver, J. N., et al. (2005). Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, 6(6), 2881-2894.
- Youling, Y., Chesnutt, B., Wright, L., Haggard, W., & Bumgardner, J. (2008). Mechanical property, degradation rate, and bone cell growth of chitosan coated titanium influenced by degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 86B(1), 245-252.
- Yu, L. M. Y., Kazazian, K., & Shoichet, M. S. (2007). Peptide surface modification of methacrylamide chitosan for neural tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 82(1), 243-255.
- Zeng, Y., Pinard, M., Jaime, J., Bourget, L., Uyen Le, P., O'Connor-McCourt, M. D., et al. (2008). A ligand-pseudoreceptor system based on de novo designed peptides for the generation of adenoviral vectors with altered tropism. *J Gene Med*, 14, 14.
- Zhao, F., Yu, B., Yue, Z., Wang, T., Wen, X., Liu, Z., et al. (2007). Preparation of porous chitosan gel beads for copper(II) ion adsorption. *Journal of Hazardous Materials*, 147(1-2), 67-73.
- Zhu, A.-p., Yuan, L.-h., Chen, T., Wu, H., & Zhao, F. (2007). Interactions between N-succinyl-chitosan and bovine serum albumin. *Carbohydrate Polymers*, 69(2), 363-370.

## ANNEXES

### 7.1. Annexe 1. Description des modèles Single Set of Identical Sites (SSIS) et de Mc Gee Van Hippel et résultats des interpolations par ces méthodes

#### 7.1.1. Modèle SSIS (Single Set of Identical Sites)

Ce modèle est le plus simple pour les interactions ligand – récepteur. Sa description est basée en grande partie sur le modèle de Scatchard de liaison ligand récepteur. Il ne prend pas en compte les effets de coopération ou d'anticoopération et ne considère que des liens sur des sites identiques et homogènes.

Le modèle SSIS est inclus dans le logiciel VP-ITC fourni avec l'appareil.

On adoptera les notations suivantes :

$K$  = constante de liaison

$n$  = nombre total de sites disponibles

$V_0$  = Volume de cellule

$M_t$  et  $[M]$  = concentration de chitosane totale et libre

$X_t$  et  $[X]$  = concentration en ligand totale et libre

$\Theta$  = fraction de sites occupés par le ligand  $X$

La définition de  $K$  mène à l'expression suivante :

$$K = \frac{[\text{occupés}]}{[\text{chitosan}]_{\text{libre}} \cdot [\text{peptide}]_{\text{libre}}} = \frac{\Theta}{(1 - \Theta) \cdot [X]}$$

Et le bilan en concentration de ligand donne :

$$X_t = [X]_{\text{libre}} + [X]_{\text{complexé}} = [X] + n \cdot \Theta \cdot M_t$$

D'où en regroupant les deux équations :

$$\Theta^2 - \Theta \cdot \left[ 1 + \frac{X_t}{n \cdot M_t} + \frac{1}{n \cdot K \cdot M_t} \right] + \frac{X_t}{n \cdot M_t} = 0$$

Donc en posant  $P(n)$  le polynôme précédent, la courbe est interpolée par  $P(n)$  et la méthode du chi-carré. Puis, on obtient après convergence les valeurs de  $K$  et de  $n$  par identification des coefficients de degré 1 et 0 de  $P(n)$ .

La valeur de  $\Delta H$  est acquise grâce aux premiers points de la courbe d'interpolation qui définissent le plateau initial.

### 7.1.2. Modèle Mc Gee Von Hippel

L'implémentation est adaptée de la publication de Mc Gee et Von Hippel (McGhee et al., 1974).

Ce modèle statistique a été conçu pour prendre en compte les phénomènes d'interaction pouvant exister entre les ligands, ce que le modèle SSIS néglige. Lorsque le ligand vient se lier à la macromolécule, il est capable d'interagir avec ses voisins de façon positive (coopération) ou négative (anti-coopération), ce que le modèle prend en compte sous la forme d'un coefficient  $\omega$ . Ce dernier est le rapport entre la constante de liaison coopérative, lors du procédé d'agrégation et la constante de liaison d'un ligand isolé, donc non agrégé.

Les notations suivantes ont été adoptées :

$N$  = Nombre total de sites de liaisons

$l$  = Nombre de sites occupés par ligand lié sur la macromolécule

$[L]_B$  = Concentration de ligands liés

$[M]_T$  = Concentration en macromolécule totale

$\nu = \frac{[L]_B}{[M]_T}$  = Nombre de ligands liés par macromolécule, cette valeur étant limité par

l'intervalle  $[0; N/l]$

$\omega$  = Constante d'équilibre entre l'état où deux ligands interagissant entre eux puis se lient à la macromolécule et l'état où ces deux ligands n'interagissent pas et sont séparés par au moins un monomère de macromolécule.

Il est à noter que la macromolécule est considérée comme infinie pour un rapport  $N/l > 30$ , ce qui est le cas ici (200 et 100 pour les peptides 5E et 10E respectivement)

L'expression suivante a été établie par Mc Gee et Von Hippel (McGhee et al., 1974) pour le nombre de ligands liés sur la macromolécule :

$$\frac{v}{[L]} = \frac{N-lv}{k} \left( \frac{(2\omega-1)(N-lv) + v - R}{2(\omega-1)(N-lv)} \right)^{l-1} \cdot \left( \frac{N-(l+1)v + R}{2(N-lv)} \right)^2$$

$$\text{avec } R = ((N-(l+1)v)^2 + 4\omega v(N-lv))^{1/2}$$

Après élimination de  $[L]$  qui n'est pas une quantité facilement accessible, le polynôme de degré  $l+3$  suivant est obtenu :

$$([L]_T - [M]_T v)(N-lv)((2\omega-1)(N-lv) + v - R)^{l-1} \times (N-(l+1)v + R)^2 - kv(2(\omega-1)(N-lv))^{l-1} \times (2(N-lv))^2 = 0$$

Cette équation peut être implémentée pour obtenir les valeurs de  $v$  pour toute valeur de  $[L]$  ou  $[M]$  suivant le sens du titrage. En d'autres termes, si le ligand est injecté dans la cellule, la concentration  $[L]$  variera, ce qui donnera une valeur de  $v$  par injection.

Cette variable  $v$  est décomposable en l'addition de 3 variables.  $v_{\text{isol}}$  représente la contribution de l'interaction de ligands isolés,  $v_{\text{sc}}$  des ligands ayant un voisin et  $v_{\text{dc}}$  de ceux en possédant deux. Leurs expressions mathématiques sont calculables à partir des données du système et des résultats du calcul précédent et sont les suivantes :

$$\begin{aligned}
v_{isol} &= ([L]_T - [M]_T v) \frac{N - lv}{k} \left( \frac{(2\omega - 1)(N - lv) + v - R}{2(\omega - 1)(N - lv)} \right)^{l+1} \\
v_{sc} &= ([L]_T - [M]_T v) \frac{\omega}{\omega - 1} \frac{(l - 1)v - N + R}{k} \\
&\times \left( \frac{(2\omega - 1)(N - lv) + v - R}{2(\omega - 1)(N - lv)} \right)^l \\
v_{dc} &= ([L]_T - [M]_T v) \left( \frac{\omega}{2(\omega - 1)} \right)^2 \frac{((l - 1)v - N + R)^2}{k(N - lv)} \\
&\times \left( \frac{(2\omega - 1)(N - lv) + v - R}{2(\omega - 1)(N - lv)} \right)^{l-1} \\
&\text{où} \\
v &= v_{isol} + v_{sc} + v_{dc}
\end{aligned}$$

Donc, il est possible de connaître la chaleur théorique dégagée par injection  $i$  selon l'article:

$$\begin{aligned}
q_i &= V(\Delta H([M]_{T,i} v_{isol,i} - (1 - \frac{v}{V})[M]_{T,i-1} v_{isol,i-1}) \\
&+ (\Delta H + \frac{\Delta h}{2})([M]_{T,i} v_{sc,i} - (1 - \frac{v}{V})[M]_{T,i-1} v_{sc,i-1}) \\
&+ (\Delta H + \Delta h)([M]_{T,i} v_{dc,i} - (1 - \frac{v}{V})[M]_{T,i-1} v_{dc,i-1}))
\end{aligned}$$

Par contre, l'équation précédente a été modifiée afin de tenir compte du volume déplacé lors de l'injection et d'ainsi accentuer la précision des résultats. La nouvelle équation se base sur le raisonnement décrit dans l'annexe du guide fourni avec l'appareil de microcalorimétrie, selon lequel une quantité de liquide dans la cellule à l'injection  $i-1$  ne se retrouvera plus dans la cellule après l'injection  $i$ , même s'il contribue à l'effet de chaleur avant d'être exclu de la cellule. Le liquide ainsi déplacé contribue à environ 50% de cet effet.

Voici donc l'équation tenant compte du volume déplacé :

$$\begin{aligned}
 q(i) = & V * (\Delta H([M]_{T,i}v_{iso,i} - [M]_{T,i-1}v_{iso,i-1} + \frac{v}{V} \frac{([M]_{T,i}v_{iso,i} + [M]_{T,i-1}v_{iso,i-1})}{2}) \\
 & + (\Delta H + \frac{\Delta h}{2})([M]_{T,i}v_{sc,i} - [M]_{T,i-1}v_{sc,i-1} + \frac{v}{V} \frac{([M]_{T,i}v_{sc,i} + [M]_{T,i-1}v_{sc,i-1})}{2}) \\
 & + (\Delta H + \Delta h)([M]_{T,i}v_{dc,i} - [M]_{T,i-1}v_{dc,i-1} + \frac{v}{V} \frac{([M]_{T,i}v_{dc,i} + [M]_{T,i-1}v_{dc,i-1})}{2}))
 \end{aligned}$$

La méthode des moindres carrés a été utilisée et la minimisation de l'expression  $|q_{\text{experimental}} - q_i|^2$  a été implémentée pour déterminer les  $q_i$  de chaque injection. Les valeurs ainsi déterminées permettent de remonter aux valeurs de  $v$  puis des paramètres thermodynamiques du système.

### 1.1.1. Résultats des interpolations des isothermes menées avec les deux modèles

#### 1.1.1.1. Analyse des isothermes peptide 5 E – chitosan

##### 1.1.1.1.1. Modèles SSIS et Mc Gee Van Hippel prenant en compte la coopération entre peptides

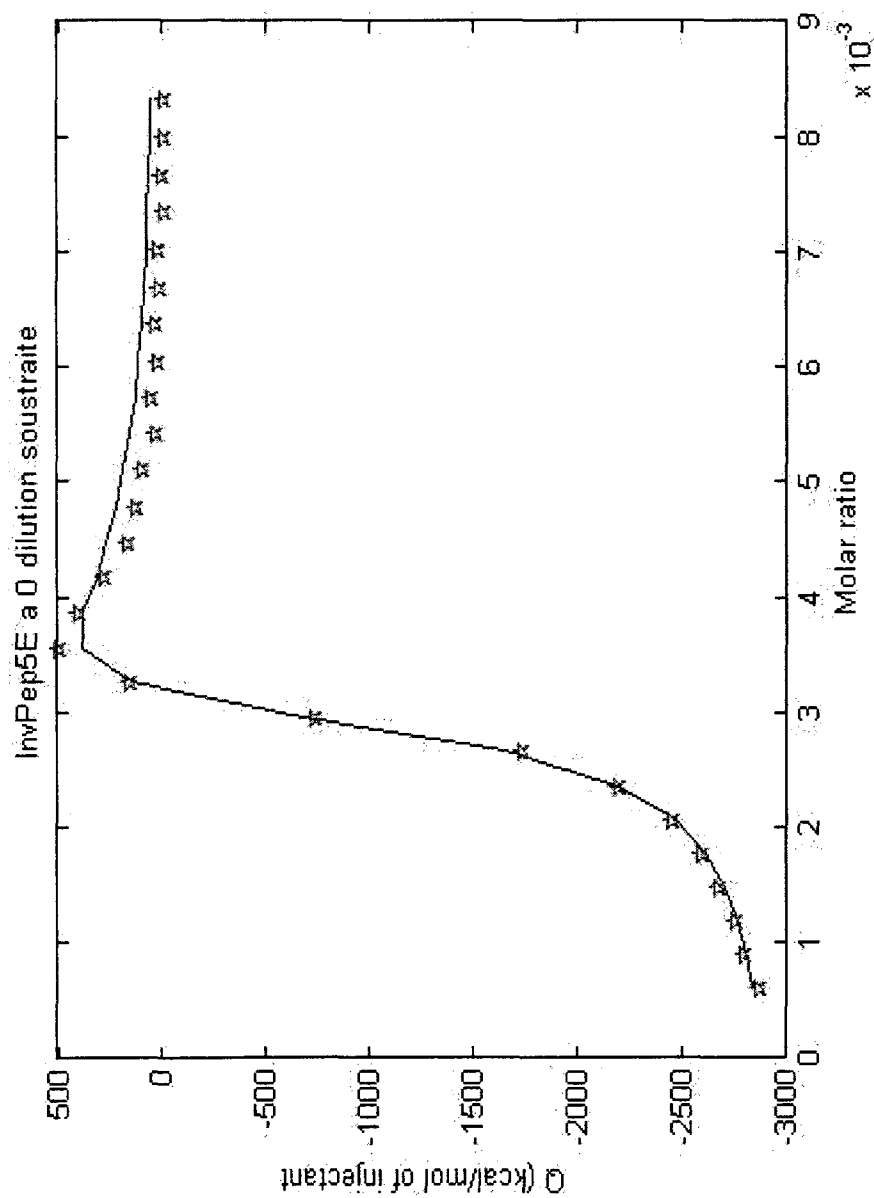


Figure 1 .Analyse des isothermes du 5E par le modèle Mc Gee Van Hippel coopératif. La concentration en peptide 5E marqué était de 0.040 mM. Les étoiles rouges représentent les données expérimentales et le trait bleu l'interpolation

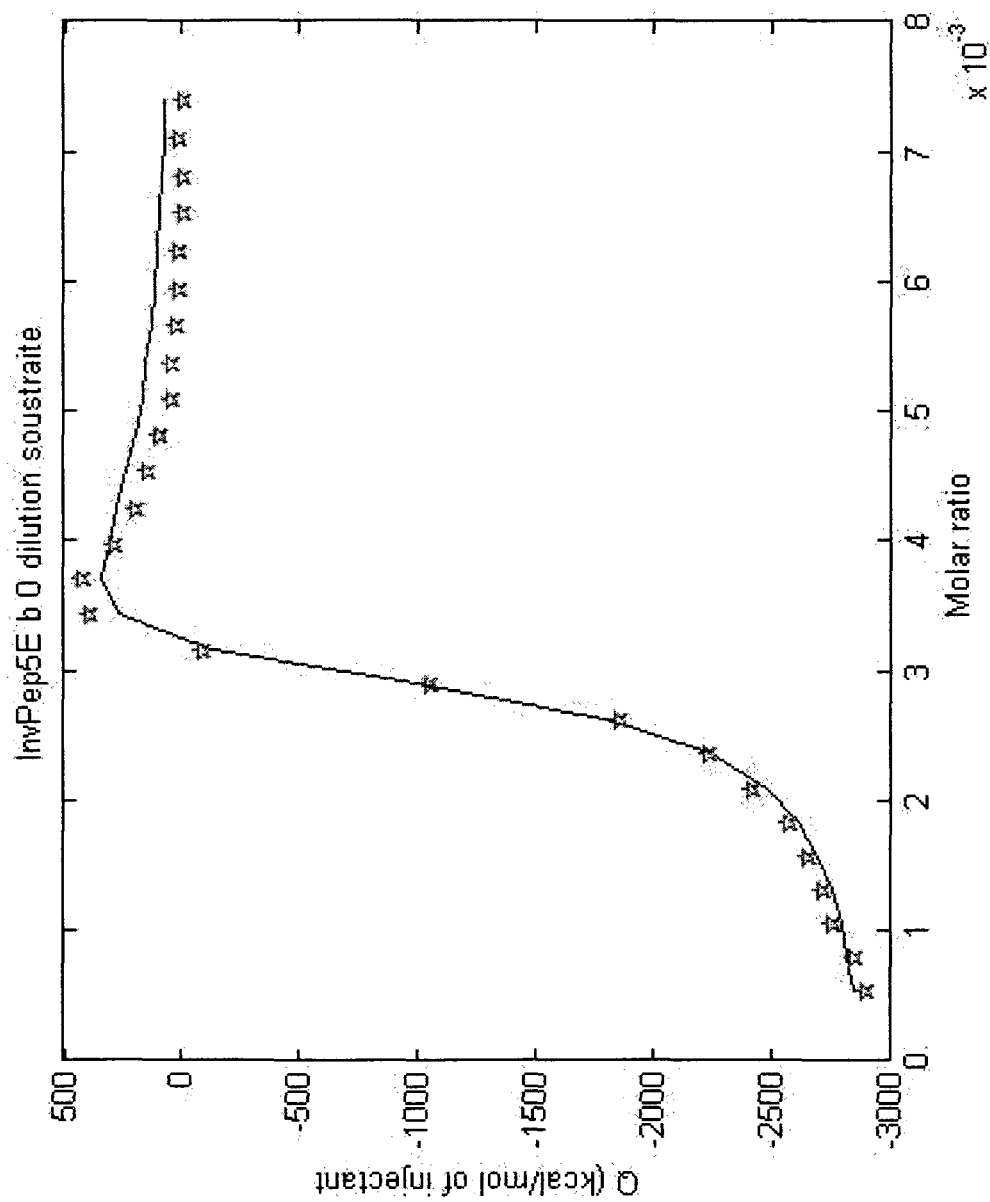


Figure.2 Analyse des isothermes du 5E par le modèle Mc Gee Van Hippel coopératif. La concentration en peptide 5E marqué était de 0.045 mM. Les étoiles rouges représentent les données expérimentales et le trait bleu l'interpolation

### 1.1.1.2. Analyse des isothermes peptide 10 E – chitosan

Comme il a été discuté dans le texte, il n'était pas nécessaire de faire appel à un modèle coopératif pour interpoler ces isothermes. Les résultats présentés ici sont uniquement issus de l'utilisation de modèles sans effet de coopération.

#### 1.1.1.2.1. Modèle SSIS

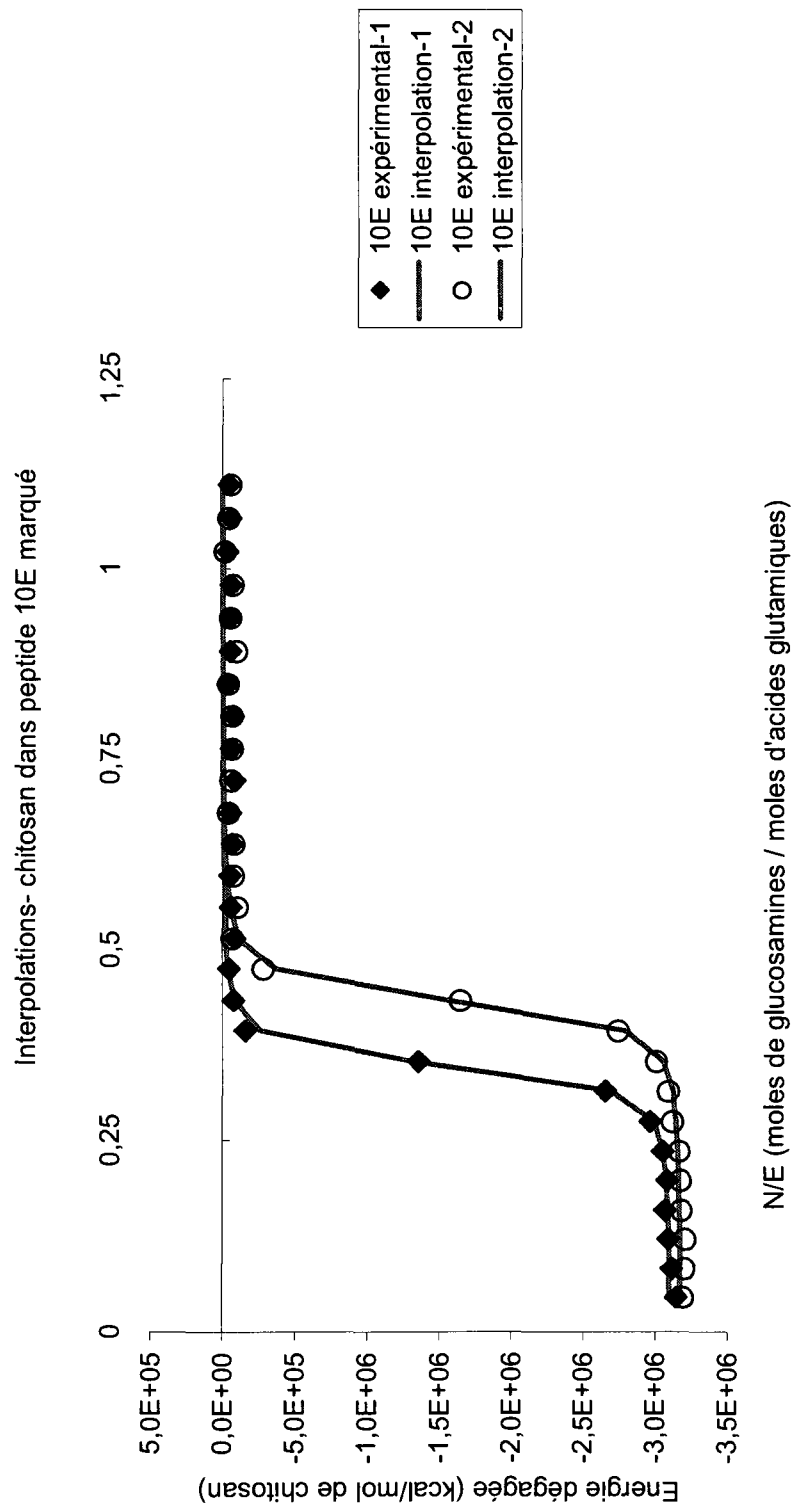


Figure 3. Interpolations des isothermes obtenus avec le modèle SSIS pour le peptide 10E 0.03 mM. Les losanges et les cercles représentent les données expérimentales et les traits rouges l'interpolation

#### 1.1.1.2.2. Modèle de Mc Gee Van Hippel

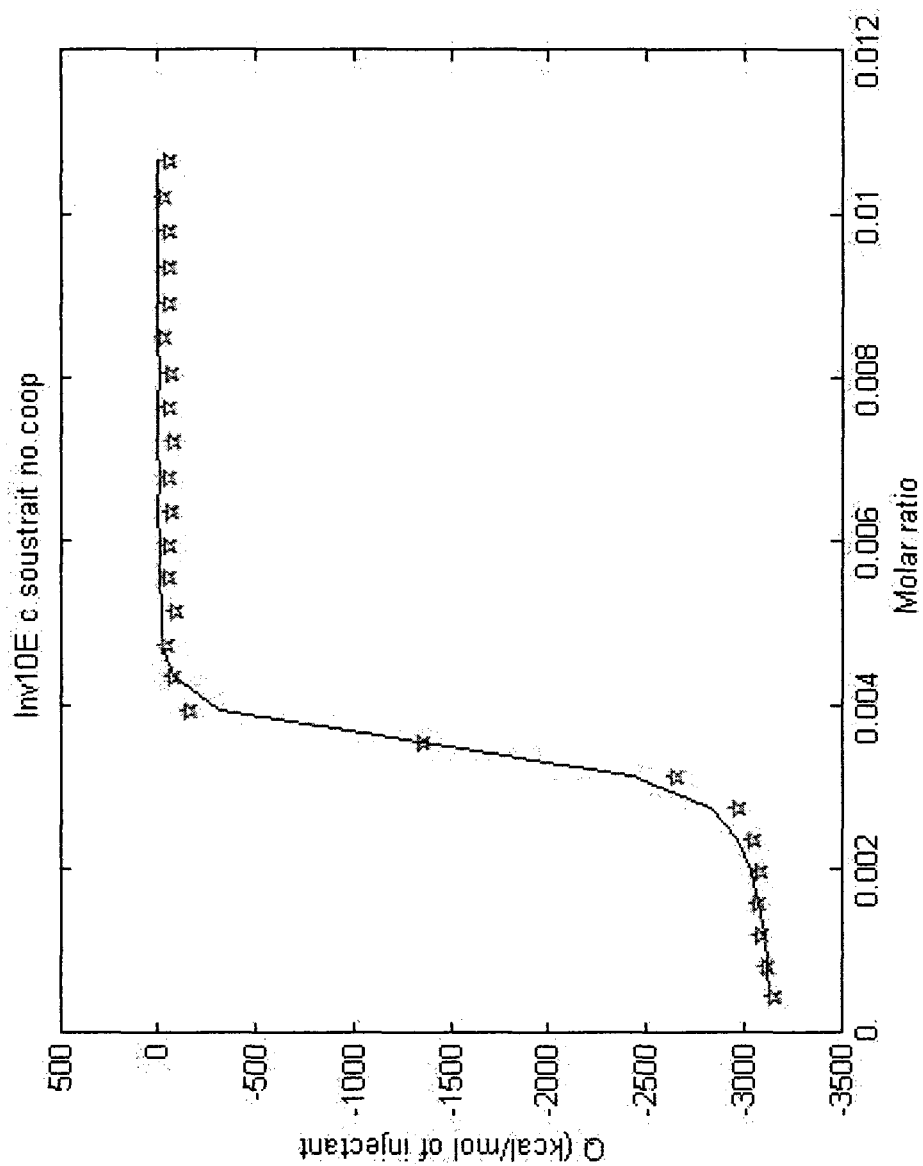


Figure 4. Interpolations des isothermes obtenus avec le modèle Mc Gee Van Hippel pour le peptide 10E 0.03 mM (1er essai). Les étoiles rouges représentent les données expérimentales et le trait bleu l'interpolation.

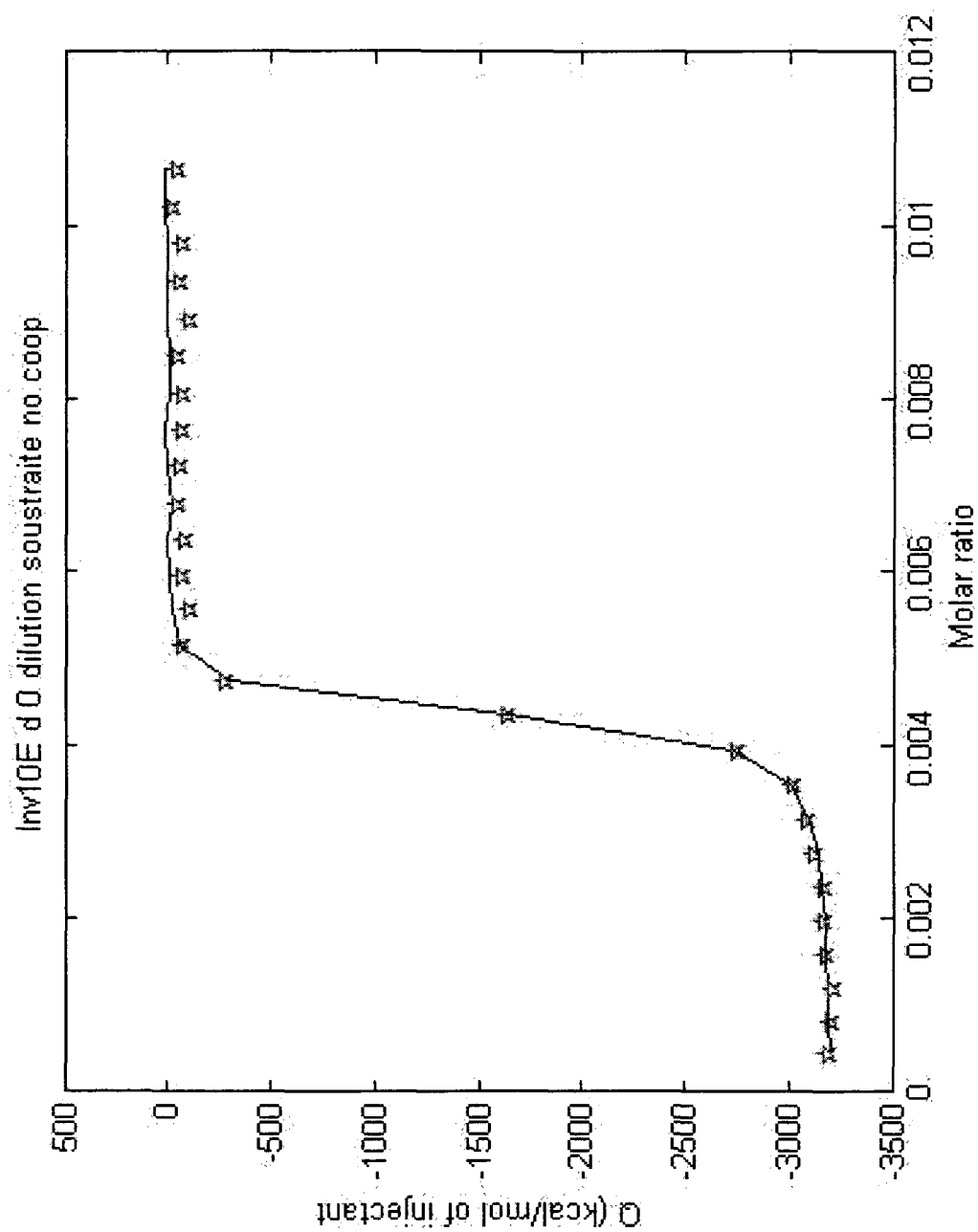


Figure 5. Interpolations des isothermes obtenus avec le modèle Mc Gee Van Hippel pour le peptide 10E 0.03 mM (2ème essai). Les étoiles rouges représentent les données expérimentales et le trait bleu l'interpolation..

### 1.1.1.3. Analyse des isothermes peptide 10 E non marqué – chitosan

#### 1.1.1.3.1. Modèle SSIS

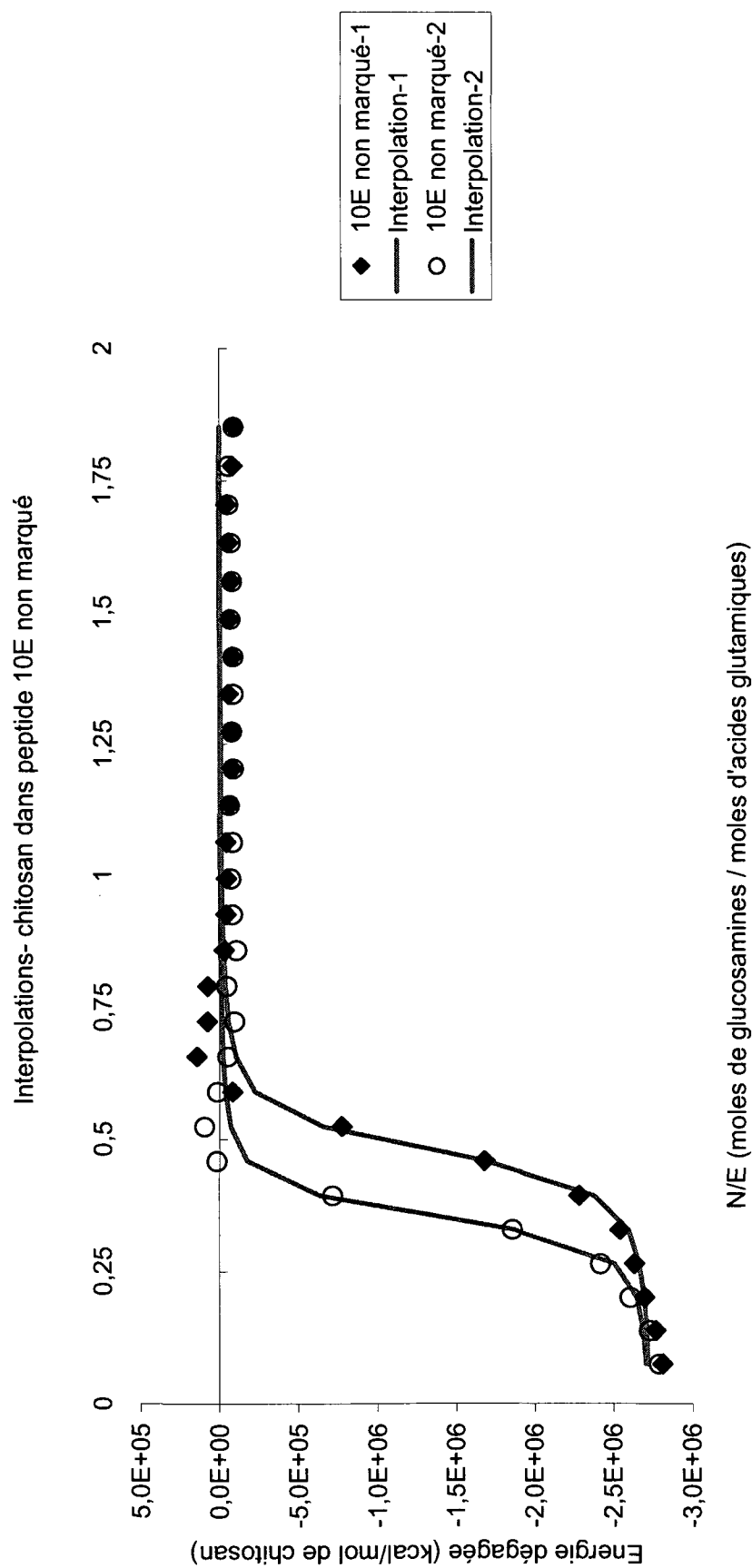


Figure 6. Interpolations par le modèle SSIS des isothermes obtenus avec le peptide 10E non marqué 0.018 mM. Les points noirs représentent les données expérimentales et le trait rouge l'interpolation.

### 1.1.1.3.2. Modèle Mc Gee Van Hippel

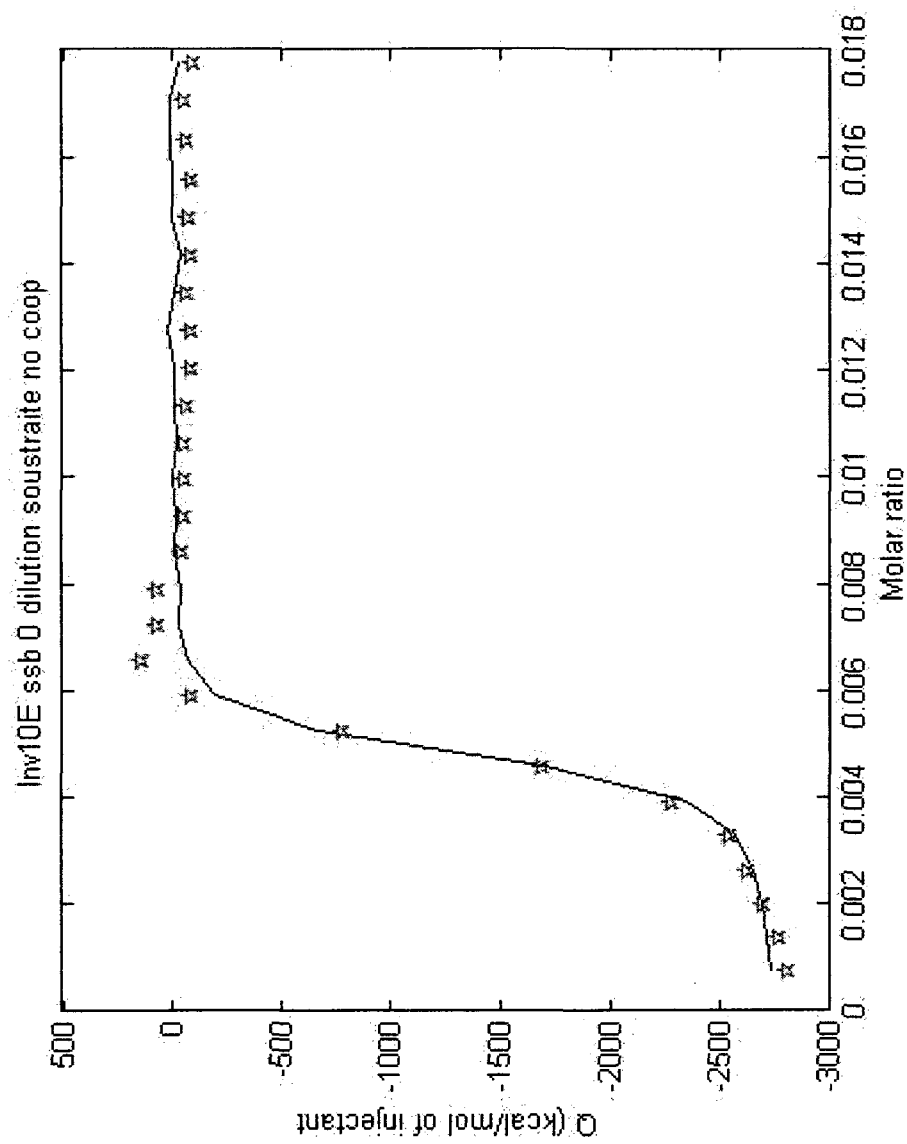


Figure 7. Interpolations par le modèle Mc Gee Van Hippel non coopératif des isothermes obtenus avec le peptide 10E non marqué 0.018 mM (1er essai). Les étoiles rouges représentent les données expérimentales et le trait bleu l'interpolation

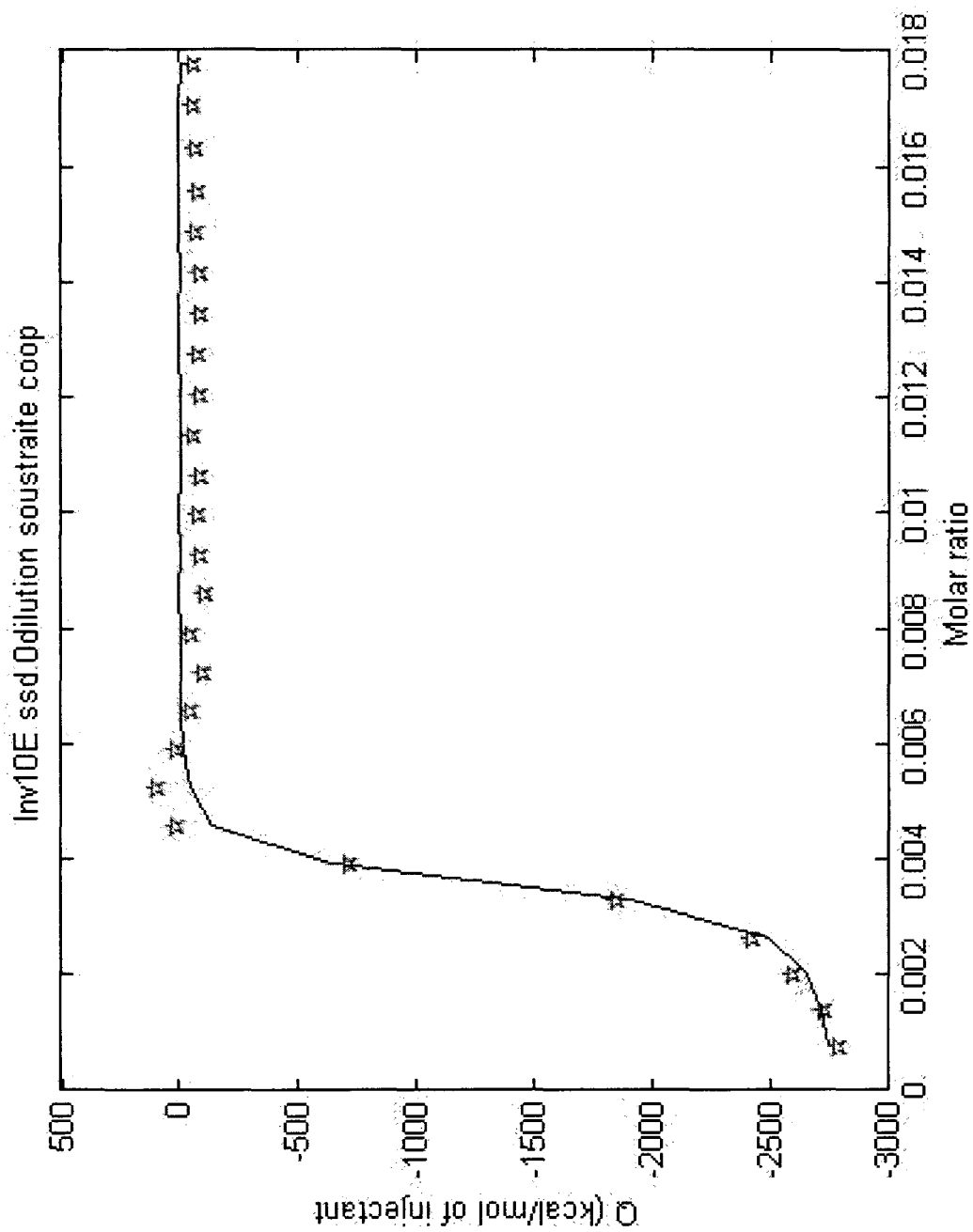


Figure 8. Interpolations par le modèle Mc Gee Van Hippel non coopératif des isothermes obtenus avec le peptide 10E non marqué 0.018 mM (2ème essai). Les étoiles rouges représentent les données expérimentales et le trait bleu l'interpolation

#### 1.1.1.4. Analyse des isothermes peptide 15E non marqué – chitosan

##### 1.1.1.4.1. Modèle SSIS

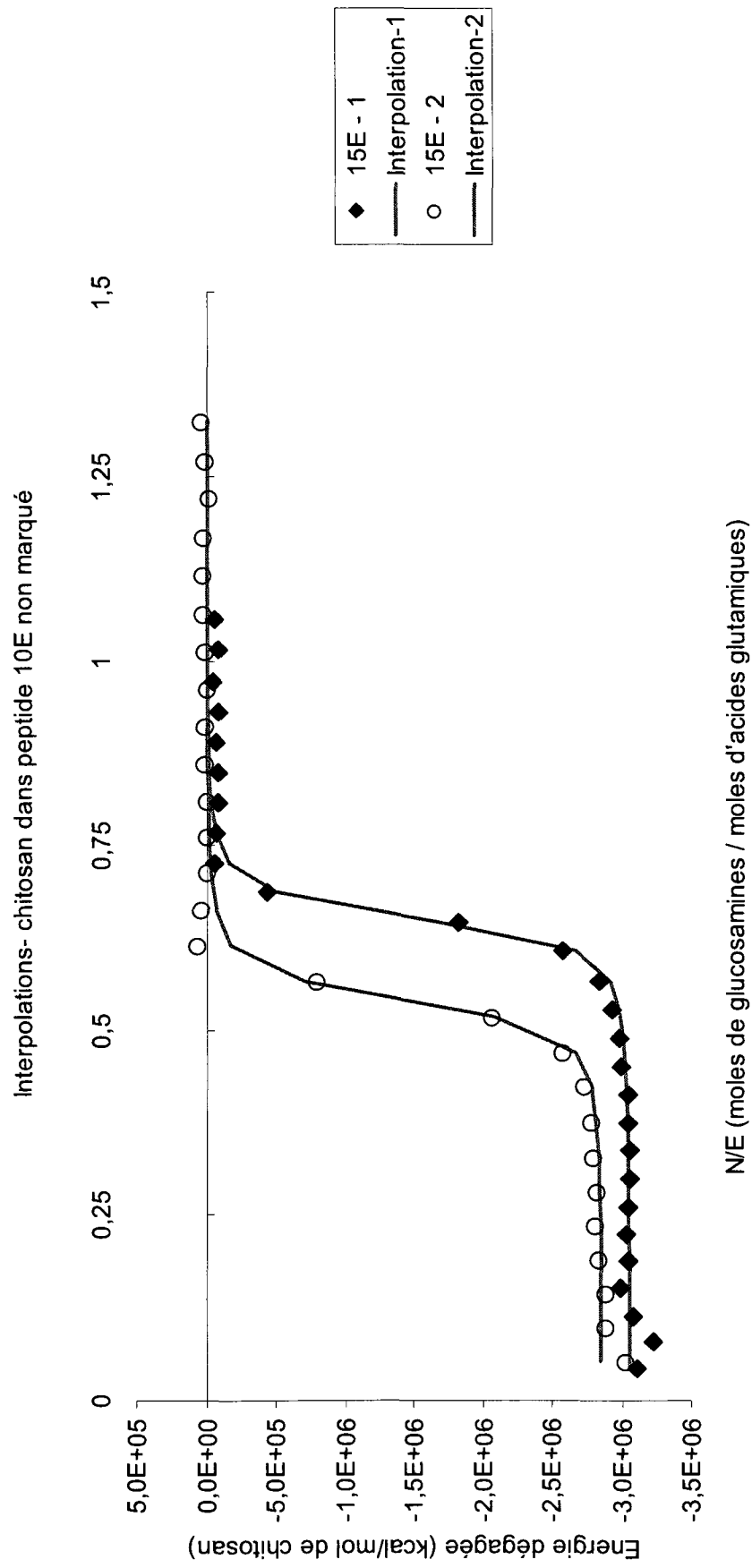


Figure 9. Interpolations par le modèle SSIS des isothermes pour une concentration de 0,021 mM de peptide 15E marqué. Les losanges et les cercles représentent les données expérimentales et le trait rouge l'interpolation.

### 1.1.1.5. Modèle Mc Gee Van Hippel

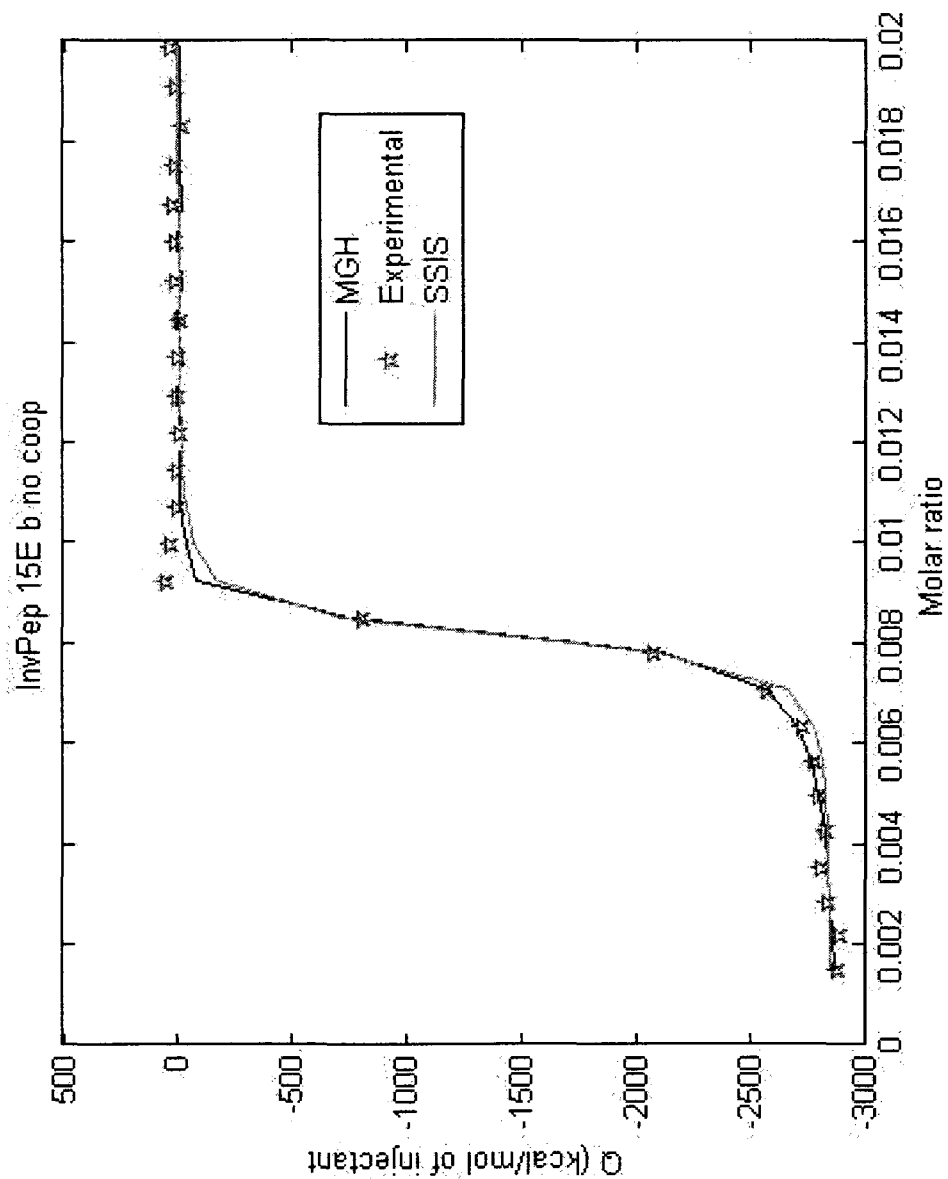


Figure 10. Interpolations par le modèle Mc Gee Van Hippel non coopératif des isothermes obtenus avec le peptide 15E non marqué 0.021 mM (1er essai). L'interpolation par le modèle SSIS est ajoutée pour comparaison

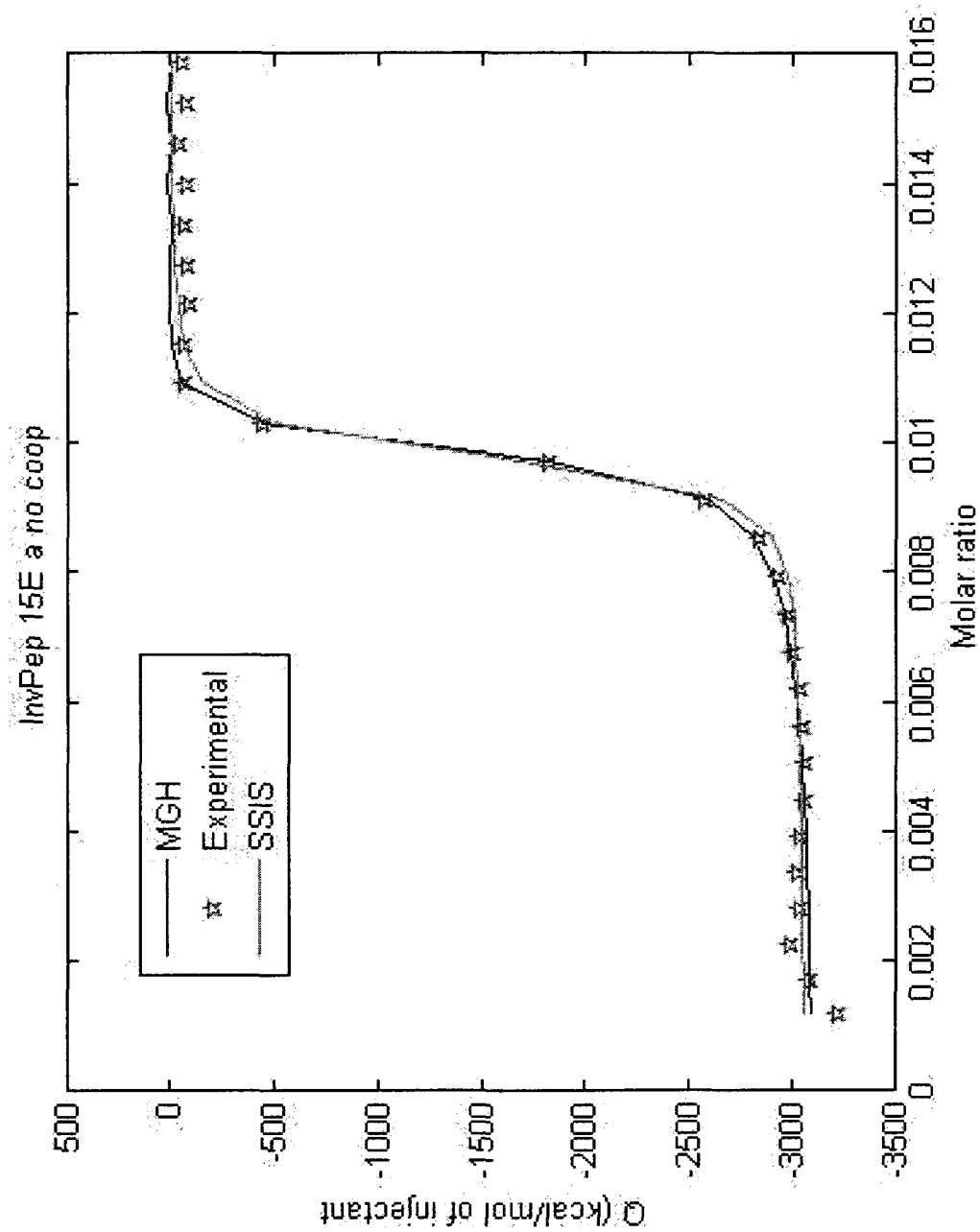


Figure 11. Interpolations par le modèle Mc Gee Van Hippel non coopératif des isothermes obtenus avec le peptide 15E non marqué 0.021 mM.  
L'interpolation par le modèle SSIS est ajoutée pour comparaison

**1.2. Annexe 2. Certificats d'analyse des peptides utilisés****1.2.1. Peptide 5E marqué**

Post Office Box 28  
Lewisville, Texas 75067-0028  
Phone: 972.420.8505  
Toll Free: 800.227.0627  
Fax: 972.420.0442  
biosyn@biosyn.com  
www.biosyn.com

**Certificate of Analysis**

Peptide Sequence: (5-FAM)-GGGEEEEEE-OH

Catalog/Quote Number:

Lot Number: T1131-1

Appearance: Yellow

Solubility:

Molecular Weight: 1191.06

Mass Spectrum: 1193.95

Purity: >80%

HPLC Enclosed: Y

Other Data: Store at -20C

Prepared By: Lan Nguyen

Date: 2/27/2008

Approved By: Moussa Ezgani

Date: 2/27/2008

*For Research use only. Not for human or veterinary use.*

## 1.2.2. Peptide 10E marqué



Post Office Box 28  
Lewisville, Texas 75067-0028  
Phone: 972.420.8505  
Toll Free: 800.227.0627  
Fax: 972.420.0442  
biosyn@biosyn.com  
www.biosyn.com

**Certificate of Analysis**

Peptide Sequence: (5-FAM)- GGGEEEEEEEEEE -OH

Catalog/Quote Number:

Lot Number: T1131-2

---

Appearance: Yellow

Solubility:

Molecular Weight: 1836.64

Mass Spectrum: 1838.98

Purity: >80%

HPLC Enclosed: Y

Other Data: Store at -20C

---

Prepared By: Lan Nguyen

Date: 2/27/2008

Approved By: Moussa Ezgani

Date: 2/27/2008

*For Research use only. Not for human or veterinary use.*

## 1.2.3. Peptide témoin



Post Office Box 28  
Lewisville, Texas 75067-0028  
Phone: 972.420.8505  
Toll Free: 800.227.0627  
Fax: 972.420.0442  
biosyn@biosyn.com  
www.biosyn.com

**Certificate of Analysis**

Peptide Sequence: (5-FAM)- GGG -OH

Catalog/Quote Number:

Lot Number: T1131-3

Appearance: Yellow

Solubility:

Molecular Weight: 547.47

Mass Spectrum: 549.98

Purity: >80%

HPLC Enclosed: Y

Other Data: Store at -20C

Prepared By: Lan Nguyen

Date: 2/27/2008

Approved By: Mona Ez-zani

Date: 2/27/2008

*For Research use only. Not for human or veterinary use.*

## 1.2.4. Peptide 5E non marqué



Post Office Box 28  
Lewisville, Texas 75067-0028  
Phone: 972.420.8505  
Toll Free: 800.227.0627  
Fax: 972.420.0442  
biosyn@biosyn.com  
www.biosyn.com

**Certificate of Analysis**

Peptide Sequence: NH<sub>2</sub>- EEEEE -OH

Catalog/Quote Number:

Lot Number: T1882-1

---

Appearance: White

Solubility:

Molecular Weight: 662.6

Mass Spectrum: 664.69

Purity: >80%

HPLC Enclosed: Y

Other Data: Store at -20C

---

Prepared By: Lan Nguyen

Date: 7/28/2008

Approved By: Mousa Saizani

Date: 7/28/2008

*For Research use only. Not for human or veterinary use.*

## 1.2.5. Peptide 10E non marqué



Post Office Box 28  
Lewisville, Texas 75067-0028  
Phone: 972.420.8505  
Toll Free: 800.227.0627  
Fax: 972.420.0442  
biosyn@biosyn.com  
www.biosyn.com

**Certificate of Analysis**Peptide Sequence: NH<sub>2</sub>- EEEEEEEEEEE -OH

Catalog/Quote Number:

Lot Number: T1882-2

Appearance: White

Solubility:

Molecular Weight: 1308.18

Mass Spectrum: 1306.95

Purity: &gt;80%

HPLC Enclosed: Y

Other Data: Store at -20C

Prepared By: Lan NguyenDate: 7/28/2008Approved By: Moussa EzganiDate: 7/28/2008*For Research use only. Not for human or veterinary use.*

## 1.2.6. Peptide 15E non marqué



Post Office Box 28  
Lewisville, Texas 75067-0028  
Phone: 972.420.8505  
Toll Free: 800.227.0627  
Fax: 972.420.0442  
biosyn@biosyn.com  
www.biosyn.com

**Certificate of Analysis**

Peptide Sequence: NH<sub>2</sub>- EEEEEEEEEEEEEEEE -OH

Catalog/Quote Number:

Lot Number: T1882-3

Appearance: White

Solubility:

Molecular Weight: 1955.76

Mass Spectrum: 1955.39

Purity: >80%

HPLC Enclosed: Y

Other Data: Store at -20C

Prepared By: Lan Nguyen

Date: 7/28/2008

Approved By: Monsieur Sazani

Date: 7/28/2008

*For Research use only. Not for human or veterinary use.*