

Table des matières

CHAPITRE 1 : MECANISME DE LA PHAGOCYTOSE	13
I. Système immunitaire	15
I.1. Immunité innée et cellules phagocytaires.....	16
I.2. Les Macrophages	17
I.3. Récepteurs de surface, mécanisme de reconnaissance	19
I.4. Elimination des cellules apoptotiques et homéostasie cellulaire.....	25
II. Mécanismes de la phagocytose	28
II.1. Mécanisme d'entrée des particules à internaliser.....	29
II.2. Rôle de la réorganisation du cytosquelette d'actine dans la phagocytose.....	31
II.3. Maturation du phagosome	33
II.4. La phagocytose et la présentation antigénique.....	34
III. Historique des études du mécanisme de la phagocytose.....	36
III.1. Particules modèles utilisées dans les études de phagocytose <i>in-vitro</i>	36
III.2. Effet de la taille des particules sur la phagocytose	37
III.3. Effet de la physico-chimie de surface de la cible sur la phagocytose.....	38
III.4. Influence de la forme des particules	39
III.5. Effet des propriétés mécaniques des particules	40
III.6. Influence de la densité d'immunoglobulines à la surface	41
IV. Influence de la mobilité des récepteurs à la membrane du macrophage.....	43
Bilan de l'étude du mécanisme de phagocytose	47
CHAPITRE 2 : EMULSIONS.....	49
I. Description générale	51
II. Agents tensioactifs	52
II.1. Généralités.....	52
II.2. Classes de tensioactifs.....	52
II.3. La HLB : <i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i>	54
III. Modes de déformation des gouttes et interfaces.....	55
IV. Techniques d'émulsification.....	56
V. Applications des émulsions en pharmacologie.....	58
V.1. Administration de principes actifs	58
V.2. Circulation des émulsions et optimisation de leur durée de vie.....	60
V.3. Vectorisation et administration ciblée de principes actifs	62

VI. Applications des émulsions en biophysique	62
VII. Gouttes d'émulsions pour l'étude de la phagocytose	65
Objectifs du travail de doctorat : Vers de nouveaux matériaux	67
CHAPITRE 3 : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES MATÉRIAUX.....	71
I. Choix de la stratégie de fonctionnalisation	74
II. Matériaux utilisés	75
III. Réalisation d'émulsions	78
III.1. Réalisation d'émulsions polydisperses par cisaillement dans un mortier.....	78
III.2. Réalisation d'une émulsion monodisperse en utilisant la "Cellule de Couette ".....	79
III.3. Vieillessement de l'émulsion.....	82
IV. Fonctionnalisation de la surface	84
IV.1. Estimation de la quantité de biotine à l'interface des gouttes	85
IV.2. Visualisation de la présence d'IgGs par microscopie de fluorescence.....	86
IV.3. Estimation du temps caractéristique d'attachement des IgGs fluorescents	87
V. Caractérisation des gouttes fonctionnalisées.....	87
V.1. Méthode de détermination de la taille et de la concentration des gouttes.....	87
V.2. Quantification de la densité d'IgGs de surface par cytométrie de flux.....	89
V.3. Spécificité de l'adsorption des IgGs à la surface des gouttes	95
V.4. Contrôle de la densité de fonctionnalisation	96
V.5. Diffusion latérale des IgGs à la surface des gouttes	99
V.6. Mesure de la tension interfaciale des gouttes.....	99
V.7. Mesure du potentiel zêta des gouttes	102
VI. Fonctionnalisation des billes de polystyrène.....	104
VI.1. Fonctionnalisation des billes par des IgGs anti-biotines	104
VI.2. Saturation de la surface des billes avec des IgGs Lapin anti Chèvre FITC.....	105
Conclusion sur les matériaux fonctionnels étudiés.....	107
CHAPITRE 4 : PHAGOCYTOSE DES GOUTTES D'ÉMULSIONS	109
I. Construction de la chambre d'observation et conditions expérimentales.....	112
II. Processus d'internalisation des gouttes d'émulsions.....	113
III. Analyse quantitative du processus de phagocytose.....	115
III.1. Choix d'une méthode de quantification de l'internalisation.....	116
III.2. Cinétique de l'internalisation	117

III.3.	Qu'en est-il des macrophages qui ne phagocytent pas ?.....	119
III.4.	Spécificité de l'internalisation des gouttes d'émulsions fonctionnalisées.....	120
III.5.	La spécificité dépend de la taille des objets à internaliser.....	122
III.6.	La phagocytose dépend de la densité d'immunoglobulines à la surface des gouttes	124
IV.	Rôle de la mobilité latérale des IgGs dans le processus de phagocytose.....	130
IV.1.	Étude de la phagocytose de billes de polystyrène fonctionnalisées.....	130
IV.2.	Dynamique des Immunoglobulines à l'interface goutte-cellule.....	133
V.	Autres observations pendant et après l'internalisation	136
V.1.	Disparition de la fluorescence des gouttes au cours de l'internalisation	136
V.2.	Déformation des gouttes pendant le processus de phagocytose	138
	Conclusion sur la phagocytose des gouttes d'émulsions fonctionnalisées	140
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	141
	ANNEXES : MATERIELS ET METHODES	147
I.	Émulsions.....	149
I.1.	Protocole de fabrication des gouttes d'émulsions fonctionnalisables	149
I.2.	Protocole de fonctionnalisation des gouttes d'émulsions avec 2.10^4 IgGs/goutte	149
I.3.	Protocole de fonctionnalisation des gouttes d'émulsions avec des concentrations croissantes d'IgGs anti-biotines	150
I.4.	Protocole de fonctionnalisation des billes PS en deux étapes	150
I.5.	Protocole de fonctionnalisation des billes de polystyrène avec les IgGs Lapin anti-chèvre FITC	151
I.6.	Préparation de la solution tampon PB/Tween 20 à 0,2% _{m/m}	152
I.7.	Routine Image J de mesure et de comptage des gouttes d'émulsions	152
II.	Étude de la phagocytose.....	153
II.1.	Dispositif expérimental, Suivi de la phagocytose	153
II.2.	Culture cellulaire	154
II.3.	Protocole de fixation des cellules.....	154
II.4.	Protocole d'immunolocalisation	154
II.5.	Observation en microscopie confocale	155
II.6.	Statistiques	155
II.7.	Données sur la lignée cellulaire RAW 264.7 Lifeact-mCherry	156
	BIBLIOGRAPHIE	161

Préambule...

La phagocytose est le processus biologique par lequel les macrophages internalisent de larges particules menant à leur destruction et élimination de l'organisme. Ce mécanisme est initié suite à la reconnaissance spécifique d'un large éventail de récepteurs extracellulaires présents à la surface des macrophages. Ce système de reconnaissance est inhérent à la défense immunitaire innée (Owen et al., 2013). Les macrophages ont aussi la particularité de capturer des antigènes par phagocytose et jouent un rôle important dans l'activation de l'immunité adaptative. Outre le rôle essentiel dans l'élimination des pathogènes, les macrophages utilisent leurs récepteurs pour éliminer les cellules apoptotiques ou sénescents. La phagocytose constitue donc un processus fondamental essentiel au système immunitaire mais joue aussi un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

Alors que la plupart des études menées reposent sur l'utilisation de particules de polymères rigides pour modéliser la phagocytose de micro-organismes pathogènes ou de cellules sénescents ou cancéreuses, les situations concrètes sont sensiblement différentes. En effet, malgré le potentiel considérable de ces particules, qui vient de leur grande variabilité ainsi que leur facilité de manipulation, les résultats obtenus demeurent incomplets. Dans les faits, rien n'assure qu'un objet en « plastique » fonctionnalisé d'une manière non spécifique peut reproduire d'une manière rigoureuse et précise le comportement de la cellule immunitaire lors de la phagocytose de grands objets tels que les cellules apoptotiques. En effet, les membranes cellulaires sont composées d'une bicouche de phospholipides dense traversée par des structures moléculaires qui diffusent librement à la surface. Cette organisation est extrêmement complexe et ne peut être modélisée par des billes en plastique rigides. De ce fait, ces particules de polymère ne peuvent pas rendre compte correctement de la dynamique qui caractérise les membranes cellulaires.

L'objectif de ce travail de doctorat est de synthétiser un matériau biomimétique qui constitue un nouveau système modèle pour l'étude de mécanismes biologiques. Il s'agit de gouttes d'émulsions fonctionnalisées avec des protéines spécifiques. Ces gouttes ont l'avantage d'être des particules liquides avec des surfaces totalement fluides où les ligands, dont la densité peut être contrôlée, sont libres de diffuser. Nous pensons que ces objets sont mieux adaptés pour la compréhension du processus de phagocytose. Nous avons cherché à comprendre plus précisément l'influence de la mobilité latérale des protéines d'intérêt sur le processus de phagocytose induite par les récepteurs FcγR. Une meilleure compréhension de ces mécanismes participant à la reconnaissance des pathogènes est nécessaire au développement futur de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ce mémoire comporte quatre parties, le premier chapitre présente les concepts nécessaires ainsi qu'une revue bibliographique des travaux existants où nous reviendrons sur les principaux résultats de phagocytose obtenus avec les particules de polymères. Ensuite, dans un deuxième chapitre nous présenterons les émulsions. Après quelques généralités nous introduirons dans un troisième chapitre le matériau que nous avons développé et les méthodes de caractérisation qui y sont associés. Enfin nous détaillerons l'utilisation de ces objets et les principaux résultats relatifs aux nouvelles propriétés obtenues des gouttes d'émulsions dans le dernier chapitre.

Chapitre 1 : Mécanisme de la phagocytose

I. Système immunitaire	15
I.1. Immunité innée et cellules phagocytaires.....	16
I.2. Les Macrophages	17
I.3. Récepteurs de surface, mécanisme de reconnaissance	19
I.4. Elimination des cellules apoptotiques et homéostasie cellulaire.....	25
II. Mécanismes de la phagocytose	28
II.1. Mécanisme d'entrée des particules à internaliser.....	29
II.2. Rôle de la réorganisation du cytosquelette d'actine dans la phagocytose.....	31
II.3. Maturation du phagosome.....	33
II.4. La phagocytose et la présentation antigénique.....	34
III. Historique des études du mécanisme de la phagocytose.....	36
III.1. Particules modèles utilisées dans les études de phagocytose <i>in-vitro</i>	36
III.2. Effet de la taille des particules sur la phagocytose	37
III.3. Effet de la physico-chimie de surface de la cible sur la phagocytose.....	38
III.4. Influence de la forme des particules	39
III.5. Effet des propriétés mécaniques des particules	40
III.6. Influence de la densité d'immunoglobulines à la surface.....	41
IV. Influence de la mobilité des récepteurs à la membrane du macrophage.....	43
Bilan de l'étude du mécanisme de phagocytose	47

En guise d'introduction, nous rappellerons les concepts de base de biologie cellulaire qui vont être utilisés tout au long de cette étude. Plus particulièrement nous allons nous intéresser au système immunitaire et aux mécanismes de défense qui contribuent au maintien de l'intégrité de l'organisme.

I. Système immunitaire

L'immunologie consiste à étudier les mécanismes physiologiques qui permettent à l'homme de se défendre contre toutes sortes d'agents infectieux présents dans son environnement.

Les mécanismes de l'immunité innée sont les premiers à se déclencher donnant une réponse rapide mais ne sont pas capables d'éliminer tous les pathogènes. En cas d'échec, le système immunitaire adaptatif, plus sévère et efficace dans l'élimination du pathogène, s'enclenche après avoir reconnu des antigènes spécifiques et permet de neutraliser l'infection (Janeway and Medzhitov, 2002).

L'ensemble des réponses immunitaires innées et adaptatives confère à l'organisme un système de défense d'une excellente efficacité. Ce système repose sur différents types de cellules qui appartiennent principalement à la famille des leucocytes (globules blancs) et sont originaires de la moelle osseuse où elles se développent (Gordon and Taylor, 2005). Certaines d'entre elles vont migrer et circuler à travers le système sanguin pour rejoindre le système lymphatique alors que d'autres vont résider dans les tissus périphériques pour les protéger contre les pathogènes. Toutes ces cellules proviennent d'un précurseur pluripotent commun dans la moelle osseuse appelée cellule souche hématopoïétique (figure 1.1). À potentiel de différenciation plus limité, il apparaît d'autres précurseurs dont le précurseur myéloïde qui est à l'origine des macrophages et des cellules dendritiques (Gordon and Taylor, 2005).

Dans le cadre de cette introduction les macrophages qui sont des cellules effectrices de l'immunité innée ainsi que les récepteurs impliqués dans la mise en place de leurs fonctions destructrices seront décrits. Un type particulier de phagocytose, celle induite par les récepteurs FcγR sera par la suite abordée. Enfin nous présenterons une revue bibliographique des études des paramètres qui régissent ce type de phagocytose.

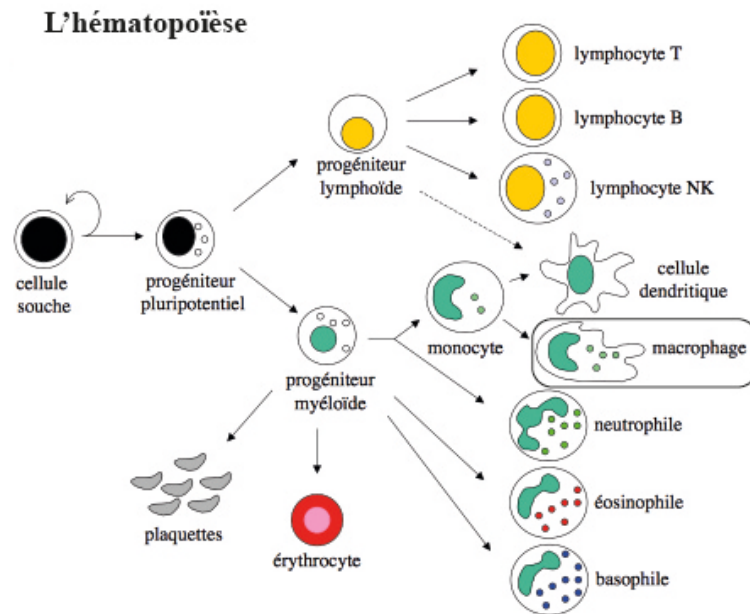


Figure 1.1. Résumé des principaux sous-ensembles de cellules progénitrices primitives, cellules progénitrices lymphoïdes (lymphocytes T et B) et myéloïdes (macrophages et dendritiques). Image adaptée de (Bottero et al., 2006).

I.1. Immunité innée et cellules phagocytaires

Notre environnement est peuplé par des micro-organismes comme les virus et les bactéries qui peuvent entrer dans l'organisme et engendrer des pathologies. Lorsqu'un micro-organisme parvient à traverser les barrières de défense naturelles comme la peau ou les muqueuses, il établit un site d'infection qui perpétue sa transmission. Une réponse immune est requise pour contrer la diffusion du pathogène.

Dans la plupart des cas, ces pathogènes sont éliminés par des cellules du système de l'immunité innée, dites effectrices, spécialisées dans l'ingestion et la destruction des micro-organismes, **les phagocytes**. Ces cellules phagocytaires appelées aussi « phagocytes professionnels » comprennent les neutrophiles présents dans le sang et les macrophages qui résident dans les tissus. Ces cellules portent à leurs surfaces des récepteurs qui leur permettent de distinguer les motifs du « non soi », qui sont des structures moléculaires exprimés à la surface des pathogènes, des motifs du « soi » (Adams and Hamilton, 1984). Le processus biologique par lequel les phagocytes peuvent ingérer et éliminer des micro-organismes est appelé phagocytose. L'internalisation s'effectue par l'intermédiaire de récepteurs et conduit à la formation d'un compartiment intracellulaire « le phagosome ». Le processus de phagocytose joue un rôle important dans la réponse immunitaire et représente la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes.

Le macrophage est la cellule phagocytaire par excellence. Ces cellules présentent une large gamme de récepteurs qui vont leur permettre de reconnaître les pathogènes et les éliminer. Dans cette

première partie du chapitre nous allons présenter ces cellules et décrire les principaux récepteurs impliqués dans l'activation du processus de phagocytose.

I.2. Les Macrophages

Les macrophages sont issus de la différenciation des monocytes qui quittent le flux sanguin et migrent vers les divers tissus sous forme de macrophages matures (Aderem and Underhill, 1999; Taylor et al., 2005). Ce sont des cellules phagocytaires qui ont une durée de vie très longue pouvant aller jusqu'à plusieurs mois (Murphy et al., 2008), contrairement aux neutrophiles qui sont présents dans les foyers d'infection et ne vivent que quelques jours (Pillay et al., 2010).

Les macrophages jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, l'élimination des cellules sénescents et la réparation des tissus après l'inflammation (Adams and Hamilton, 1984; Gordon and Taylor, 2005; Pollard, 2009). Selon leur tissu de résidence, les macrophages se spécialisent et possèdent un phénotype différent. On distingue par exemple les ostéoclastes présents dans les tissus osseux, les macrophages alvéolaires dans les poumons, les cellules de Kupffer qu'on retrouve le long de certains vaisseaux sanguins du foie ou encore les microglies qui résident dans le cerveau et la moelle épinière (Pollard, 2009). Généralement les macrophages sont les premières cellules phagocytaires qui rencontrent les micro-organismes pathogènes dans les tissus, viennent ensuite les neutrophiles en renfort. Grâce à des récepteurs portés à leurs surfaces, les macrophages reconnaissent l'agent infectieux pour entraîner sa destruction par un processus actif : la phagocytose (cf. **Figure 1.2**).

La capture des pathogènes nécessite des interactions moléculaires spécifiques entre les bactéries et la surface du macrophage et se fait de deux manières :

- Sans opsonisation : Il s'agit là d'une interaction directe entre paroi microbienne et surface du macrophage. La reconnaissance se fait grâce aux récepteurs **PRRs** (*Pattern Recognition Receptors*) membranaires qui reconnaissent les **PAMPs** (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Exemple : les récepteurs de mannose (MR).
- Avec opsonisation : dans ce cas, l'interaction nécessite une molécule intermédiaire appelée opsonine qui se fixe sur la bactérie et est reconnue par des récepteurs membranaires du macrophage (Owen et al., 2013). Les opsonines sont de deux types : les opsonines spécifiques qui désignent les anticorps et se lient à la cible en reconnaissant des antigènes spécifiques présents à sa surface, et les opsonines non spécifiques constituées d'une fraction de complément

(ex. le facteur C3b du complément) qui va directement se fixer sur des structures microbiennes (cf. **Figure 1.2**).

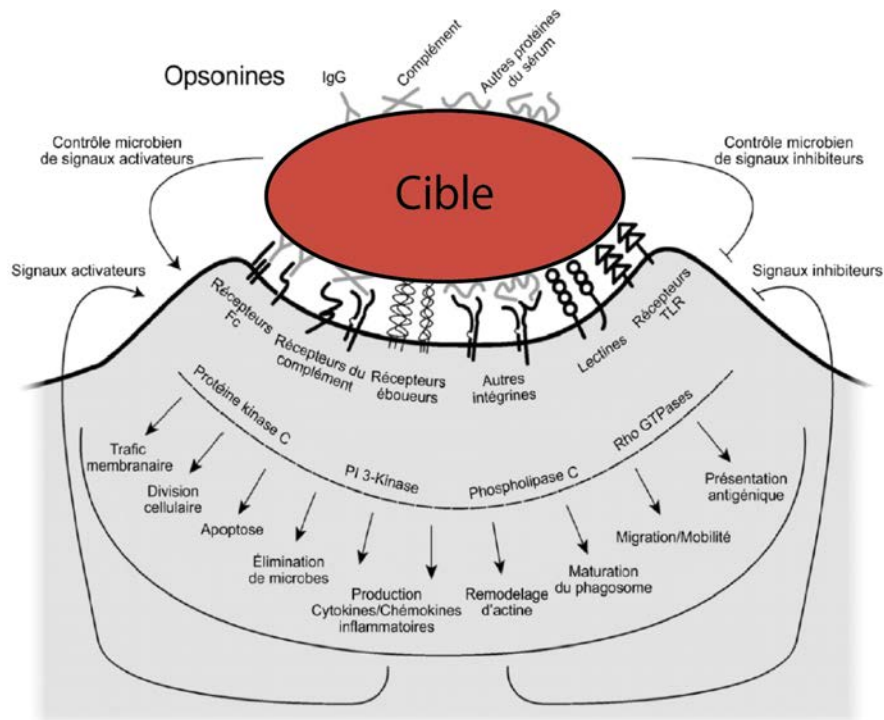


Figure 1.2. La capture des pathogènes nécessite des interactions moléculaires spécifiques entre les bactéries et la surface du macrophage et se fait de deux manières. Soit par liaison directe des récepteurs aux motifs antigéniques microbiens, soit à l'aide d'opsonines à la surface microbienne. Image adaptée de (Underhill and Ozinsky, 2002).

Le terme **PRR** a été introduit par l'immunologiste C.Janeway en 1989 et désigne les récepteurs de l'immunité innée qui reconnaissent des motifs antigéniques microbiens **PAMPs** absents des cellules du soi. Ces motifs incluent les mannanes de la paroi des levures, les lipopolysaccharides LPS des bactéries à Gram négatif, l'acide lipotéichoïque LTA de la membrane des bactéries à Gram positif et les peptides formylés des bactéries (Janeway and Medzhitov, 2002; Jr, 1992). Ils sont exprimés par toutes les cellules de l'immunité innée et peuvent être membranaires, cytoplasmiques ou sécrétés suivant leur localisation.

Les macrophages sont des cellules effectrices de l'immunité innée mais jouent aussi un rôle plus complexe en participant à l'activation et à la régulation de l'immunité adaptative. Comme les cellules dendritiques, ce sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui permettent l'instauration de l'immunité acquise ou adaptative (Miyata and van Eeden, 2011). Les macrophages contribuent donc à l'efficacité du système immunitaire.

L'activation de ces cellules et la mise en place de leurs différentes fonctions se fait suite à la perception de signaux extracellulaires via un éventail de récepteurs. Nous allons maintenant nous

intéresser aux principales catégories de récepteurs qui sont impliqués dans le processus de phagocytose.

I.3. Récepteurs de surface, mécanisme de reconnaissance

La membrane plasmique d'un macrophage contient un grand nombre de protéines, glycoprotéines et glycolipides essentiels à leurs fonctions. Ces fonctions comprennent la différenciation, la croissance et la survie, l'adhésion, la migration, et bien d'autres fonctions effectrices et de régulation dont la phagocytose. Aujourd'hui plus de 30 récepteurs spécifiques sont répertoriés (Taylor et al., 2005), certains étant présentés dans la **Table 1.1**. Les descriptions complètes de l'implication de chaque récepteur dans la phagocytose ont fait l'objet de nombreuses études (Underhill and Ozinsky, 2002).

Récepteurs	Exemple	Fonctions
Récepteur <i>scavenger</i>	SR-A/CD36	Phagocytose de bactéries et de cellules apoptotiques, endocytose des LDL oxydés.
Intégrines	CR3 (CD18/11b)	Phagocytose induite par le récepteur du complément (C3bi). Adhésion à l'endothélium.
Superfamille Ig	FcR (ITAM/ITIM)	Liaison par des anticorps Internalisation et destruction
Récepteurs de type « Toll Like »	TLR2 TLR4	Activation de NF- κ B et des MAP kinases. Réponse au LPS.
Récepteurs à 7 domaines transmembranaires	CCR2 C5aR EMR2 (EGF-TM7)	Adhésion des cellules myéloïdes. Dégranulation, chemotaxie.
Multiples domaines CLTDs (Lectines, <i>C-type lectin-like domain</i>)	MR	Phagocytose induite par le récepteur de mannose.

Table 1.1. Présentation de certains récepteurs à la surface du macrophage impliqués dans la reconnaissance immunitaire (Underhill and Ozinsky, 2002).

Plus précisément trois catégories de récepteurs membranaires extracellulaires ont été impliquées dans la capacité des macrophages à internaliser des particules portant des structures moléculaires de reconnaissance appropriées. On distingue (Aderem and Underhill, 1999):

- (a) les récepteurs aux opsonines souvent associés aux anticorps comme les récepteurs des régions Fc des immunoglobulines,
- (b) les récepteurs 3 du complément CR3,
- (c) les récepteurs de mannose/fucose/N-acetylglucosamine terminaux des glycoprotéines.

En plus de l'activation du processus de phagocytose, ces récepteurs peuvent également déclencher une variété de réponses comme la sécrétion des intermédiaires réactionnels de l'oxygène (ROI) ou encore la sécrétion des hydrolases qui sont des enzymes qu'on retrouve essentiellement dans les lysosomes (Adams and Hamilton, 1984). Nous allons décrire les principales classes de récepteurs phagocytaires et discuter leurs capacités à interagir avec leur environnement.

I.3.1. Les récepteurs Fcγ et les immunoglobulines

La plupart des connaissances des différentes voies de signalisation impliquées lors de la phagocytose viennent des études portant sur les récepteurs FcγR (Ravetch, 1997; Ravetch and Bolland, 2001; Ravetch and Clynes, 1998). Ces récepteurs reconnaissent le fragment Fc, portion constante portée par la superfamille des immunoglobulines (IgG).

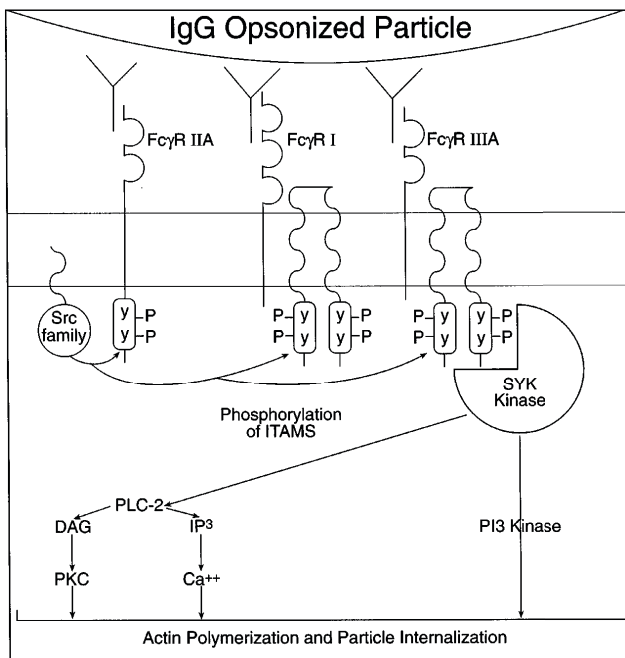


Figure 1.3. Les récepteurs Fcγ induisent la phagocytose via leurs domaines ITAM. Les motifs ITAM se trouvent dans les domaines intracellulaires et induisent le recrutement des kinases et l'activation des cascades de phosphorylation qui aboutissent à la polymérisation de l'actine et l'internalisation de la particule. Image adaptée de (Aderem and Underhill, 1999).

Ces récepteurs FcγR sont répertoriés en deux catégories : ceux qui possèdent des motifs ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) et sont généralement impliqués dans l'activation des macrophages et la mise en œuvre des fonctions effectrices, et ceux qui inhibent ces mêmes fonctions et portent des motifs ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*). Les motifs ITAM se trouvent dans les domaines intracellulaires et sont phosphorylés suite à la reconnaissance du ligand par le récepteur. Cette phosphorylation induit le recrutement des kinases et l'activation des cascades de phosphorylation ce qui permet la mise en place de multiples cascades de signalisation qui aboutissent à l'internalisation de la particule (cf. **Figure 1.3**). Le signal ne peut être transmis par le ligand seul. En revanche, les motifs ITIM recrutent les phosphatases qui inhibent les cascades de signalisation intracellulaire (Daëron, 1997; Ravetch, 1997; Ravetch and Bolland, 2001; Underhill and Ozinsky, 2002).

Dans le cas des macrophages, les récepteurs Fc γ R qui induisent la phagocytose font partie de la première classe de récepteurs d'activation (ceux qui possèdent les motifs ITAM) et comprennent les Fc γ R I, Fc γ R IIA, et Fc γ R III. Ces récepteurs sont présents à la surface de la plupart des cellules effectrices du système immunitaire.

En général, les Fc γ R qui induisent la phagocytose et ceux qui l'inhibent sont exprimés à la surface de la même cellule. L'expression conjointe des récepteurs inhibiteurs et activateurs est un facteur important de la régulation de la réponse immunitaire. Les IgGs sont reconnus et liés aux deux types de récepteurs dont le taux d'expression déterminera la réponse cellulaire (Ravetch and Bolland, 2001). Ainsi, ces récepteurs, exprimés à la surface des macrophages, vont reconnaître les particules opsonisées par des immunoglobulines IgGs et déclencher l'internalisation par la polymérisation de l'actine et l'extension de la membrane cellulaire pour entourer la particule et la phagocyter (Aderem and Underhill, 1999).

Ces immunoglobulines sont donc responsables de l'activation des macrophages à travers l'interaction avec les récepteurs Fc γ R. Nous allons par la suite nous intéresser à la structure de ces molécules.

3.1.1 Immunoglobulines G (IgG)

La superfamille des immunoglobulines (Ig) est constituée de glycoprotéines présentes à la surface des cellules qui jouent un rôle important dans la reconnaissance et la liaison aux antigènes ou l'adhésion des cellules (Owen et al., 2013). On distingue cinq types d'immunoglobulines ou anticorps : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM synthétisées par les plasmocytes (différenciation des lymphocyte B). L'immunoglobuline « typique » et la plus abondante dans le sérum, est l'IgG. Toutes les immunoglobulines possèdent une structure de base sous forme de Y qui comporte quatre chaînes polypeptidiques groupées en deux paires. Deux chaînes légères L (*Light*) et deux chaînes lourdes H (*Heavy*) qui sont reliées par des ponts disulfure (S-S). Les immunoglobulines les plus abondantes sont les IgGs qui représentent 75 à 80% du contenu en immunoglobulines du sérum humain.

Ces anticorps ont une masse molaire d'environ 150 kDa (Edelman, 1969). Dans une molécule d'immunoglobuline donnée, les deux chaînes lourdes et deux chaînes légères sont identiques, ce qui donne une molécule d'anticorps comportant deux sites de liaison identiques aux antigènes, et donc la capacité à se lier simultanément à deux structures identiques (Janeway et al., 2001). Chaque chaîne est constituée de séquences d'environ 110 acides aminés environ. La chaîne légère est constituée de deux de ces domaines (220 acides aminés) tandis que la chaîne lourde en possède quatre (440 acides

aminés). Chacune de ces deux chaînes est constituée d'une région constante et d'une région variable :

- la chaîne légère possède : un domaine variable (V_L)
un domaine constant (C_L)
- la chaîne lourde possède : un domaine variable (V_H)
un domaine constant (CH_1, CH_2, CH_3)

L'association des domaines V_L , V_H , C_L et CH_1 constitue le fragment Fab qui permet la fixation de l'antigène (**Figure 1.4**). Ces molécules sont donc bi-fonctionnelles et présentent d'une part deux sites de fixation à l'antigène identiques et d'autre part, une partie constante formée des deux chaînes lourdes associées (CH_2, CH_3) qui constituent le fragment Fc (Fragment cristallisable) reconnu comme étant le support des propriétés biologiques de l'immunoglobuline. L'action d'enzymes spécifiques permet d'isoler différents fragments dont le fragment cristallisable Fc qui permet à la molécule d'IgG de se fixer à un récepteur cellulaire approprié et à activer le complément.

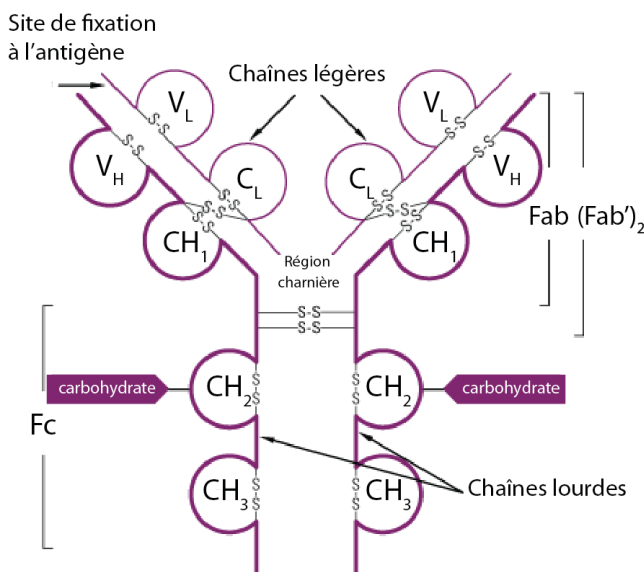
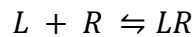


Figure 1.4. Structure d'une immunoglobuline IgG (anticorps). La molécule est constituée de deux chaînes légères identiques et de deux chaînes lourdes identiques reliées ensemble par des ponts disulfure. Les régions variables V_H et V_L représentent les sites de fixation à l'antigène. Adaptée de « Thermo Scientific Pierce Antibody Production and Purification Technical Handbook, version 2 ».

Outre les récepteurs pour la partie constante des immunoglobulines, il existe aussi les récepteurs des protéines du complément.

3.1.2 Constantes d'équilibre d'interactions associées aux IgGs

La formation d'une liaison ligand-récepteur est décrite par un mécanisme bi-moléculaire dont l'équation bilan s'écrit :



La formation d'un lien L-R peut être homolytique, si le ligand et le récepteur sont de la même famille ou hétérolytique si le ligand et le récepteur sont complémentaires mais structuellement différents (cf. **Figure 1.5**).

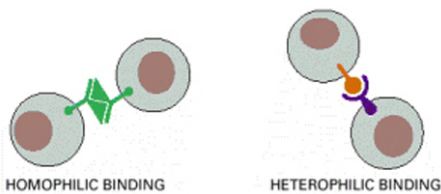


Figure 1.5. Représentation des différents types d'assemblages entre un ligand et un récepteur : (a) homophilique : le ligand et le récepteur sont identiques; (b) hétérophilique : le ligand et le récepteur sont différents mais complémentaires (Alberts et *al.*, 2008).

Les constantes cinétiques d'attachement k_{on} et de détachement k_{off} sont liées à la constante d'affinité de l'équilibre :

$$K_a = \frac{k_{on}}{k_{off}} \frac{[M^{-1} \cdot s^{-1}]}{[s^{-1}]} \quad (1)$$

dont l'énergie libre associée peut varier de quelques fractions de kT à 35 kT pour le couple streptavidine-biotine ($10^4 \leq K_a \leq 10^{15} \text{ M}^{-1}$). En général, les énergies sont de l'ordre de la dizaine de kT . Les constantes cinétiques k_{on} et k_{off} dépendent non seulement des couples choisis et des conditions physico-chimiques, mais aussi des contraintes mécaniques appliquées aux molécules et aux degrés de liberté qui leur sont accessibles (Bongrand, 1999).

Le k_{on} d'un couple se décompose en un terme de diffusion des espèces et un terme de réaction. En solution, seule la composante diffusionnelle est limitante, ce qui explique la gamme étroite des valeurs mesurées pour des couples L/R différents ($10^6 \leq k_{on} \leq 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Voss, 1993). La gamme des k_{off} mesurés est beaucoup plus étendue ($10^{-6} \leq k_{off} \leq 10^4 \text{ s}^{-1}$), impliquant que le temps de vie $t_{off} = 1/k_{off}$ d'une liaison L/R à force nulle puisse s'étendre de quelques millisecondes à plusieurs jours.

I.3.2. Les récepteurs du complément

Le système du complément regroupe environ une trentaine de protéines présentes dans le sérum et joue un rôle important dans l'immunité innée et adaptative. Ces protéines interagissent les unes avec les autres et sont activées par des cascades de coupures enzymatiques. L'activation des protéines du complément a plusieurs conséquences. Elle conduit à l'opsonisation, induit des réponses inflammatoires et permet d'éliminer des complexes immuns du sérum et des cellules apoptotiques.

Suite à l'activation du complément certaines protéines sont clivées en deux fragments comme par exemple la lyse de C3 qui conduit au C3b et C3a. Le C3b est le plus grand fragment et se fixe de façon covalente à la surface de la cellule et son devenir est multiple.

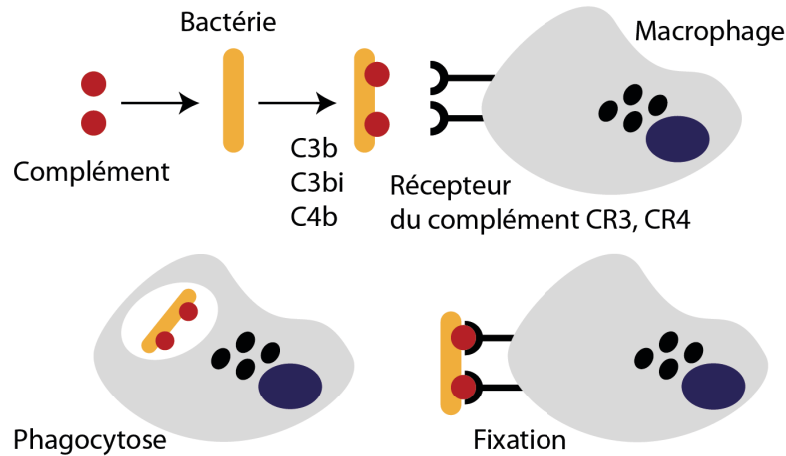


Figure 1.6. Opsonisation de la bactérie par les fragments du complément activé et reconnaissance à travers les récepteurs CR3 et CR4 à la surface du macrophage induisant la phagocytose.

Le fragment C3a est une petite molécule libérée en phase fluide et agit comme un signal qui induit une réaction inflammatoire (Owen et al., 2013). Les fragments du clivage du C3, les C3b ou C3bi, *i.e.* C3b inactivé, peuvent aussi opsoniser des bactéries en se fixant sur des molécules présentes à leurs surfaces, et induire leur phagocytose par des récepteurs CRs (CR1, CR3 et CR4) exprimés à la surface des macrophages (cf. **Figure 1.6**) (Adams and Hamilton, 1984).

La phagocytose induite par les récepteurs du complément CRs nécessite une étape d'activation supplémentaire qui augmente le nombre de récepteurs à la surface cellulaire. En effet, les récepteurs CRs peuvent lier les particules opsonisées mais ne peuvent les internaliser en absence de facteurs stimulants supplémentaires. Ces protéines activatrices peuvent être des cytokines inflammatoires, des composants microbiens comme le LPS, ou de la fibronectine recouvrant les substrats (Pommier et al., 1983; Wright et al., 1983). D'autre part, tous les types de phagocytoses exigent la polymérisation de l'actine dans les sites de l'ingestion de la particule, cependant des résultats en microscopie électronique démontrent que l'ingestion des particules opsonisées par des IgGs diffère de celles opsonisées par des composants du complément. Alors que la phagocytose induite par les récepteurs FcγR se produit par un mécanisme dit de « zippering » ou fermeture à glissière (Bianco et al., 1975; Swanson and Baer, 1995), les données en microscopie électronique montrent que la phagocytose induite par les récepteur du complément est un processus passif, plus lent, dans lequel les particules pénètrent à l'intérieur de la cellule sans extension de la membrane comme pour le modèle classique de « fermeture à glissière » (Allen, 1996; Kaplan, 1977). Le processus de phagocytose induit par les

récepteurs du complément se différencie donc morphologiquement de celle induite par les récepteurs Fc γ R.

I.3.3. Les récepteurs de mannose

Dans le cas de micro-organismes, on observe une phagocytose liée à l'intervention d'un récepteur spécifique d'un fragment présent en surface de ces pathogènes : le récepteur du mannose (MR). Ce récepteur, à la surface des macrophages, reconnaît le mannose, le fucose et le N-acetylglucosamine terminaux des glycoprotéines de la catégorie des **PAMPS** présents à la surface des micro-organismes (Aderem and Underhill, 1999; Taylor et al., 2005). C'est une protéine transmembranaire dont l'extrémité C-terminale est cruciale dans l'activation des fonctions phagocytaires (Stahl and Ezekowitz, 1998). Cependant la fonction de ce récepteur reste incertaine ainsi que les signaux activés durant la phagocytose résultante de celui-ci, (Aderem and Underhill, 1999; Sung et al., 1983). Ainsi nous venons de voir les trois principaux récepteurs impliqués dans la phagocytose de pathogènes. Il serait tout aussi intéressant d'étudier l'exemple de la phagocytose de cellules apoptotiques qui est un processus particulier ainsi que les récepteurs qui y sont impliqués. C'est ce point que nous allons détailler maintenant.

I.4. Elimination des cellules apoptotiques et homéostasie cellulaire

L'élimination de la cellule en apoptose est un cas particulier de la phagocytose et participe au maintien de l'homéostasie cellulaire. Les objets à internaliser sont, dans ce cas précis, des cellules du soi et non pas des micro-organismes pathogènes. Une problématique se pose alors : Comment le macrophage peut-il distinguer les cellules viables des cellules apoptotiques ? Pour cela, au cours de l'apoptose, des modifications de la surface cellulaire ont lieu, ce qui constitue le fondement de la reconnaissance de la cellule apoptotique par le macrophage (cf. **Figure 1.7**). Les cellules mourantes vont réduire l'expression de signaux « *don't eat me* » pour limiter leur reconnaissance et exposer des molécules de surface, les signaux « *eat me* » et induire leur reconnaissance par le macrophage (Brown and Neher, 2012). En plus des modifications de surface, la cellule mourante est capable de sécréter des substances solubles qui agissent comme un signal d'attraction et assurent leur élimination par les macrophages (Lauber et al., 2003).

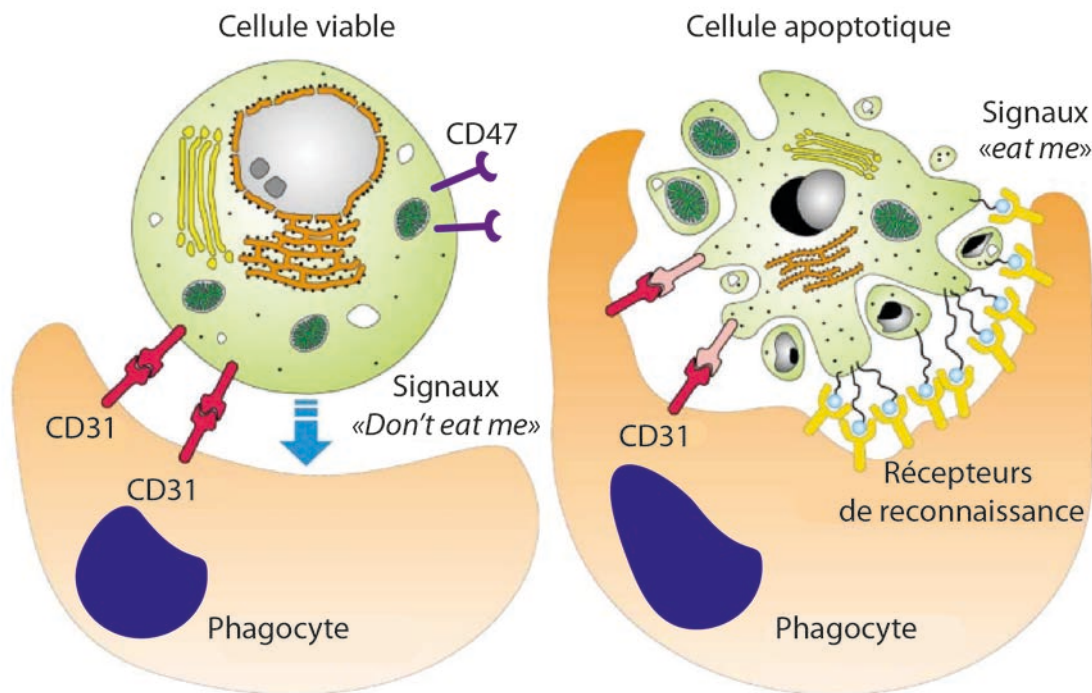


Figure 1.7. Représentation schématique de la phagocytose de cellules apoptotiques par la reconnaissance des signaux « eat me ». Image adaptée de (Lauber et al., 2004).

Il a été démontré que les cellules qui exposent les protéines CD47, CD31 et CD200 arrivent à se protéger activement de l'élimination par phagocytose (Brown and Neher, 2012). Le CD47 qui sert de signal « don't eat me » est exprimé à la surface de la plupart des cellules et bloque la phagocytose par l'activation du récepteur SIRPa présent à la surface du macrophage et qui l'identifie en tant que « soi » et n'est donc pas détruit.

Les ligands impliqués dans la reconnaissance de la cellule, les signaux « eat me », les mieux caractérisés sont la phosphatidylsérine (PS), un phospholipide exposé sur le feuillet externe de la membrane cellulaire et qui est un signal efficacement reconnu par le macrophage (Ravichandran, 2011). D'autres modifications concernent les chaînes oligosaccharidiques exposées à la surface cellulaire qui sont altérées et résultent de la glycosylation incomplète des protéines de surface. Des modifications de la charge de surface participent aussi à la reconnaissance de la cellule apoptotique (Aderem and Underhill, 1999). Les lipides membranaires subissent aussi des changements. L'oxydation des lipoprotéines basse densité OxLDL (*oxidized low density lipoprotein*) a notamment été décrite et leur présence est considérée comme essentielle pour la reconnaissance et la phagocytose (Greenberg et al., 2006).

Des études récentes montrent qu'il existe des récepteurs à la surface du macrophage qui sont directement impliqués dans ce processus (Olsson and Oldenborg, 2008; Ravichandran, 2011). On peut citer les récepteurs *scavengers* de classe A et de classe B, les CD36 ainsi que le CD14

(Ravichandran, 2011). Tous reconnaissent les motifs oxydés exposés en surface des cellules apoptotiques. Le CD36, par exemple, a été identifié comme étant l'un des récepteurs de la phosphatidylsérine (PS) ainsi que des LDL oxydés (oxLDL) (Greenberg et al., 2006). Le CD14 principalement connu pour être le récepteur des lipopolysaccharide (LPS) a été mis en évidence pour son rôle dans l'élimination des cellules apoptotiques (Devitt et al., 2003). Ce récepteur a la capacité de reconnaître les motifs ICAM-3 (*Intracellular Adhesion Molecule – 3*) présents à la surface des cellules mourantes et considéré comme un signal « *eat me* ». Ce récepteur a aussi la capacité d'interagir avec les phospholipides mais ne reconnaît pas spécifiquement les résidus phosphatidylsérine (Devitt et al., 2003).

Ainsi, les macrophages jouent un rôle important, outre l'élimination des pathogènes exogènes, dans l'élimination des cellules apoptotiques. Ce processus résulte d'un mécanisme complexe mettant en jeu des cascades de signaux qui diffèrent en fonction de la nature de l'objet à phagocyter.

II. Mécanismes de la phagocytose

Le concept fondamental du mécanisme de phagocytose par l'activation des macrophages date de la fin du dix neuvième siècle lorsqu'Elie Metchnikoff parvient à définir l'existence de phagocytes mononucléaires et leur capacité à tuer les micro-organismes par le processus de phagocytose. Cette découverte lui a valu le prix Nobel de médecine en 1908. Depuis, les recherches scientifiques sur l'étude des mécanismes de défense contre les infections ne cessent d'être publiées (Tan and Dee, 2009; Tauber and Chernyak, 1989), (cf. **Figure 1.8**).

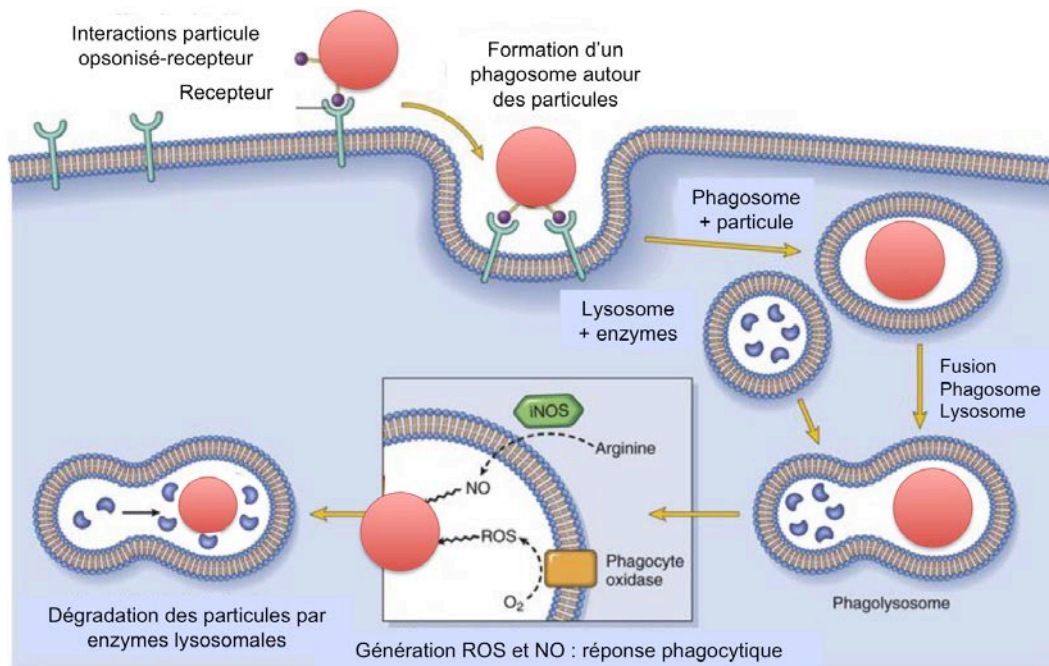


Figure 1.8. Représentation schématique du processus de phagocytose. Après reconnaissance de la particule, il y a ingestion et création du phagosome, qui mature en phagolysosome pour la dégradation par des enzymes et des espèces radicalaires (Robbins et al., 2012).

Le processus de phagocytose tel que définit aujourd'hui est caractérisé par trois étapes principales ; (a) la phase d'adhésion qui s'effectue grâce à des récepteurs des micro-organismes étrangers ou de cellules sénescents présents à la surface du macrophage, ou par l'intermédiaire des récepteurs aux opsonines, (b) la phase d'internalisation ou ingestion qui aboutit à la formation du phagosome et enfin (c) la phase de dégradation par divers enzymes qui s'accumulent dans le phagosome suite à sa fusion avec les lysosomes. C'est la reconnaissance de la particule qui permet d'enclencher la cascade de signaux qui aboutissent à la polymérisation de l'actine, la production de divers produits toxiques et la synthèse de cytokines et de chémokines anti-inflammatoires.

Tous les récepteurs de phagocytose activent la polymérisation de l'actine qui sert de moteur à l'extension de la membrane (Swanson, 2008). En quelques secondes, après la reconnaissance par les récepteurs, il y a formation de filaments d'actine qui se dépolymérise très rapidement pour donner

naissance au phagosome libre d'entreprendre son processus de maturation (Diakonova, 2002; Swanson et al., 1999).

Dans le cas de la phagocytose induite par les récepteurs FcγR la réorganisation du cytosquelette d'actine est contrôlée par deux protéines G de la famille de Rho (*Rho family*), Rac1 et Cdc42 qui sont responsables de la formation des pseudopodes. L'inhibition de l'une des deux protéines bloque la polymérisation de l'actine et l'internalisation de la particule opsonisée par le macrophage (Caron, 1998; Castellano et al., 2000).

Nous allons présenter dans la suite du paragraphe les mécanismes moléculaires qui surviennent à la suite de la reconnaissance de la particule. Nous nous intéressons en premier lieu, aux mécanismes d'entrée des pathogènes.

II.1. Mécanisme d'entrée des particules à internaliser

Deux mécanismes ont été établis pour la phagocytose de particules. Un mécanisme dit de fermeture à glissière : le *Zipper* et le mécanisme dit d'entrée déclenchée : le *Trigger*.

II.1.1. Le mécanisme *Zipper*

Le premier mécanisme a été proposé par Bianco *et al.* et est devenu le modèle de base de phagocytose de pathogènes. Ces études ont ainsi démontré que la phagocytose de particules opsonisées par des macrophages de souris est contrôlée localement par le contact direct avec le macrophage (Bianco et al., 1975; Swanson and Baer, 1995). Par ailleurs, ils ont démontré que l'internalisation de la particule n'était pas automatiquement initiée par la reconnaissance de la particule. En effet, celle-ci nécessite le recrutement séquentiel des récepteurs de la surface du macrophage qui interagissent avec les ligands présents à la surface des bactéries. Il en résulte donc la formation d'un pseudopode étroitement accolé à la surface de la particule. La membrane ne peut s'étendre que dans la mesure où les récepteurs peuvent lier des ligands encore présents en surface de la particule (cf. **Figure 1.9**).

Griffin *et al.* ont aussi étudié l'importance des interactions des récepteurs de surface avec la totalité de la surface de la particule à internaliser en utilisant des lymphocytes opsonisés en tant que modèles pour cette étude. Ils ont ainsi préparé d'une part, des lymphocytes entièrement opsonisés par des IgGs et qui ont été efficacement phagocytés et d'autre part, des lymphocytes partiellement opsonisés (sur une hémisphère). Contrairement aux premiers, ces lymphocytes n'ont pas été complètement internalisés (Griffin et al., 1976).

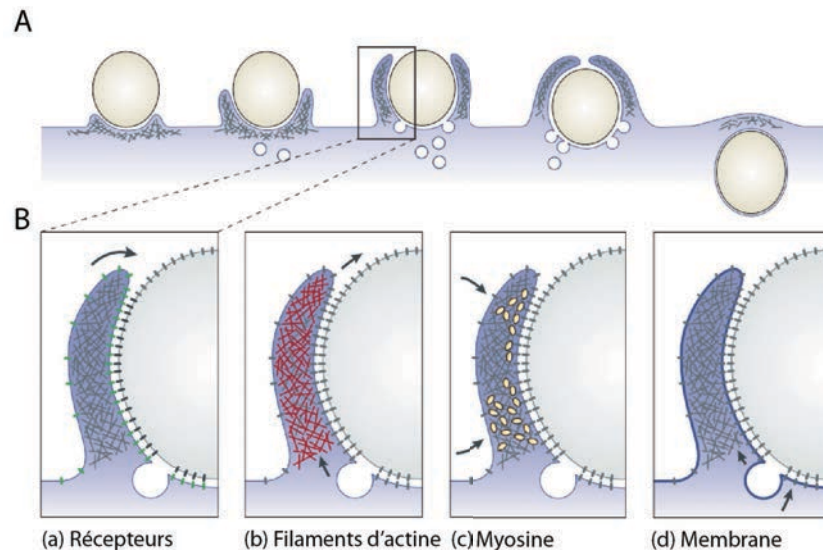


Figure 1.9. Représentation schématique du mécanisme de phagocytose selon le modèle dit de « Zipper ». (A) Déploiement progressif de la membrane autour de la particule à internaliser. (B) Recrutement de récepteurs interconnectés avec les ligands présents à la surface de la particule à internaliser. Image adaptée de (Swanson, 2008).

Ainsi le modèle de fermeture à glissière suggère que la phagocytose est contrôlée localement par l'interaction séquentielle des récepteurs avec leurs ligands. Cette interconnexion guide au fur et à mesure le déploiement de la membrane plasmique autour de la particule et la formation du phagosome. Cependant, comme on va le décrire ci-dessous, certains types de phagocytose correspondent à un autre modèle dit de « déclenchement ».

II.1.2. Le mécanisme *Trigger*

Le mécanisme « *Trigger* », appelé aussi mécanisme d'entrée déclenchée, donne une réponse de type « *all or none* » (tout ou rien) différente de celle décrite précédemment. En effet, certaines bactéries sont capables de sécréter des substances bactériennes « des effecteurs » qui vont cibler et activer directement des protéines cellulaires. Ces protéines vont déclencher, au site d'entrée de la bactérie, une intense polymérisation de l'actine (cf. **Figure 1.10**). Cette réorganisation du cytosquelette d'actine conduit à la formation de grandes extensions membranaires, « *membrane ruffles* » (Cossart and Sansonetti, 2004). Ce type de mécanisme est associé aux bactéries *Yersinia*, *Shigella* et *Salmonella*.

Alors que le mécanisme *Zipper* requiert initialement l'interaction entre les récepteurs de surface cellulaire et les ligands présents à la surface de la particule cible, le mécanisme *Trigger* est déclenché par l'injection d'effecteurs dans la cellule.

Ainsi nous venons de voir les deux types de mécanismes qui modélisent l'entrée des particules cibles. Une fois les cibles reconnues, une cascade de signaux se déclenche et aboutit à la

polymérisation de l'actine. Nous allons nous intéresser maintenant au rôle de l'actine dans le processus de phagocytose.

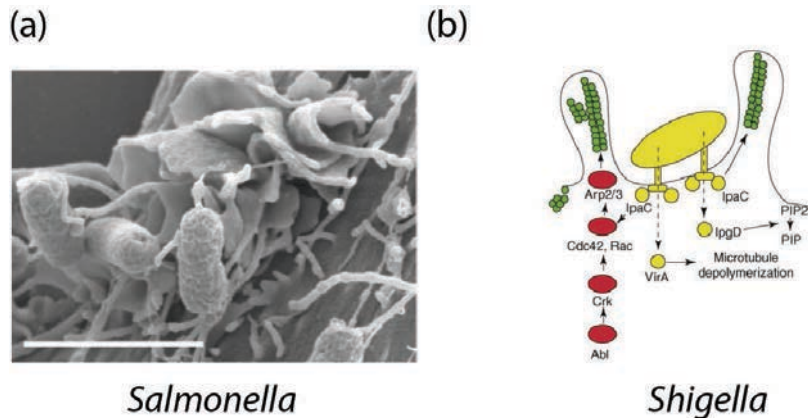


Figure 1.10. Mécanisme de phagocytose selon le modèle « Trigger ». (a) Image en microscopie électronique à balayage du réarrangement de la surface cellulaire induite par la bactérie *Salmonella*, échelle : 2µm (Rosselin et al., 2011). (b) Représentation des cascades de signalisation produites lors de l'invasion de *Shigella* (Veiga and Cossart, 2006).

II.2. Rôle de la réorganisation du cytosquelette d'actine dans la phagocytose

On attribue plusieurs fonctions spécifiques à l'actine dans de nombreux processus biologiques tels que la migration cellulaire, la cytodierèse, le maintien de l'intégrité tissulaire ou encore dans l'adhésion cellulaire. Le rôle de l'actine dans le processus phagocytaire a été mis en évidence en 1977 par l'effet inhibiteur de la cytochalasine B, une drogue qui bloque la polymérisation de l'actine, dans la phagocytose d'érythrocytes opsonisés par des IgGs (Kaplan, 1977).

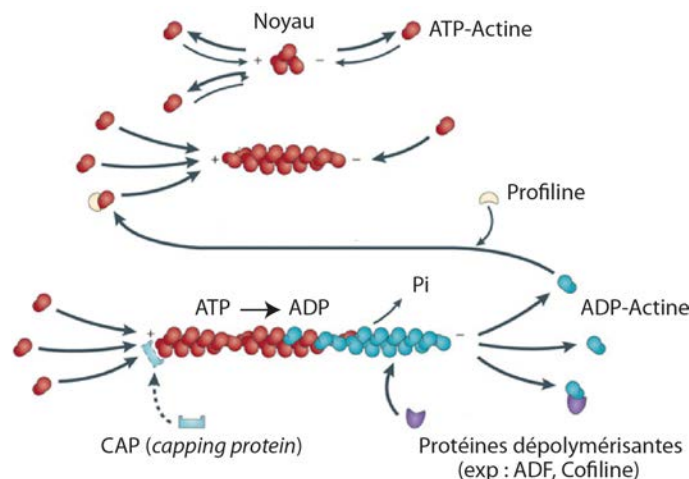


Figure 1.11. Dynamique de la polymérisation de l'actine. Adaptée de (Nürnberg et al., 2011).

Constituant essentiel du cytosquelette, l'actine sous forme de monomères associés à l'ATP est appelée actine G (Globulaire) et sous forme de filaments associés à l'ADP après hydrolyse de l'ATP

est appelée actine F (fibrillaire, polymère). Elle a une masse moléculaire de 42,5 kD et compte 375 acides aminés (cf. **Figure 1.11**).

L'assemblage de l'actine se fait tout d'abord par une première étape qui consiste en l'activation du monomère par l'intermédiaire de l'ATP et en présence de sels divalents. Ensuite vient une étape plus lente qui correspond à la nucléation du monomère et dépend de la concentration en actine G qui s'assemble en filaments. Enfin la dernière étape, qui est la plus rapide, consiste en l'élongation du filament par association de monomères d'actine aux deux extrémités du filament en cours de formation. Le filament d'actine (actine F) présente une structure polarisée avec une extrémité positive (barbue, +) et une négative (pointue, -). La croissance est plus rapide à l'extrémité positive, tandis qu'à l'extrémité négative l'équilibre est déplacé vers la dépolymérisation. Si le monomère central est fixe, l'ensemble de la chaîne semble se déplacer. Cette propriété est à l'origine du modèle de tapis roulant « *treadmilling* » (Nürnberg et al., 2011). Ce modèle permet à certaines cellules de se déplacer via les lamellipodes à travers la réalisation d'un moteur moléculaire.

La polymérisation de l'actine est régulée par plusieurs protéines comme le complexe Arp2/3 appelé aussi complexe de nucléation (Machesky and Gould, 1999) ou encore la profiline. L'activation du complexe Arp2/3 est nécessaire dans la phagocytose de particules induite par les deux récepteurs Fc γ R et CR3 (May et al., 2000).

Plusieurs protéines impliquées dans cette activation ont été identifiées, on peut par exemple citer par exemple les membres de la famille WASP qui se lient directement au complexe et servent d'intermédiaire entre les voies de signalisation et l'initiation de la polymérisation (**Figure 1.12**).

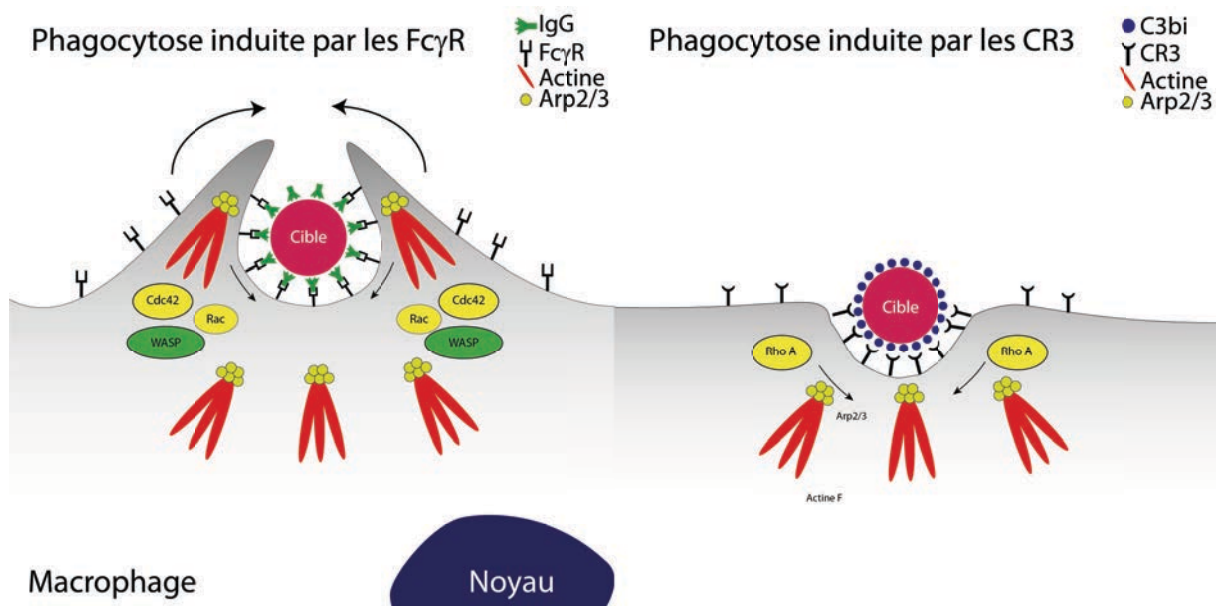


Figure 1.12. Modèles de signalisation pendant la phagocytose induite par les récepteurs Fc γ R et les récepteurs du complément CR3. Image inspirée de (Cougoule, Wiedemann, Lim, & Caron, 2004).

La régulation de ces mêmes protéines dépend de l'activation de GTPases de la famille Rho. Elles sont soit sous forme active liées au GTP ou inactives liées au GDP. Ces GTPases comptent plus d'une dizaine de membres dont principalement les petites GTPases comme les Cdc42 et Rac qui sont impliquées dans la phagocytose induite par les récepteurs FcγR et RhoA le facteur impliqué dans la phagocytose induite par les récepteurs du complément, (Caron, 1998; Cougoule et al., 2004).

L'actine joue donc un rôle prépondérant dans le processus de phagocytose en lien avec les protéines de régulation de la polymérisation. Une fois que le « *cup* » d'actine est formé, une question se pose : quel est le devenir de la particule phagocytée une fois à l'intérieur du macrophage ?

II.3. Maturation du phagosome

Par une dépolymérisation rapide du cytosquelette d'actine, le phagosome va entreprendre sa migration à l'intérieur de la cellule. Une fois à l'intérieure du macrophage, il va fusionner avec les compartiments endosomaux ainsi qu'avec des organites intracellulaires spécialisées, les lysosomes qui contiennent des enzymes de dégradation et des composés oxygénés et azotés toxiques très réactifs pour former le phagolysosome (Aderem and Underhill, 1999) nécessaire à la dégradation de la particule ingérée (Figure 1.13).

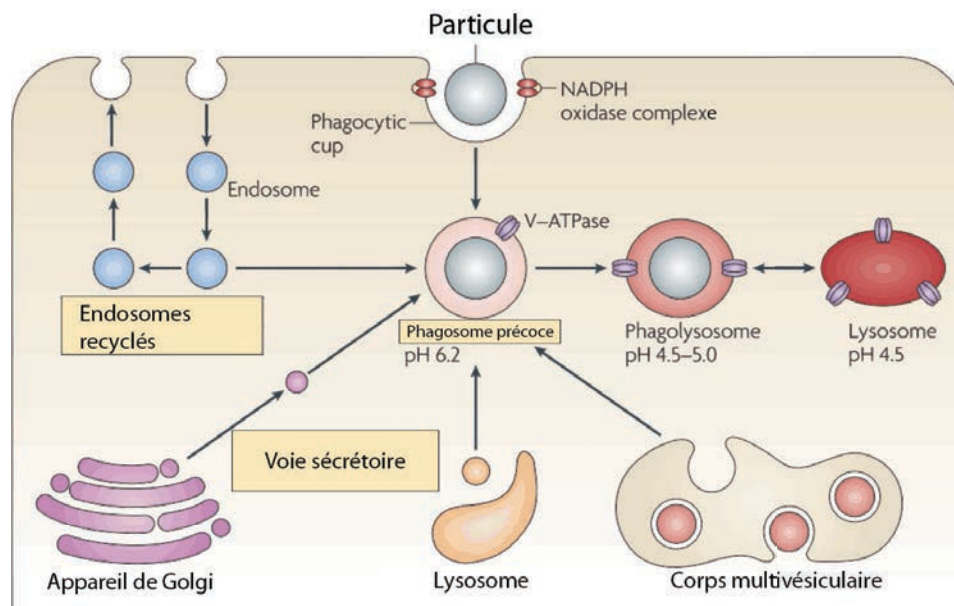


Figure 1.13. La membrane du phagosome contient des protéines provenant du réticulum endoplasmique, des endosomes et des lysosomes avec lesquels le phagosome fusionne. Image adaptée de (Russell et al., 2009).

Le temps nécessaire à la fusion du phagosome avec les lysosomes dépend de la nature de la particule à internaliser. Dans les cas de la phagocytose induite par les FcγR ce temps est de l'ordre d'une trentaine de minutes, et peut atteindre des heures pour les particules contenant du latex (Aderem and

Underhill, 1999; Desjardins and Huber, 1994). La fusion du phagosome avec le lysosome semble aussi être influencée par la présence d'ion calcium mais le rôle exacte de ces ions reste incertain (Stockinger and Zhang, 2006).

À ce stade, le phagolysosome est encore incapable de dégrader la particule internalisée. Des enzymes de dégradation et des substances microbicides sont délivrées à l'intérieur de la vacuole pour dégrader et éliminer la particule internalisée. Par exemple, la NADPH oxydase est un complexe enzymatique qui produit des dérivés toxiques de l'O₂. L'activation du métabolisme oxydatif est effectuée par les récepteurs FcγR et génère des formes réactives de l'oxygène (Intermédiaires réactifs de l'oxygène, ROS, ROI) qui sont des ions superoxydes très toxiques (Gresham and McGarr, 1988).

L'action combinée des enzymes de dégradation et du milieu hautement acide du phagosome dont le pH diminue jusqu'à 4,5 est extrêmement efficace pour détruire la majorité des cibles internalisées. Le pH du phagosome se rétablit une fois que la particule est dégradée et éliminée (Downey et al., 1999; Russell et al., 2009). Une partie de la cible dégradée, les récepteurs ou les protéines internalisées, sera évacuée dans le milieu extracellulaire en tant que déchets inertes (Desjardins, 1995; Desjardins and Huber, 1994; Downey et al., 1999; Russell et al., 2009), l'autre partie sera redirigée à travers le phagolysosome par le système de recyclage (les endosomes de recyclage) vers la membrane plasmique pour la présentation antigénique.

Il semblerait donc que le macrophage est aussi capable de participer à l'immunité adaptative. Une question se pose alors, quel est le rôle du macrophage dans la présentation antigénique ?

II.4. La phagocytose et la présentation antigénique

Les macrophages ont aussi la particularité de capturer des antigènes par phagocytose. Ils font partie des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et jouent un rôle important dans l'établissement d'un lien avec l'immunité adaptative en activant les cellules T auxiliaires donnant une réponse immunitaire spécifique.

En effet, le macrophage exprime lui aussi les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à sa surface cellulaire appelées molécules du CMH de classe I et II (cf. **Figure 1.14**).

Les antigènes générés à l'intérieur de la cellule (présents dans le cytosol) et dits endogènes sont présentés à la membrane cellulaire par les molécules du CMH I qui sont exprimées à la surface des toutes les cellules nucléées de l'organisme. En revanche, les molécules du CMH II, principalement exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, sont spécialisées dans la fixation d'antigènes exogènes internalisés depuis le milieu extracellulaire par phagocytose. Cependant, il semblerait que des antigènes exogènes peuvent être présentés avec des molécules du CMH de classe

II (Owen et al., 2013). Le CMH de classe II est spécifique aux cellules présentatrices d'antigènes. Une fois internalisées, les protéines provenant du pathogène sont digérées. Les antigènes ainsi générés sont fragmentés dans des compartiments intracellulaires, plus particulièrement dans le phagosome par diverses enzymes lysosomales.

Les peptides antigéniques qui en sont issus sont présentés aux molécules du CMH II à la surface cellulaire. Le complexe CMH II-peptide va induire la reconnaissance spécifique des récepteurs TCR des lymphocytes T (Du Pasquier, 2004).

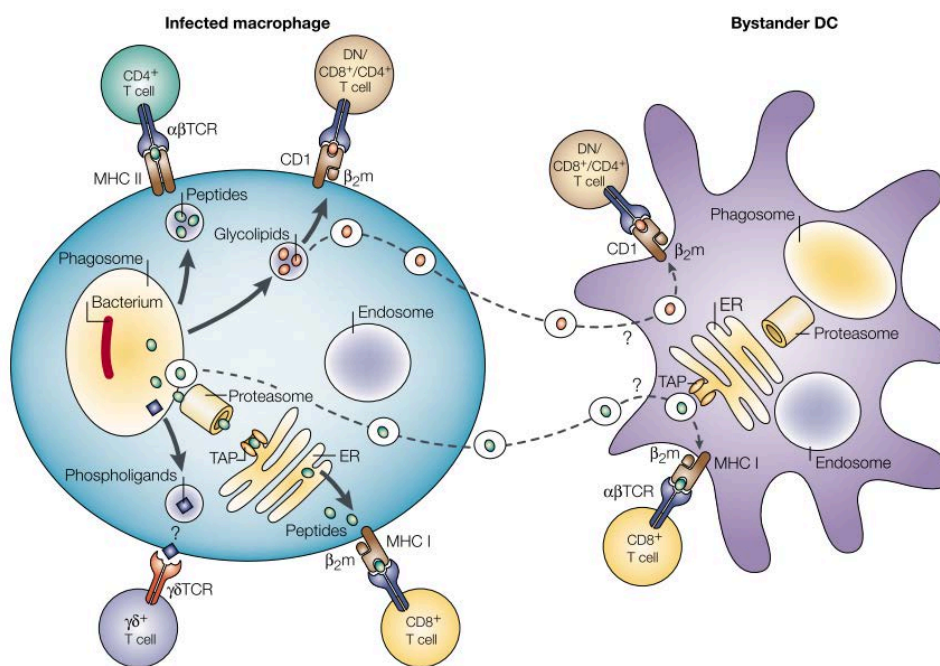


Figure 1.14. Phagocytose de la bactérie responsable de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) dont les mécanismes précis sont encore peu connus. Tout comme les cellules dendritiques les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (Kaufmann, 2001).

Nous venons de revoir les principales molécules impliquées dans la réponse phagocytaire et les différentes étapes de signalisation qui aboutissent à l'internalisation de la particule cible. Ces principes communs à plusieurs études nous permettent de mieux comprendre ce processus. Cependant, vu la complexité du mécanisme impliqué, aucun modèle unique ne peut rendre compte de la diversité des structures et des résultats de l'ingestion des particules.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons revoir les différents modèles qui existent pour l'étude de la phagocytose ainsi que les résultats associés.

III. Historique des études du mécanisme de la phagocytose

La phagocytose est un processus biologique complexe induit par un certain nombre de mécanismes variables selon la nature du récepteur impliqué dans la signalisation. Malgré les nombreux travaux de recherche qui ont été menés pour la compréhension des paramètres qui gouvernent ce mécanisme, de grandes lacunes subsistent dans la détermination de la façon dont le processus est initié, en particulier comment le macrophage reconnaît une cible spécifique et ses caractéristiques physico-chimiques pour son internalisation.

III.1. Particules modèles utilisées dans les études de phagocytose *in-vitro*

Les études de phagocytose *in-vitro* sont souvent réalisées avec des particules modèles qui peuvent être biologiques ou synthétiques, l'idée étant d'avoir des objets reproductibles, tant en terme de taille qu'en terme de propriétés physico-chimiques ou de fonctionnalisation. Les particules biologiques peuvent être des bactéries (*S. Aureus*, *E. Coli*) ou des levures (*S. cerevisiae*) inactivées thermiquement et des érythrocytes éventuellement opsonisés.

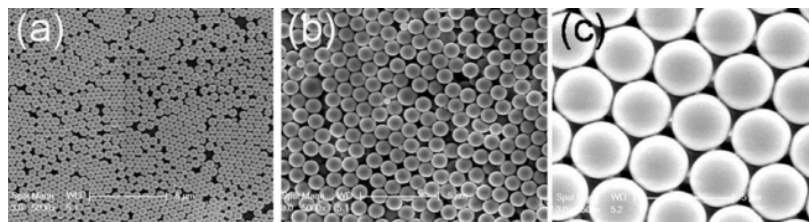


Figure 1.15. Images en microscopie électronique à balayage de particules de différentes tailles utilisées pour l'étude. (a-c) Sphères de 0,5 μm , 1 μm et 3 μm respectivement (Doshi and Mitragotri, 2010). Barre d'échelle 5 μm .

Les particules synthétiques peuvent être préparées à partir de polymères naturels comme le zymosan, polysaccharide extrait de la paroi cellulaire de levures qui a la capacité de se lier à certains récepteurs Toll-like (TLR2 et TLR6) (Owen et al., 2013; Sung et al., 1983), ou comme la cellulose qui peut être aisément modifiée chimiquement (Tabata and Ikada, 1988). Les particules peuvent aussi être fabriquées en silice amorphe (Yates et al., 2005) ou à partir de polymères synthétiques comme le polystyrène (Dykstra et al., 2011; Pacheco et al., 2013; Sharma et al., 2010) ou le polyacrylamide (Beningo and Wang, 2002). L'avantage d'utiliser des particules synthétiques par rapport à des particules biologiques est la possibilité qu'elles donnent de pouvoir faire varier indépendamment certains paramètres physico-chimiques, comme la taille (cf. **Figure 1.15**), la charge de surface, la forme (cf. **Figure 1.16**), ou la fonctionnalisation tout en étant produites en grande quantité et de manière reproductible.

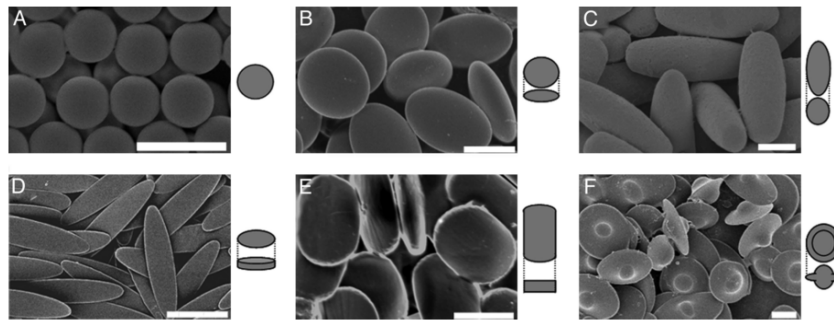


Figure 1.16. Images en microscopie électronique à balayage et illustrations 3D de particules en polystyrène créés pour des expériences de phagocytose. (A) Sphères, (B) ellipsoïdes oblongs, (C) ellipsoïdes allongés, (D) des disques elliptiques, (E) disques rectangulaires et (F) UFOs, (Champion and Mitragotri, 2006). Barre d'échelle 5µm.

L'utilisation de ces nombreux modèles a permis la mise en évidence, *in-vitro*, de l'influence sur leur phagocytose de paramètres comme la taille, la forme, la chimie de surface, les propriétés mécaniques ainsi que la densité d'immunoglobulines des objets à internaliser. Les paragraphes suivants présentent succinctement les expériences qui ont été réalisées et les résultats qui leur sont associés.

III.2. Effet de la taille des particules sur la phagocytose

Bien que les résultats puissent varier de façon importante d'une lignée cellulaire à une autre, on peut dire que généralement plus les particules sont petites, notamment pour des diamètres inférieurs au micron, plus le taux d'internalisation est important. Mitragotri *et al.* (Champion et al., 2008) ont montré que pour des microsphères de polystyrène dont la taille variait de 0,9 à 9 µm, opsonisées avec des IgGs les particules de diamètres de l'ordre de 3 µm étaient les mieux phagocytées par des macrophages alvéolaires de souris (cf. **Figure 1.17a**). Dans cette gamme de taille, la vitesse d'internalisation est en revanche constante quel que soit le diamètre considéré (Champion et al., 2008). Koval *et al.* ont étudié la phagocytose par des macrophages péritonéaux de souris de billes de polystyrène (0,2 à 3 µm) fonctionnalisées avec des IgGs. Contrairement aux plus petites, les billes de taille supérieure au micron de diamètre sont internalisées en activant la polymérisation de l'actine et sont directement transportées vers le lysosome (Koval et al., 1998).

Bien que la plupart des études indiquent que les macrophages ont une préférence pour les particules de petite taille (Doshi and Mitragotri, 2010), Cannon *et al.* ont observé que des particules en polystyrène d'un diamètre supérieur à 15 µm pouvaient être efficacement internalisées tout en nécessitant cependant beaucoup plus de temps que pour des particules de diamètre plus petit. De plus, en comparant la capacité du macrophage à internaliser des particules et sa capacité à s'étaler sur un substrat, tous deux opsonisés, il a été montré que la phagocytose est limitée par la quantité de membrane cellulaire disponible, indépendamment du nombre de récepteurs Fc (Cannon and

Swanson, 1992). Cette surface limite atteinte par le macrophage sur le substrat correspond à la surface nécessaire pour ingérer la plus grosse particule (19 μm). Cette phagocytose « frustrée » est semblable à la phagocytose d'objets infiniment grands.

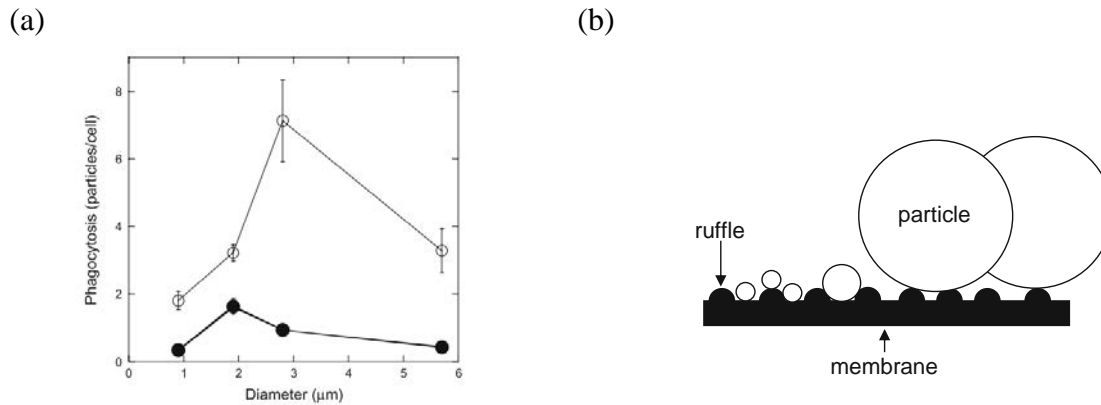


Figure 1.17. (a) Le nombre de particules (attachées et internalisées) par cellule est maximal pour des tailles de l'ordre de 3 μm , opsonisées (cercles ouverts) et non opsonisées (cercles fermés). (b) Schéma représentatif de la distance entre deux « ruffles » de la membrane cellulaire et des particules qui y sont adaptées en taille (Champion et al., 2008).

De toute évidence, le mécanisme de phagocytose dépend fortement de la taille des particules à internaliser et ce quelque soit le type de récepteur impliqué. L'origine de cette dépendance reste à l'heure actuelle peu comprise (Pacheco et al., 2013; Rudt and Müller, 1993; Simon and Schmid-Schönbein, 1988; Tabata and Ikada, 1988). Des arguments géométriques ont été avancés par Champion *et al.* pour expliquer cette dépendance, en notant que des particules de 2 - 3 microns étaient adaptées en taille à la distance entre deux plis (« ruffles ») de la membrane cellulaire (cf. **Figure 1.17** (b)), permettant ainsi un meilleur contact avec la surface du macrophage et favorisant leur capture (Champion et al., 2008).

III.3. Effet de la physico-chimie de surface de la cible sur la phagocytose

Un deuxième paramètre tout aussi important pour l'internalisation des particules est la physico-chimie de surface. Selon la chimie de surface de la particule cible, les interactions avec les cellules sont différentes et influencent leur internalisation (Evora et al., 1998; Kawaguchi et al., 1986; Magnusson et al., 1979; Nagura et al., 1977; Tabata and Ikada, 1988).

Tabata *et al.* ont étudié la phagocytose, par des macrophages péritonéaux de souris, de microsphères de cellulose chimiquement modifiées et ont démontré que des microsphères avec des surfaces hydrophobes sont plus facilement phagocytées que celles ayant des surfaces hydrophiles. Ils ont aussi observé qu'il n'y avait aucune différence significative sur l'efficacité de la phagocytose entre

les surfaces cationiques ou anioniques ayant la même valeur absolue de potentiel zêta (Tabata and Ikada, 1988), cependant l'efficacité de l'internalisation des particules est améliorée pour des valeurs absolues élevées en potentiel zêta, (cf. **Figure 1.18**). Il est intéressant de noter que la phagocytose la plus faible correspond à des microsphères dont le potentiel zêta est nul.

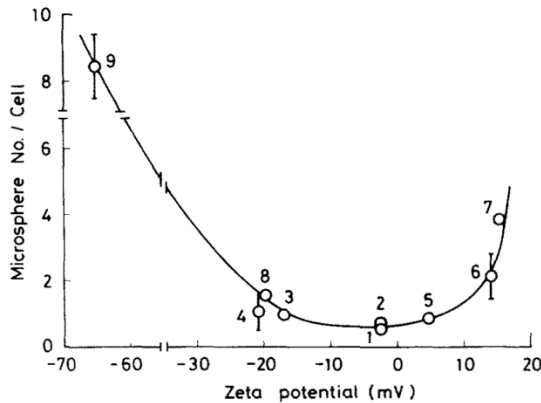


Figure 1.18. Effet de la charge de surface des microsphères de cellulose sur la phagocytose par les macrophages. De (1) à (9) des microsphères de cellulose avec différentes charges de surface (Tabata and Ikada, 1988).

D'autre part, Illum *et al.* ont étudié la phagocytose, par des macrophages péritonéaux de souris, de particules de polystyrène fonctionnalisées avec du PEG afin d'augmenter leur stabilité stérique. Ils ont démontré que l'efficacité de l'internalisation était fortement réduite voir totalement absente selon l'épaisseur de la couche de polymère adsorbée. Des conclusions similaires ont été apportées par Stolnik *et al.*, (Illum et al., 1987; Stolnik et al., 1994). L'adsorption de chaînes de polymères à la surface des particules constitue donc une barrière stérique hydrophile suffisante pour inhiber la phagocytose.

Ces résultats démontrent donc, l'importance de la modification de surface des particules ainsi que la charge de surface pour le contrôle efficace de leur interaction avec le macrophage. Qu'en est-il alors du rôle de la forme de la particule ? C'est ce point que nous allons détailler dans la suite.

III.4. Influence de la forme des particules

La plupart des études menées pour la compréhension des mécanismes de la phagocytose reposent sur l'utilisation de particules sphériques (Champion et al., 2008; Nicolette et al., 2011; Tabata and Ikada, 1988). Cependant, les cibles physiologiques des phagocytes varient largement en taille et en géométrie. Parmi celles-ci on peut citer les bactéries tels que *Escherichia coli* (longueur 0,5 à 3 μm) et les *Bacillus* (longueur de 1 à 10 μm) de forme allongée dite de bâtonnet, les cellules sénescents tels que les érythrocytes âgés (8 μm) et de forme discoïdale ou encore les particules en suspension tels que certains pollens (2,5 – 200 μm) et qui sont de forme ovoïde. La géométrie des particules est donc un autre facteur qui peut moduler la réponse phagocytaire.

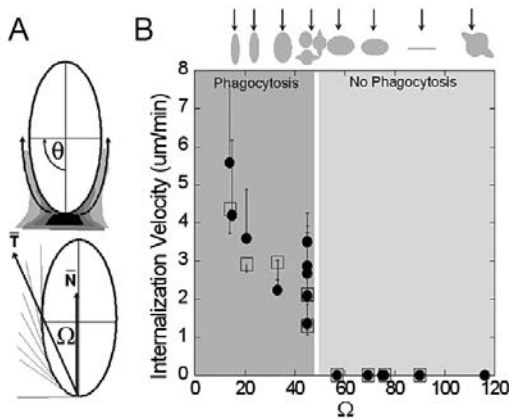


Figure 1.19. (A) Représentation schématique et paramétrisation de l'orientation d'une particule ellipsoïdale en contact avec la membrane cellulaire. Ω correspond à l'angle entre la normale N à la membrane cellulaire et le vecteur T qui dépend de l'orientation de la particule. (B) Vitesse d'internalisation en fonction du paramètre Ω (Champion and Mitragotri, 2006).

Des études récentes ont apporté de nouvelles informations concernant le rôle de la géométrie de la particule à internaliser sur l'efficacité de la réponse phagocytaire (Champion and Mitragotri, 2006; Doshi and Mitragotri, 2010; Gratton et al., 2008; Sharma et al., 2010). Champion *et al.* (Champion and Mitragotri, 2006) ont étudié la phagocytose de particules de polystyrène de diverses formes (ellipsoïdes allongés, ellipsoïdes aplatis, disques elliptiques, etc.) obtenues à partir de l'étirement de particules sphériques, et fonctionnalisées avec des IgGs (cf. **Figure 1.16**). Ce travail a mis en évidence et quantifié que, pour une forme donnée, la phagocytose de la particule dépend fortement de son orientation par rapport à la membrane cellulaire pendant la phase d'adhésion. Alors qu'une particule ellipsoïdale va être rapidement internalisée si elle adhère par sa partie terminale, aucune phagocytose ne sera observée si elle se présente longitudinalement. (cf. **Figure 1.19 A et B**).

D'autre part, l'étude de Sharma *et al.* montre que la forme de la particule influence indépendamment l'étape d'attachement à la surface de la cellule et l'étape d'internalisation (Sharma et al., 2010). Comparées aux particules sphériques, les particules de forme ellipsoïdale, par exemple, sont efficacement attachées à la surface de la cellule. En revanche, leur internalisation est beaucoup plus faible. Cette dépendance à la forme semble provenir du remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire à réaliser l'internalisation complète de la particule (Sharma et al., 2010).

Nous venons ainsi de voir que l'efficacité de l'internalisation est sensible à la forme de la particule, cependant l'origine et l'amplitude de cette dépendance restent mal comprises.

III.5. Effet des propriétés mécaniques des particules

Un autre critère mais tout aussi important pour la compréhension des mécanismes qui influencent le processus de phagocytose a été introduit par Beningo *et al.* (Beningo and Wang, 2002). Il s'agit des propriétés mécaniques de la particule. En effet, en préparant des microbilles de polyacrylamide avec

différentes concentrations de l'agent réticulant, ils ont obtenu des particules de rigidité différente mais avec *a priori* les mêmes propriétés de surface.

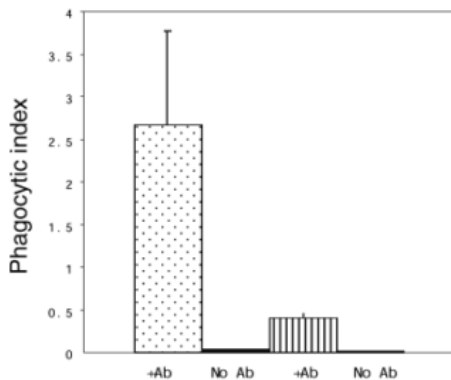


Figure 1.20. Efficacité de la phagocytose des objets rigides ou souples pendant la phagocytose induite par les récepteurs Fc. Les billes de polyacrylamide rigides (a) sont mieux phagocytées que les billes souples (b). Les billes non opsonisées en (c, d) sont peu phagocytées (Beningo and Wang, 2002).

Les résultats de phagocytose par des macrophages de la moelle osseuse de souris montre que le nombre moyen de particules rigides internalisées est six fois plus important que celui des particules déformables (cf. **Figure 1.20**). Les particules déformables ne permettent pas la formation du *cup* d'actine qui initie l'internalisation, ce qui suggère l'existence d'une mécano-sensibilité cellulaire. A ce jour, et à notre connaissance, peu d'études ont été réalisées à la suite de ce travail pour décrire les mécanismes d'intégration permettant à un macrophage de discriminer une cible en fonction de sa rigidité.

III.6. Influence de la densité d'immunoglobulines à la surface

Bien que dans la plupart des expériences de la littérature, les conditions d'opsonisation soient toujours à saturation de l'interface en IgGs (Chow et al., 2001), quelques études ont été menées pour déterminer l'effet de leur densité de surface sur l'efficacité de la phagocytose (Gallo et al., 2010; Pacheco et al., 2013; Zhang et al., 2010).

Zhang *et al.* ont comparé les résultats de phagocytose de particules en polystyrène opsonisées avec trois densités différentes d'IgGs par des macrophages de souris RAW 264.7 (cf. **Figure 1.21**). Dans leur étude, ils montrent que pour une densité faible (Zhang et al., 2010), les particules adhèrent à la surface du macrophage sans pour autant initier leur internalisation. A cette densité la cascade de signaux impliquée dans la réponse phagocytaire n'était pas complètement activée. Ce qui est contraire au mécanisme prédit par le modèle de *zippering*. En revanche, pour une densité dix fois plus grande, les particules étaient efficacement internalisées avec extension de la membrane de la cellule et formation de *cup* d'actine.

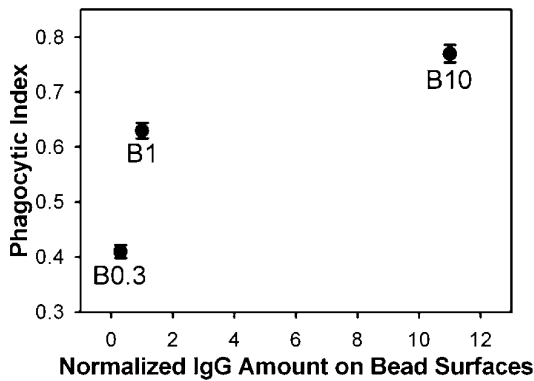


Figure 1.21. Index de phagocytose pour différentes densités d'IgGs à la surface de billes de polystyrène. La relation entre la densité du ligand et de l'indice phagocytaire est non linéaire (Zhang et al., 2010).

Par ailleurs, Gallo *et al.* ont étudié l'influence de la densité d'IgGs à la surface d'érythrocytes de mouton opsonisés (*Sheep Red Blood Cells, SRBC*) par des macrophages primaires de la moelle osseuse de souris. Ils ont montré que la phagocytose était sensible à ce paramètre et conduit à une relation « concentration-réponse » à travers laquelle ils ont déterminé la concentration minimale, égale à $3 \cdot 10^5$ IgGs/SRBC (cf. **Figure 1.22**), nécessaire pour induire une réponse efficace (Gallo et al., 2010). Cette étude constitue à notre connaissance la seule analyse vraiment quantitative de l'influence du nombre d'IgGs sur l'efficacité de phagocytose.

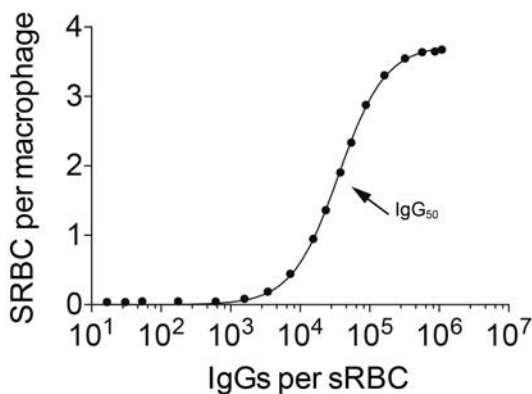


Figure 1.22. Représentation de la phagocytose des SRBC fonctionnalisés avec des IgGs en fonction de la quantité de ces derniers (Gallo et al., 2010). Données analysées par nos soins et tracé du nombre de SRBC par macrophages en fonction du nombre d'IgGs par cellule.

Enfin, Pacheco *et al.* ont étudié l'effet combiné de la densité d'IgGs ainsi que la taille de particules de polystyrène sur la phagocytose par des macrophages de souris RAW 264.7. À l'inverse des études précédentes, ils ont démontré que la densité d'immunoglobulines n'était pas un facteur significatif dans la phagocytose de particules de plus de 2 μm de diamètre. Comme le montre la **Figure 1.23**, pour les plus petites particules (0,5 – 2 μm) l'internalisation semble être améliorée par la quantité d'IgGs à la surface des particules (Pacheco et al., 2013)

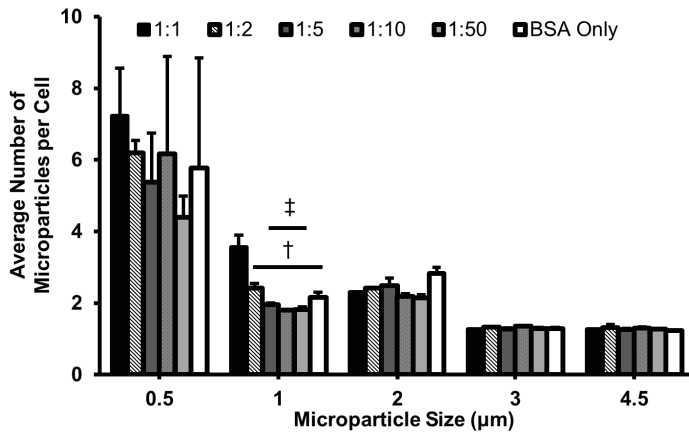


Figure 1.23. Nombre moyen de particules par cellule en fonction de la taille et de la densité d'IgGs (Pacheco et al., 2013).

IV. Influence de la mobilité des récepteurs à la membrane du macrophage

La membrane plasmique d'une cellule est formée d'une bicouche composée de deux feuillets, dont les proportions en phosphoglycérides, sphingolipides et de cholestérol sont différentes. À cette bicouche sont associés des protéines ou complexes protéiques transmembranaires, et notamment les molécules adhésives (cf. **Figure 1.24**).

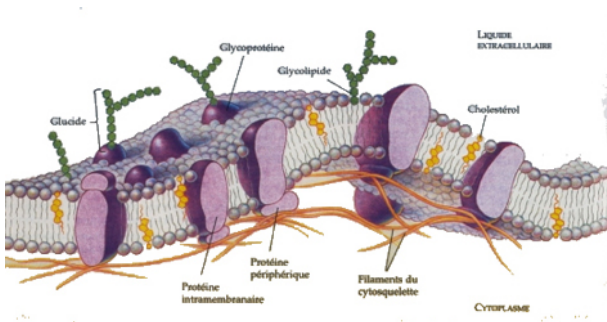


Figure 1.24. Représentation schématique de la membrane plasmique d'une cellule montrant la bicouche, les filaments du cytosquelette, les protéines intégrales et les molécules glycosylées du glycocalyx (Alberts et al., 2008).

L'adhésion de la particule cible à la surface d'une cellule implique des récepteurs capables de reconnaître la particule et de coordonner une réponse cellulaire à travers une voie précise de signalisation. Les interactions entre les protéines (ligand/récepteur) dépendent non seulement de leur affinité, de leur cinétique d'association, de leur concentration, mais aussi de leur mobilité (Subramanian et al., 2006a) et de leur répartition spatiale (van der Merwe, 2002).

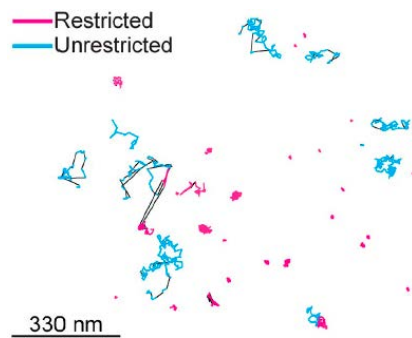


Figure 1.25. Trajectoires représentatives de la diffusion des deux sous-populations de FcγRII/III à la surface de macrophages RAW 264.7. Les trajectoires sont mesurées à l'aide de quantum dots. La trajectoire bleue correspond à un mode de diffusion libre et la trajectoire rouge à un mode de diffusion restreint (Flannagan et al., 2010).

Les protéines transmembranaires, telles que les récepteurs, ont la possibilité de diffuser dans le plan de la membrane, soit de manière passive (diffusion brownienne) (Cherry, 1979) soit active (par l'intervention de mouvements du cytosquelette et consommation d'ATP) (van der Merwe, 2002). Pour une population de récepteurs de type Fcγ donnée, on peut distinguer deux sous-populations caractérisées par deux valeurs distinctes de coefficients de diffusion (cf. **Figure 1.25**). Ces valeurs distinctes correspondent à un mode restreint et un mode libre de mobilité latérale (Flannagan et al., 2010). Le mode restreint est une conséquence de l'existence de microdomaines dans le cytosquelette d'actine qui augmentent la fréquence des collisions des récepteurs et diminuent leur coefficient de diffusion (Jaumouillé et al., 2014).

La seule reconnaissance d'un ligand par un récepteur de la cellule cible ne suffit pas à déclencher un signal intracellulaire et l'activation de la fonction biologique associée. Par exemple, lorsqu'un lymphocyte T (cf. **Figure 1.26**) interagit avec une cellule cible, la réponse immunitaire complète ne survient que lorsque les complexes protéiques mobilisés par la reconnaissance s'organisent en une structure intercellulaire dont la taille caractéristique peut atteindre plusieurs microns, la synapse immune (Lee et al., 2003).

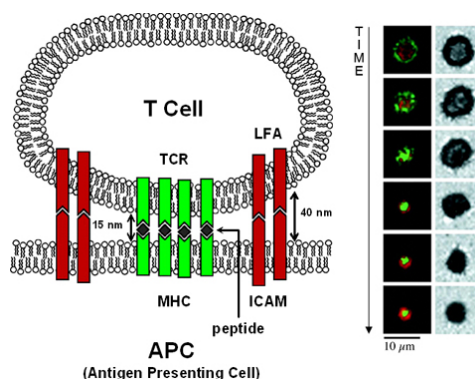


Figure 1.26. Les récepteurs LFA et TCR sont réorganisés lors de la formation d'une synapse immune entre un lymphocyte T et une cellule et conduisent à la synapse mature (Qi et al., 2001).

Les récepteurs TCR sont à la périphérie de la zone de contact au début de la formation, puis diffusent vers le centre, laissant les récepteurs LFA à la périphérie de manière à former la synapse dite mature. Bien qu'une modélisation ne tenant compte que de la diffusion passive ait permis de simuler la

formation de ces structures (Qi et al., 2001), les coefficients de diffusion des protéines dans le modèle sont largement supérieurs à ceux associés uniquement à la diffusion brownienne bidimensionnelle, suggérant donc des mécanismes cellulaires actifs (Huppa and Davis, 2003). Ces résultats ont été confirmés par des expériences montrant que des cellules T n'ayant plus la capacité de former des filaments d'actine étaient incapables de former une synapse mature.

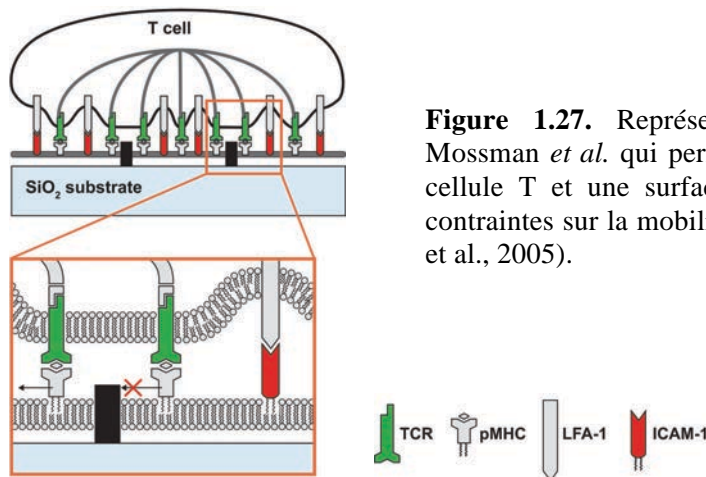


Figure 1.27. Représentation schématique du modèle proposé par Mossman *et al.* qui permet la formation de la synapse immunitaire entre une cellule T et une surface artificielle. Les récepteurs sont soumis à des contraintes sur la mobilité imposées par les barrières physiques (Mossman et al., 2005).

Il a de plus été démontré que les contraintes de mobilité des protéines existant lors de la formation de la synapse immunologique entre les cellules T et les cellules présentatrices d'antigènes influencent fortement la cascade de signalisation. Mossman *et al.* ont développé une méthode expérimentale qui permet de manipuler l'organisation de la synapse immunologique dans les cellules T (Mossman et al., 2005). Les bicouches lipidiques fluides ont été modifiées par l'introduction de structures solides de géométries définies qui représentent des barrières physiques (lignes parallèles, grilles, barrières hexagonales) (cf. **Figure 1.27**). Ils ont observé que la formation de la synapse est modifiée par les contraintes géométriques du substrat. Ils ont ensuite étudié la cascade de signalisation au sein des motifs de synapse modifiés et ont trouvé que les niveaux associés de Ca^{2+} et de tyrosine phosphorylée (pY) étaient plus élevés que les niveaux observés dans les synapses non modifiées. Ainsi ces expériences montrent que les modifications spatiales dans les interfaces intracellulaires influencent l'activité de signalisation du récepteur.

L'existence de synapses a aussi été démontrée chez le lymphocyte B avec le même type de géométrie circulaire que dans le cas du lymphocyte T. Au centre, on trouve des récepteurs IgM et à la périphérie des récepteurs de type CD45 et CD22. À la différence du lymphocyte T, un lymphocyte B peut former une synapse mature uniquement à partir de mécanismes impliquant une diffusion passive des protéines (Iber, 2005).

Une structure semblable à la synapse immunologique que nous venons de voir est la « synapse phagocytaire ». Elle a été proposée par Goodridge *et al.* et se forme entre les phagocytes et leurs diverses cellules cibles (Goodridge *et al.*, 2011). Elle peut avoir lieu entre les dectines 1 qui sont des PRR exprimées par les macrophages et les β -glucanes présents à la surface des bactéries dans des structures similaires aux synapses immunologiques. Le rôle de la mobilité du CD47 et la formation de « *clusters* » de ligands-récepteurs a aussi été étudié dans la synapse phagocytaire (Gregory and Brown, 2005). Ainsi Subramanian *et al.* (Subramanian *et al.*, 2006b) ont montré que cette protéine co-localise avec le récepteur SIRPa présent à la surface du macrophage et inhibe sa phagocytose. Des densités similaires du complexe CD47 – SIRPa ont été observées sur les deux espèces d'érythrocytes (humains et de souris) étudiées.

Les récepteurs Fc γ R sont, comme on l'avait précédemment décrit, des protéines cytoplasmiques transmembranaires qui peuvent s'organiser et donner accès à une réponse phagocytaire complète. La réponse est initiée par le « *clustering* » des récepteurs induit par les ligands (Swanson, 2008). Il a été précédemment établi que la liaison des particules opsonisées est obtenue par les interactions progressives des IgGs avec les récepteurs Fc γ R selon le modèle de fermeture à glissière (Swanson and Baer, 1995). Des études ont montré que les micro-domaines membranaires riches en cholestérol vont s'associer aux clusters Fc γ R et faciliter la phosphorylation du récepteur par des kinases de la famille des SRC qui augmentent la liaison de la particule cible (Sobota *et al.*, 2005).

Ainsi la mobilité des récepteurs de surface facilite leur recrutement autour de la particule à internaliser et constitue un élément déterminant pour la réponse phagocytaire induite et le déclenchement de l'ingestion de la particule.

Bilan de l'étude du mécanisme de phagocytose

Les macrophages jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire impliquée dans la reconnaissance et la destruction non seulement des agents pathogènes mais aussi des cellules sénescents ou les cellules apoptotiques. La nature exacte du processus phagocytaire dépend des récepteurs impliqués. Plusieurs types de récepteurs interviennent dans les processus de phagocytose. Le récepteur à mannose reste encore peu étudié, le récepteur du complément donne lieu à une phagocytose lente nécessitant des cofacteurs stimulants. La phagocytose induite par les récepteurs FcγR est rapide et destructive vis-à-vis des pathogènes et les récepteurs FcγR impliqués sont les mieux caractérisés. L'étude de leur structure ainsi que leurs fonctions représente un vaste champ de recherche (Ravetch, 1997; Ravetch and Clynes, 1998; Unkeless, 1989).

Nous avons donc choisi d'étudier la phagocytose induite par ces récepteurs FcγR en tant que système modèle pour la compréhension des paramètres qui gouvernent la phagocytose de cibles opsonisés.

D'autre part, il est clair qu'un grand nombre de paramètres physico-chimiques et biologiques influencent la phagocytose des particules par les macrophages. Les tailles, formes, densités et propriétés de surface sont très variables en fonction de l'étude menée. Cependant, malgré le nombre considérable de travaux, la majorité des résultats obtenus repose sur l'utilisation de particules de polymère rigides pour la plupart en polystyrène, (Koval et al., 1998; Pacheco et al., 2013; Sharma et al., 2010; Tabata and Ikada, 1988). Même si ces modèles de particules représentent un système très pratique et flexible pour des analyses pertinentes dans la compréhension du phénomène de phagocytose, les résultats obtenus jusqu'à présent demeurent incomplets.

En effet, dans le cadre très spécifique de la phagocytose induite par les FcγR, les résultats de la littérature montrent que l'ingestion de ce type de particules est maximale et spécifique pour des diamètres de 2 à 3 microns. Ces particules constituent donc un très bon modèle pour l'étude de la phagocytose de petits pathogènes tels que les levures, les bactéries et les particules en suspension. En revanche, elles ne parviennent pas à rendre compte de la capacité qu'ont les macrophages de phagocyter de gros objets comme les cellules cancéreuses ou sénescents.

Par ailleurs, nous avons vu que la phagocytose est influencée par les caractéristiques des objets à internaliser. Les précédentes études montrent que la densité d'IgGs en surface influence l'efficacité de phagocytose (Gallo et al., 2010). D'autres observations indiquent que la forme des particules et leur angle d'approche peuvent ralentir voire empêcher l'internalisation (Sharma et al., 2010). De même, la charge de surface des particules modifie leur reconnaissance par les macrophages (Tabata and Ikada, 1988). Enfin, le recrutement des récepteurs de surface suite à la reconnaissance de la

particule semble être une étape déterminante dans la cascade de signalisation de la phagocytose (Sobota et al., 2005; Swanson, 2008).

Chapitre 2 : Émulsions

I. Description générale	51
II. Agents tensioactifs	52
II.1. Généralités.....	52
II.2. Classes de tensioactifs.....	52
II.3. La HLB : <i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i>	54
III. Modes de déformation des gouttes et interfaces.....	55
IV. Techniques d'émulsification.....	56
V. Applications des émulsions en pharmacologie	58
V.1. Administration de principes actifs	58
V.2. Circulation des émulsions et optimisation de leur durée de vie.....	60
V.3. Vectorisation et administration ciblée de principes actifs	62
VI. Applications des émulsions en biophysique	62
VII. Gouttes d'émulsions pour l'étude de la phagocytose	65
Objectifs du travail de doctorat : Vers de nouveaux matériaux	67

Les émulsions ont été intensivement étudiées au cours des dernières décennies en raison de leurs larges domaines d'applications industrielles, allant de l'alimentaire à la galénique en passant par les revêtements routiers. Leur utilisation présente de nombreux avantages non seulement en raison de leur préparation facile et à faible coût, mais aussi en raison la diversité de matières premières disponibles. Dans un premier temps, nous introduirons les différents types d'émulsions ainsi que les différentes classes de tensioactifs. Nous présenterons ensuite les techniques d'émulsification existantes. Enfin, nous présenterons certaines applications spécifiques liées aux gouttes d'émulsions dans le domaine de la biologie et de la biophysique.

I. Description générale

Les émulsions sont des mélanges métastables composés de deux liquides non miscibles stabilisés par des émulsifiants ou tensioactifs qui forment un film interfacial facilitant la dispersion durable d'une phase dans l'autre.

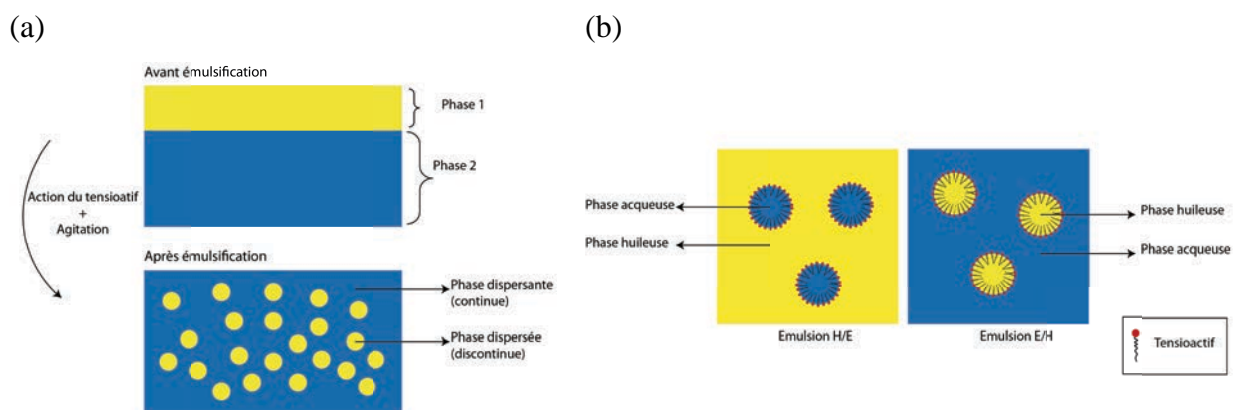


Figure 2.1. (a) Représentation schématique de la formation d'une émulsion à partir de deux liquides non miscibles. (b) Représentation schématique des deux types d'émulsions les plus couramment utilisés, indirecte (H/E) et directe (E/H).

L'un des liquides représente la phase continue, l'autre une phase immiscible qui est dispersée dans la première sous forme de petites gouttes allant de quelques dizaines de nanomètres à quelques centaines de microns (cf. **Figure 2.1a**). Une émulsion est une suspension liquide/liquide métastable, *i.e.* dont la stabilité dans le temps est finie. Cette stabilité peut aller de quelques heures à plusieurs mois.

On définit deux types d'émulsions selon la nature de la phase dispersée et continue : les émulsions directes appelées « huile dans eau » et notée H/E lorsque l'huile constitue la phase dispersée et les émulsions indirectes ou inverses appelées « eau dans huile » et notées E/H lorsque l'huile constitue la phase continue (cf. **Figure 2.1b**). On peut également trouver des émulsions multiples H/E/H ou E/H/E (Leal-Calderon et al., 2007).

II. Agents tensioactifs

II.1. Généralités

Afin de stabiliser l'interface entre les deux liquides, l'ajout de surfactants est nécessaire. La **Figure 2.2** montre une représentation schématique de la structure d'un monomère de tensioactif. Celui-ci confère aux émulsions une stabilité cinétique plus ou moins grande. Il s'agit de molécules amphiphiles constituées de deux parties d'affinités différentes : l'une est hydrophobe et s'immerge dans le corps gras, l'autre hydrophile est soluble dans l'eau.

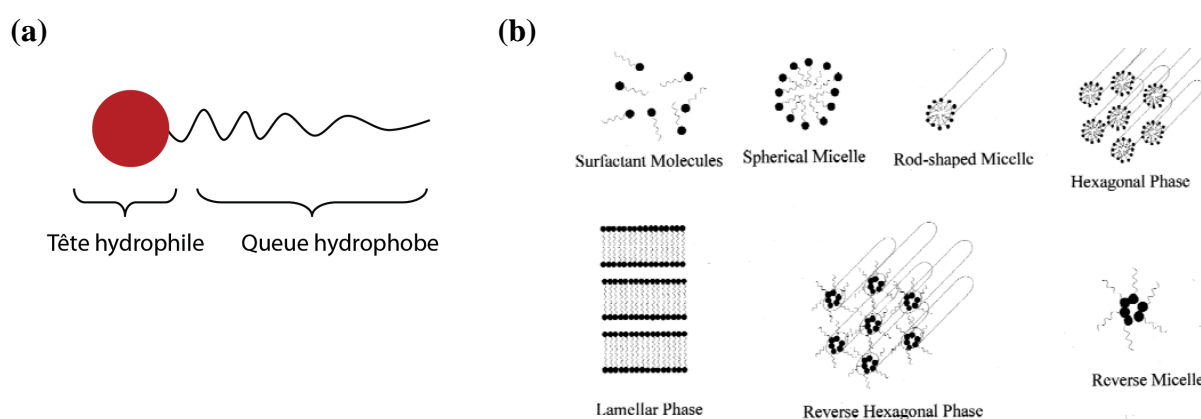


Figure 2.2. (a) Représentation schématique d'un monomère de tensioactif composé d'une partie hydrophile polaire ou ionique et d'une partie hydrophobe constituée généralement d'une chaîne carbonée. (b) Structures d'auto-assemblage possibles des monomères de tensioactifs en fonction de leur concentration (haut) ou de leur HLB (bas). Image adaptée de (Lawrence and Rees, 2000).

A partir d'une certaine concentration de tensioactifs dans une solution, appelée concentration micellaire critique ou CMC, on observe un auto-assemblage des molécules de tensioactifs pour former des agrégats en solution qu'on appelle micelles. La forme des micelles dépend de la nature du tensioactif, de l'environnement physico-chimique ainsi que de la concentration (**Figure 2.2**). Dans le cas de l'existence d'une interface de type eau-huile, la densité de molécules tensioactives à l'interface est constante et correspond à un minimum de la tension interfaciale au delà de la CMC. Pour des tensioactifs classiques moléculaires à simple chaîne lipophile, la CMC varie entre 10^{-5} et $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

II.2. Classes de tensioactifs

Les tensioactifs sont classés (cf. **Figure 2.3**) selon la nature de la partie hydrophile en trois grandes familles : les tensioactifs ioniques (cationiques ou anioniques), les tensioactifs non ioniques ou neutre et enfin les tensioactifs amphotères (zwitterioniques).

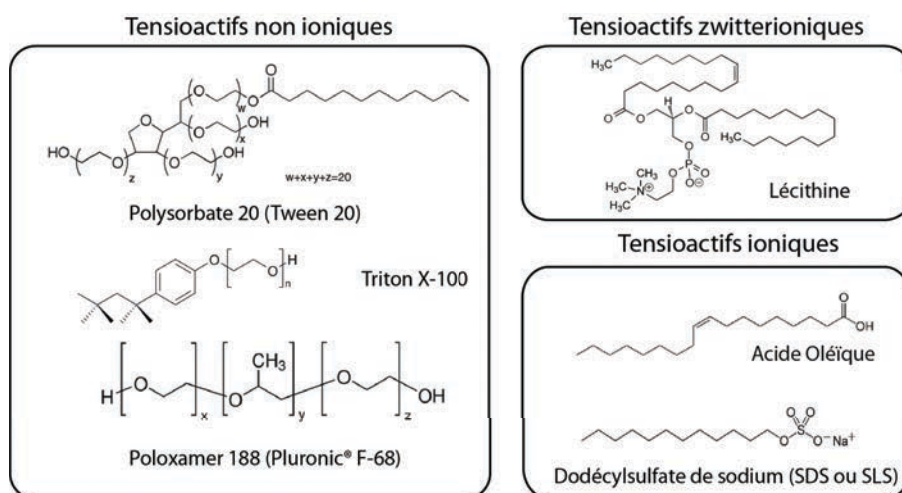


Figure 2.3. Représentation de structures chimiques des différentes classes de tensioactifs. Les parties hydrophiles des tensioactifs non-ioniques sont très souvent formées de chaînes de poly(éthylène)glycol.

Les agents tensio-actifs **anioniques** présentent l'avantage d'être des agents moussants stables et efficaces, cependant ils ont l'inconvénient d'être sensibles à la présence de sels minéraux dans l'eau (dureté de l'eau) ou pour certains à des changements de pH. Ils comprennent entre autres (Stache, 1995) les alkylbenzènesulfonates (détergents), les acides gras (savons), le sulfate de lauryle (agent moussant), le sulfosuccinate de di-alkyl (agent mouillant), des lignosulfonates (dispersants).

Une grande partie des tensioactifs **cationiques** est constituée de composés azotés tels que les sels d'amines grasses et les ammoniums quaternaires, avec un ou plusieurs composés à longues chaînes, qui sont dérivés d'acides gras naturels. Des exemples courants de tensioactifs cationiques sont l'hydroxyde de tétraméthylammonium et le chlorure diméthylodioctadécylammonium.

L'association de charges anioniques et cationiques dans une seule et même molécule de tensioactif est appelée **zwitterionique**. C'est le cas des substances naturelles tels que les acides aminés et les phospholipides (cf. **Figure 2.3**).

Les tensioactifs **non ioniques** possèdent des têtes hydrophiles non chargées. Une grande partie de ces tensioactifs sont caractérisés par la présence d'une ou plusieurs chaînes polyéthylène glycol, obtenue par polycondensation d'oxyde d'éthylène (Zhao et al., 1998). Ils représentent une famille importante de tensioactifs qui sont largement utilisés en raison de leurs excellentes propriétés d'interface et de stabilisation, leur faible coût et leur utilisation en tant qu'agents non toxiques et biodégradables (Liechty et al., 2010; Nace, 1996; Schick, 1987).

Les tensioactifs sont utilisés dans de nombreux protocoles en biologie et de biochimie, notamment pour la lyse cellulaire (SDS), la transfection (lipofectamine) (Avci-Adali et al., 2014), la perméabilisation de membrane lors de la fixation (triton-X-100), les expériences de migration électrophorétique du gel (SDS), la manipulation des protéines membranaire, etc. De manière générale, lorsqu'on veut maintenir l'intégrité cellulaire ou protéique, il faut éviter de travailler avec

des tensioactifs chargés car leur pouvoir détergent est très grand. L'utilisation de tensioactifs non-ioniques avec des cellules vivantes peut avoir un effet dommageable sur les membranes, comme dans le cas du Triton (Currò et al., 2015), mais aussi un effet protecteur comme dans le cas de certains poloxamer (Maskarinec et al., 2002).

II.3. La HLB : *Hydrophilic-Lipophilic Balance*

Les fournisseurs de tensioactifs utilisent un système relativement simple de classification des tensioactifs qui se base sur leur affinité pour chacune des phases aqueuses et lipidiques : la HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*). La HLB d'un tensioactif varie en général entre 0 et 20, les valeurs les plus hautes correspondent aux tensioactifs ioniques ou à certains tensioactifs de type poloxamer (Lee et al., 1989).

La HLB renseigne sur la solubilité à l'équilibre dans chacune des deux phases (proportion de la partie hydrophile par rapport à la partie hydrophobe), mais aussi sur la courbure spontanée (cf. **Figure 2.4**) qu'un tensioactif va pouvoir donner à une interface huile/eau et ainsi la possibilité qu'il a de favoriser la formation d'émulsions directes (H/E) ou inverses (E/H).

De manière générale, les tensioactifs avec une HLB inférieure à 8 ont un caractère lipophile et stabilisent les émulsions type E/H. Les tensioactifs avec une HLB comprise entre 8 et 20 ont un caractère hydrophile et stabilisent les émulsions type H/E. Pour les valeurs de HLB intermédiaires, le tensioactif n'a pas d'affinité particulière pour l'une des phases et favorise la formation de structures lamellaires.

L'une des méthodes de calcul de la HLB a été proposée par Davies (Davies, 1957) et consiste à attribuer une valeur de pondération à chaque groupement fonctionnel des parties hydrophiles et lipophiles et en faire la somme. L'équation s'écrit alors :

$$HLB = 7 + \sum HLB_{Groupes\ hydrophiles} - \sum HLB_{Groupes\ hydrophobes}$$

Ainsi, en plus de la CMC, la valeur HLB constitue un critère qui permet de bien choisir le tensioactif. La connaissance de la HLB ne permet en revanche en rien de prévoir la stabilité des interfaces formées, et ne donne qu'une information indicative sur le rôle d'un tensioactif donné.




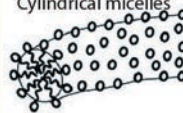






Critical packing shape	Structures formed
 Cone	Spherical micelles 
 Truncated cone	Cylindrical micelles 
 Truncated cone	Flexible bilayers, vesicles 
 Cylinder	Planar bilayers 
 Inverted truncated cone or wedge	Inverted micelles 

Figure 2.4. Relation entre la forme de la molécule de tensioactif, la courbure spontanée et les structures formées en solution (Salim et al., 2014).

III. Modes de déformation des gouttes et interfaces

Du fait de leur caractère liquide, les gouttes d'émulsions sont des objets déformables dont les propriétés mécaniques sont en partie fixées par les propriétés de l'interface. La modélisation mécanique des films minces (monocouche, bicouche lipidique, etc.) a été réalisée au début des années 1970 (Canham, 1970; Evans, 1973). Ces films peuvent être caractérisés par trois types de déformation : élongation (*stretching*), cisaillement (*shearing*) et courbure (*bending*), que nous avons représenté sur la **Figure 2.5**. Les déformations sont des combinaisons de ces trois déformations élémentaires, dont les classes de symétrie sont différentes : déformation isotrope pour l'étirement, déformation à surface constante pour le cisaillement et déformation perpendiculaire au plan de la membrane pour la courbure.

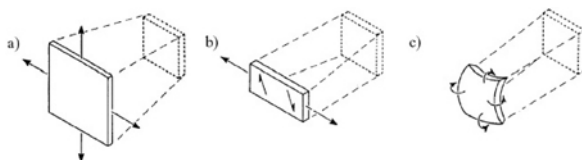


Figure 2.5. Schéma de représentation des trois modes élastiques de déformation des membranes : (a) cisaillement dans le plan avec variation d'aire, (b) cisaillement induisant une extension latérale à aire constante, et (c) courbure (Girard, 2004).

L'énergie par unité de surface d'un film mince peut donc s'écrire comme la somme de ces trois termes :

$$W_{\text{film}} = W_{\text{Stretching}} + W_{\text{Shearing}} + W_{\text{Bending}}$$

La densité d'énergie de stretching est égale à la tension de surface σ . La tension de surface représente l'énergie à fournir pour augmenter l'aire A d'une quantité élémentaire dA . Cette tension de surface fait que l'intérieur de la goutte est en surpression par rapport à l'extérieur. Cette surpression, appelé pression de Laplace, dépend de σ et du rayon R de la goutte suivant la relation :

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R}$$

La tension de surface, ou tension interfaciale, d'une émulsion est fixée par la concentration surfacique en molécules amphiphiles à l'interface (Leal-Calderon et al., 2007). Elle est généralement de l'ordre de quelques dizaines de mJ.m^{-2} et s'exprime communément en mN.m^{-1} .

Du fait de leur caractère liquide, l'énergie surfacique associée au mode de cisaillement W_{Shearing} peut être négligé. Enfin, contrairement au cas des bicouches lipidiques qui se caractérisent par un module de courbure important, le terme W_{Bending} peut être négligé pour des émulsions du fait de la valeur de la tension de surface. Une surface de goutte est donc lisse à l'échelle moléculaire et sa forme est parfaitement sphérique.

IV. Techniques d'émulsification

De nombreuses techniques de fabrication d'émulsions ont été développées de manière à répondre à des contraintes de volume de production, de taille de gouttes et de monodispersité. À l'exception de quelques procédés (Obey and Vincent, 1994), la fabrication d'une émulsion revient à fragmenter une phase immiscible dans une autre, nécessitant l'injection d'une énergie importante dans le système.

Procédé d'émulsification	Tailles obtenues (μm)
Procédés à membrane	0,2 – 100
Microfluidique	1 – 1000
Homogénéisateurs haute pression	0,05 – 5
Emulsificateur de Couette	1 – 10
Ultrasons	0,04 – 200

Table 2.1. Quelques exemples de procédés de fabrication et les tailles qu'ils permettent d'obtenir.

Les procédés d'émulsification courants peuvent être classés en deux catégories selon le mécanisme mis en jeu : les systèmes qui utilisent un cisaillement mécanique et les systèmes qui font appel au phénomène de cavitation (E. Dickinson and B. Bergenstahl, 1997). Le premier groupe comprend les dispositifs à rotor stator (ex : cellule de Couette), les broyeurs colloïdaux (ex. UltraTurrax), les membranes (ex. Shirasu Porous Glass) et les systèmes microfluidiques (Poux and Canselier, 2004).

Pour le deuxième système on peut citer les techniques de fragmentation par ultrasons et les homogénéisateurs à haute pression (ex. Microfluidizer®). Quelques données numériques relatives aux tailles accessibles par ces procédés sont résumées dans la **Table 2.1**.

L'émulsification avec des membranes permet d'obtenir des gouttes avec des tailles allant de 0,2 à 100 microns et une bonne monodispersité (Leal-Calderon et al., 2007). Le principe est simple : la phase dispersée est injectée dans la phase continue à travers une membrane dont les pores ont des tailles identiques. Les membranes disponibles peuvent être fabriquées en verre microporeux, en silicium, en polymère ou en céramique (Joscelyne and Trägårdh, 2000).

Les homogénéisateurs de type Microfluidizer® consistent à faire passer une pré-émulsion sous haute pression (de 5 à 100 MPa) dans un espace confiné. Le mélange sous pression est alors soumis à un mélange de turbulence hydrodynamique et de cavitation qui le fragmente en des gouttelettes de plus petite taille allant de 0,05 à 5 μm (Leal-Calderon et al., 2007).

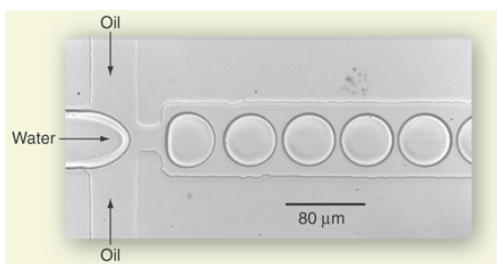


Figure 2.6. Techniques microfluidiques pour l'obtention d'émulsions monodisperses. Barre d'échelle : 200 μm . Image adaptée de (Joanicot and Ajdari, 2005).

Les procédés à ultrasons représentent une alternative aux procédés d'émulsification mécanique. Les émulsions issues de ce type de système peuvent être très petites et très stables (Delmas et al., 2011). La taille des gouttes obtenue dépend de la puissance ultrasonore, de la tension interfaciale et de la viscosité de chaque phase. Elles peuvent varier entre 40 nm (Leong et al., 2009) jusqu'à atteindre la centaine de microns (Abismaïl et al., 1999).

La microfluidique (cf. **Figure 2.6**), du fait qu'elle permet un très bon contrôle des modes de déstabilisation des gouttes lors de leur formation (Bremond and Bibette, 2012), est la seule technique qui autorise l'obtention de distributions de tailles parfaitement monodisperses en contrôlant les débits et les géométries des systèmes. Du fait des contraintes de microfabrication, les tailles des gouttes varient généralement entre 10 et quelques centaines de microns de diamètre, et les volumes produits sont faibles. Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé un émulsificateur de type Couette, dont nous détaillerons le principe dans le chapitre 3.

V. Applications des émulsions en pharmacologie

Comme nous l'avons évoqué plus haut, les émulsions sont des matériaux dont l'usage est très répandu. Dans la suite, nous décrirons succinctement quelques applications pharmaceutiques pour la délivrance de principes actifs et les expériences de recherche pour lesquelles les émulsions ont été utilisées comme outils pour répondre à des questions biophysiques et/ou biologiques.

V.1. Administration de principes actifs

L'utilisation de dispersions lipidiques, tels que des émulsions H/E ou des liposomes, comme vecteurs de principes actifs ou agents thérapeutiques lipophiles suscite un intérêt important depuis plus d'une cinquantaine d'années (Hashida et al., 1977; Hashida et al., 2005; Kawakami et al., 2000; Mizushima, 1996). En effet, de nombreux principes actifs courants comme les molécules anticancéreuses, la prostaglandine E1, le diazépam ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens ont un caractère lipophile qui nécessite leur encapsulation dans un corps lipidique pour augmenter leur solubilité dans le plasma sanguin et limiter leur élimination par les diverses voies de dégradation de l'organisme. La distribution des principes actifs nécessite donc de considérer plusieurs paramètres tels que la voie d'administration, la taille des particules de transport, la composition lipidique, la diffusion ou relargage des agents d'intérêt ainsi que les propriétés de surface.

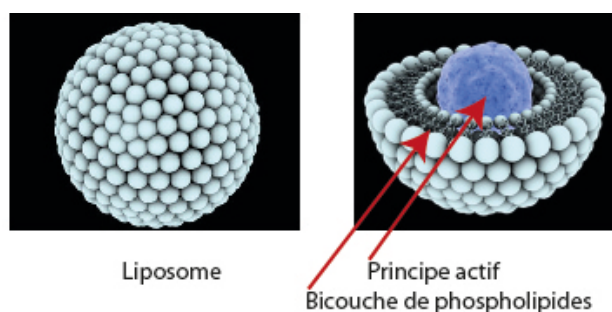


Figure 2.7. Représentation schématique d'un liposome contenant un principe actif encapsulé au sein de la bicouche lipidique. *Source : CNRS – Sagascience - François Caillaud.*

Les liposomes sont des vésicules sphériques constituées d'une double couche lipidique de phospholipides (cf. **Figure 2.7**) souvent associés avec d'autres molécules (cholestérols, sphingolipides, glycolipides, ...) et contenant un compartiment aqueux (Gregoriadis, 1976; Samad et al., 2007). Ce sont d'excellents vecteurs de principes actifs hydrophiles et lipophiles, ces derniers étant dissous dans la membrane ou présents sous forme cristalline dans le compartiment aqueux interne. Cependant et malgré leur caractère non toxique et biocompatible, ils présentent des inconvénients relatifs à leur faible stabilité et au fait qu'ils ne peuvent être produits en grandes quantités (Hashida et al., 2005).

Non-exhaustive or selected list of marketed medical and non-medical emulsions

Parenteral fat emulsions (o/w type) for nutrition		Registered emulsions (o/w type) containing drugs			
Product	Producer	Product	Drug	Producer	Application
Abbolipid/Liposyn	Abbott	Diazepam-Lipuro	Diazepam	Braun Melsungen	IV
Intralipid	Pharmacia-Upjohn	Diprivan	Propofol	AstraZeneca	IV
Lipofundin N/Endolipide	B.Braun	Etomidat-Lipuro	Etomidate	Braun Melsungen	IV
Lipofundin MCT/LCT/		Lipotalon	Dexamethasone		
Medialipide/Vasolipid	B.Braun	(Limethason)	Palmitate	Merckle	Intra-arthr.
Medianut	B.Braun	Stesolid	Diazepam	Dumex	IV
Lipovenos	Fresenius	Sandimmune	Cyclosporin A	Novartis	Oral
Ivelip/Salvilipid	Clintec/Baxter	Neoral	Cyclosporin A	Novartis	Oral
Clinoleic	Clintec/Baxter	Gengraf	Cyclosporin A	Abbott	Oral
Intralipos	Green Gross	Norvir	Ritonavir	Abbott	Oral
Kabimix	Pharmacia-Upjohn	Restasis	Cyclosporin A	Allergan	Ocular topical use
Trivè 1000	Baxter SA	Refresh Endura	Drug-free	Allergan	Ocular topical use
		Fluad (MF59)	Adjuvant	Chiron	Parenteral use

Perfluorocarbon emulsions (fluorocarbon-in-water emulsions)			Selected topical formulations based on o/w or w/o emulsion	
Product	Producer	Application	Product	Producer
Fluosol DA	Green Gross, Osaka	Blood supplement or O ₂ carrier	Daivonex cream and ointment	Laboratoire Leo
Imagent	Alliance Pharmaceutical Corp	Contrast agent to image heart	Voltaren emulgel	Ciba-Geigy
Oxygent	Alliance Pharmaceutical Corp	Blood supplement or O ₂ carrier	EMLA cream	Astra, Sweden

Table 2.2. Liste non exhaustive des formulations commerciales d'émulsions disponibles en 2004 sur le marché. Les émulsions à base d'huiles fluorées sont majoritairement utilisées comme sang artificiel ou agents de contraste (Tamilvanan, 2004).

Les émulsions peuvent pénétrer dans le corps à travers différentes voies d'administration : par voie topique (à travers la peau), par voie entérale (via le tractus gastro-intestinal), par voie parentérale (intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée) et plus rarement par voie respiratoire (aérosols, inhalations). Toutes les émulsions destinées à être administrées par voie intraveineuse (parentérale) sont de type H/E et doivent être stériles, isotoniques, non toxiques, biodégradables, de tailles bien contrôlées et stables d'un point de vue physico-chimique afin de répondre aux exigences de la pharmacopée (Leal-Calderon and Cansell, 2012).

Pour les applications pharmaceutiques parentérales (IV) (cf. **Table 2.2**), on utilise souvent des huiles végétales en raison de leur biocompatibilité et la bonne stabilité de leurs émulsions dans le temps (Hashida et al., 2005). Les huiles végétales comme l'huile de soja sont riches en triglycérides, biodégradables et connues pour leur pouvoir immunogène (Deckers et al., 2004). Pour stabiliser les émulsions l'ajout de tensioactif est nécessaire. Le plus souvent des tensioactifs naturels tels que les phospholipides sont utilisés (Hashida et al., 2005) cependant on trouve aussi dans les formulations commerciales des tensioactifs synthétiques non ioniques comme par exemple ceux des séries des Span, Tween ou Poloxamer (Rowe et al., 2006). Les émulsions correctement formulées restent stables pendant le stockage et ont une capacité de solubilisation des substances actives très élevée, (Kawakami et al., 2000).

V.2. Circulation des émulsions et optimisation de leur durée de vie

L'un des objectifs de l'administration de principes actifs par voie parentérale est principalement d'éviter leur élimination par le système immunitaire plus particulièrement par le système réticulo-endothélial et augmenter leur durée de vie dans la circulation sanguine. Ces mécanismes d'élimination diminuent les doses qui atteignent finalement les tissus cibles mais peuvent aussi engendrer des effets indésirables ou toxiques au niveau de certains tissus suite à l'accumulation des ces principes actifs éliminés dans les organes tels que le foie ou les reins.

Maranhao *et al.* ont démontré que la composition en cholestérol et le type de phospholipides utilisé est une propriété essentielle dans la détermination de la durée de vie des émulsions dans la circulation sanguine (Maranhao *et al.*, 1986). De plus, Kawakami *et al.* ont montré que l'utilisation de vecteurs de tailles et de compositions lipidiques bien contrôlées joue un rôle important dans l'augmentation de la durée de vie des émulsions dans le compartiment sanguin (Kawakami *et al.*, 2000). Ainsi, plus les particules sont petites (diamètre aux alentours de 100 nm), plus elles éviteront d'être piégées par les organes du système réticuloendothélial (Kurihara *et al.*, 1996). Non seulement la taille des gouttes est un paramètre important pour dévier le piégeage dans les organes d'excrétion comme les reins, mais elles doivent être suffisamment petites pour écarter les risques de blocage des vaisseaux sanguins (embolie graisseuse).

Dans l'acception générale, les gouttes d'émulsions circulant dans le sang sont très vite opsonisées et reconnues par les cellules du système immunitaire qui les élimine par endo- ou phagocytose (cf. **Figure 2.8**).

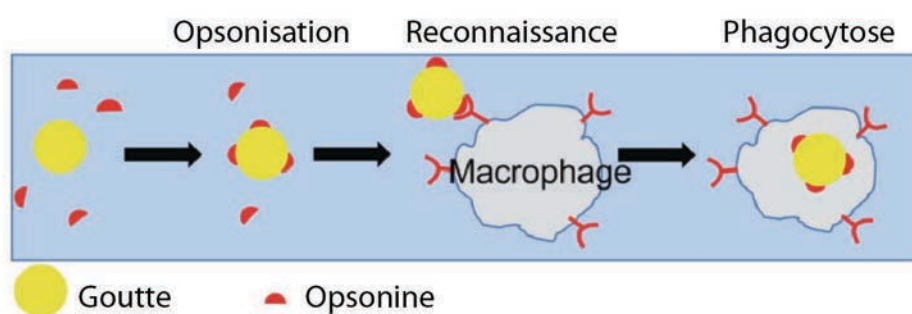


Figure 2.8. Représentation schématique de la phagocytose des gouttes opsonisées par les protéines du plasma sanguin. Image adaptée de (Leal-Calderon and Cansell, 2012).

Bien que ce phénomène soit fondamental pour la formulation de systèmes d'encapsulation efficaces, à notre connaissance, très peu d'études sont consacrées à l'analyse protéomique des protéines adsorbées à la surface de gouttes d'émulsions lorsque celles-ci sont dispersées dans un plasma sanguin (Harnisch and Müller, 2000; Tamilvanan *et al.*, 2005). La **Figure 2.9** montre que pour des émulsions composées d'huile de soja, de triglycérides et stabilisées par de la lécithine, l'interface est

majoritairement peuplée par des apolipoprotéines et des immunoglobulines. La proportion relative de ces différentes protéines varie de façon non linéaire avec la concentration en plasma sanguin dans la solution. La **Figure 2.10** montre que la charge des gouttes influence la répartition des espèces adsorbées à l'interface. Par comparaison, les récentes études relatives à l'étude protéomique des molécules adsorbées sur des particules solides comme du polystyrène montrent des profils d'adsorption très différents, à la fois en termes de type de protéines à l'interface, mais aussi en termes de composition (Lundqvist et al., 2008; Tenzer et al., 2013).

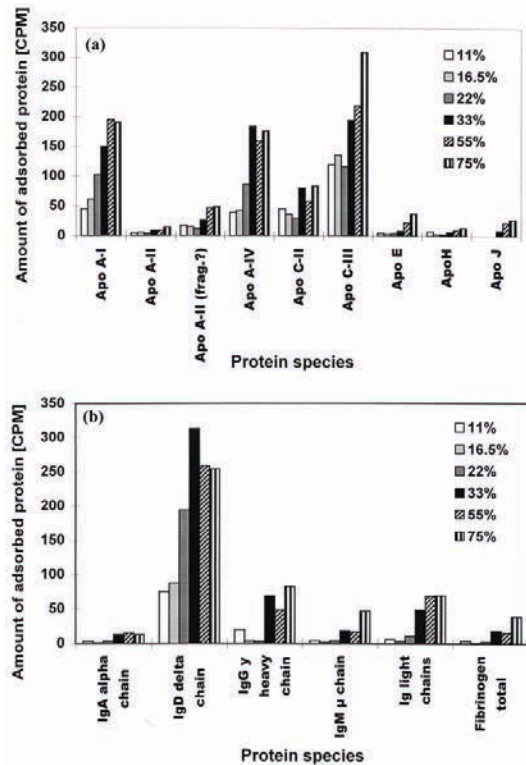


Figure 2.9. Proportion relative des principales protéines du plasma sanguin adsorbées à la surface d'émulsions d'huile de soja et de triglycérides stabilisées par de la lécithine (Lipofundin MCT). Les histogrammes donnent la variation en fonction de la concentration massique en plasma sanguin (Harnisch and Müller, 2000).

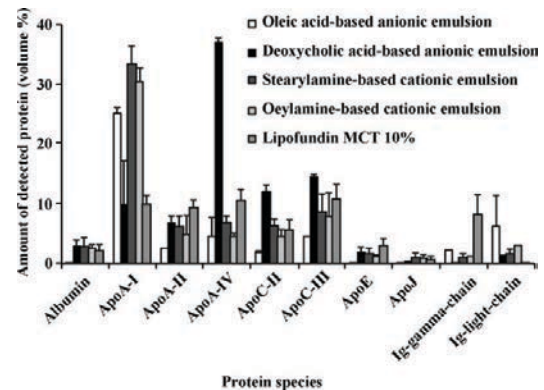


Figure 2.10. Proportion relative des principales protéines du plasma sanguin adsorbées à la surface d'émulsions de formulations et charges différentes (Tamilvanan et al., 2005).

La durée de vie d'une émulsion encapsulant des principes actifs peut être améliorée par une fonctionnalisation de surface adéquate. Par exemple, en fonctionnalisant la surface des émulsions avec du polyéthylène glycol (PEG, le polymère le plus couramment utilisé pour éviter le processus d'élimination des vecteurs de principes actifs), on améliore leur durée de vie (Hamidi et al., 2008). En effet, la présence de PEG induit un encombrement stérique et permet d'inhiber l'adsorption des opsonines à la surface des gouttes, d'esquiver l'élimination par le système réticulo-endothélial et de prolonger ainsi le temps de circulation.

Liu *et al.* (Liu and Liu, 1995) ont étudié l'effet de la longueur de la chaîne de polymère (PEG-PE 1000, 2000 and 5000), et ont montré que pour une masse molaire de 2000 g.mol⁻¹, le temps de circulation des émulsions dans le sang était prolongé. En effet, 30 minutes après l'injection de l'émulsion, il restait 70% de la dose initiale injectée de l'émulsion contenant du PEG 2000, 60% de celle contenant du PEG 5000 et 47% de celle contenant du PEG 1000. Six heures après l'injection des émulsions, celle ne contenant que des phospholipides (lécithine) était totalement éliminée de la circulation sanguine alors qu'il restait 25% de la dose initiale injectée de l'émulsion contenant du PEG 2000.

V.3. Vectorisation et administration ciblée de principes actifs

Outre la solubilisation et l'augmentation du temps de résidence en circulation d'un principe actif, on voudrait de plus faire en sorte qu'il soit délivré de manière ciblée au sein de l'organisme, notamment pour éviter des effets secondaires sur les organes sains et diminuer les doses administrées. Ce ciblage actif peut être obtenu par la présence de ligands biologiques à la surface des gouttes d'émulsions qui seront reconnus de manière spécifique par les tissus d'intérêt (Winter *et al.*, 2003). La fonctionnalisation des surfaces peut se faire par des immunoglobulines ou leurs fragments de petits poids moléculaire (Song *et al.*, 1996), des saccharides (Iwamoto *et al.*, 1991) ou peptides (Tamilvanan, 2004), souvent couplés à une chaîne de polyéthylène glycol en tant que bras espaceurs. De cette manière les ligands possèdent une plus grande liberté de mouvement qui favorise leur reconnaissance par les récepteurs spécifiques de la cible.

VI. Applications des émulsions en biophysique

Plusieurs études ont été publiées, relatives à l'utilisation d'émulsions comme outils pour comprendre ou tout du moins questionner certains phénomènes biologiques comme l'adhésion cellulaire, l'activation de lymphocytes ou la génération de forces pendant l'embryogénèse.

En 2002, Ravaine *et al.* ont montré que des gouttes d'émulsions, chargées positivement grâce à l'incorporation d'un lipide utilisé pour la transfection, étaient capable d'adhérer à la surface chargée négativement de cellules J774 (Ravaine *et al.*, 2002). L'adhésion s'accompagne de la formation d'un angle de contact qui permet de relier l'énergie d'adhésion à la densité de lipides présents à l'interface des gouttes (cf. **Figure 2.11**).

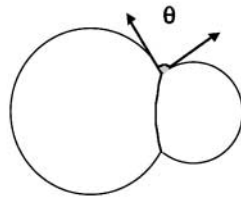
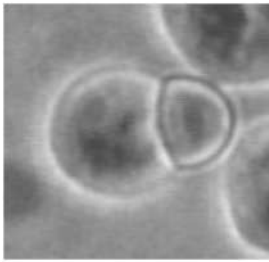


Figure 2.11. Goutte d'émulsion adhérant à une cellule J774 grâce à l'incorporation de lipides cationiques (DOTAP) dans l'huile. L'adhésion fait apparaître un angle de contact de 120° environ (Ravaine et al., 2002).

Fattaccioli *et al.* (Fattaccioli et al., 2008) ont exploré la capacité des émulsions à adhérer de manière spécifique à des surfaces modèles solides et notamment la relation entre la le nombre de liens ligand-récepteur entre la goutte et le substrat et la formation d'un angle de contact macroscopique (cf. **Figure 2.12**). Dans ces expériences, des gouttes fonctionnalisées par de la biotine et de la streptavidine adhèrent à des surfaces de verre fonctionnalisées par de la biotine. Cette fonctionnalisation peut se faire directement sur le verre (Fattaccioli et al., 2008) ou sur une bicouche lipidique fluide qui apporte de la mobilité aux ligands de la surface solide (Emerard, 2010).

Lors de l'adhésion spécifique au substrat, l'angle de contact et l'énergie d'adhésion augmentent linéairement en fonction de la densité de liens entre la goutte et la lamelle. Les observations microscopiques ont montré qu'indépendamment de la quantité de liens, la streptavidine présente à la surface de la goutte est recrutée dans la zone de contact avec le substrat et que ce recrutement tend à créer une zone dense en protéines par seule diffusion passive bidimensionnelle (cf. **Figure 2.13**).

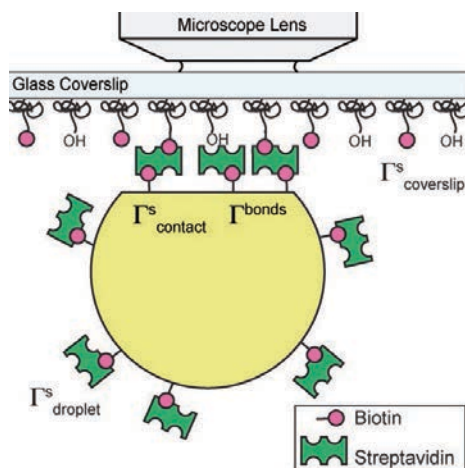


Figure 2.12. Schéma représentatif d'une goutte d'émulsion fonctionnalisée par des streptavidines fluorescentes et mobiles sur la surface. La goutte adhère sur une lamelle de verre avec formation d'un angle de contact (Fattaccioli et al., 2008).

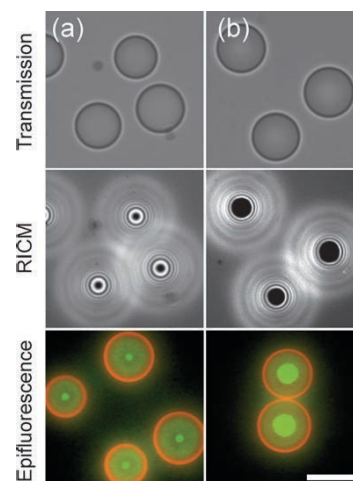


Figure 2.13. Images en transmission, en RCM, et en épifluorescence de gouttes d'émulsion fonctionnalisées avec de la streptavidine fluorescente (vert) et adhérentes à des lamelles de verre (a) non fonctionnalisées et (b) biotinylées. Dans les deux cas, les gouttes adhèrent au substrat avec la formation d'une zone de contact, néanmoins plus dense en (b). Échelle : $5\ \mu\text{m}$.

Bourouina *et al.* ont étudié l'adhésion entre gouttes fonctionnalisées par des molécules adhésives complémentaires (Bourouina et al., 2011). Les expériences ont là encore montré que l'adhésion s'accompagne d'un recrutement des ligands dans la zone de contact (cf. **Figure 2.14**). L'origine du phénomène de recrutement n'est à l'heure actuelle pas totalement élucidée, mais pourrait n'être qu'une conséquence d'un environnement physico-chimique plus favorable dans la zone de contact pour les ligands.

Les gouttes d'émulsions ont été utilisées pour étudier la mécanique de l'adhésion cellulaire et plus précisément le rôle de la pression homéostatique. À cet effet, la aussi des gouttes fonctionnalisées par le couple biotine-streptavidine et assemblées en 3D ont été soumises à une compression externe. Il a été démontré qu'une pression seuil est nécessaire pour dépasser la répulsion électrostatique et la limite d'élasticité surfacique pour établir une adhésion par la liaison des protéines (Pontani et al., 2012).

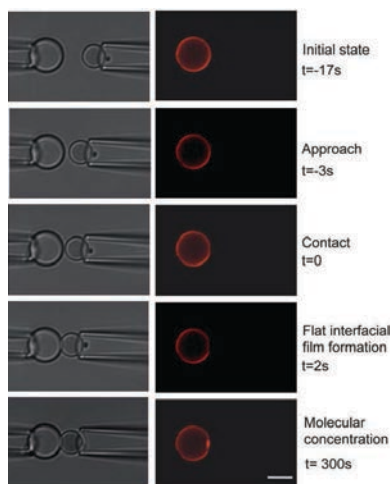


Figure 2.14. Time-lapse en transmission et en fluorescence de la micromanipulation de gouttes fluorescentes fonctionnalisées par la streptavidine en contact avec des gouttes non fluorescentes fonctionnalisées par la biotine (Bourouina et al., 2011). Échelle : 5 μm .

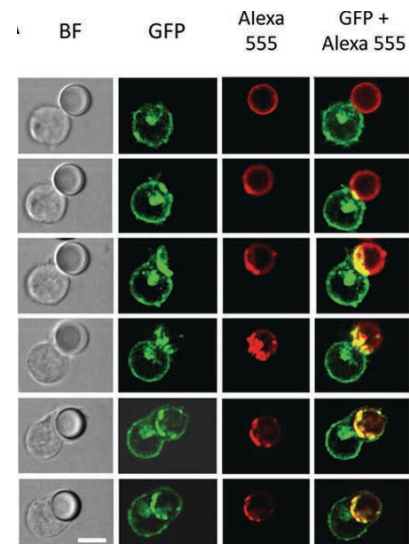


Figure 2.15. Images en time-lapse montrant les principales étapes dynamiques de la formation d'une zone de contact entre des cellules T et des gouttes fonctionnalisées avec des anti-CD3 (Bourouina et al., 2012). Échelle : 5 μm .

Les émulsions peuvent être utilisées pour des études impliquant des cellules à l'échelle de l'objet unique. En effet, Bourouina *et al.* (Bourouina et al., 2012) ont montré que des gouttes fonctionnalisées par des anti-CD3 pouvaient se lier et être internalisées par des lymphocytes T de type Jurkat. L'adhésion des gouttes aux cellules s'accompagne d'un recrutement des anti-CD3 dans la zone de contact qui colocalisent avec les récepteurs de la cellule. Ce recrutement est permis par la fluidité de l'interface et n'est pas observable lorsqu'on utilise des surfaces solides comme des billes de polystyrène.

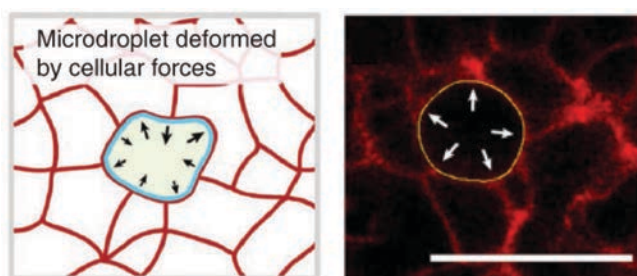


Figure 2.16. Gouttes d’huiles sphériques en solution et intégrées entre les cellules embryonnaires en tant que capteurs de force (Campàs *et al.*, 2013). Barre d’échelle : 20 μm .

Du fait de l’existence d’une tension de surface, les émulsions H/E sont déformables et peuvent être utilisées comme capteurs de force en analysant leur déformation. Ce principe a été mis en œuvre par Campàs *et al.* (Campàs *et al.*, 2013) pour la mesure des forces mécaniques générées par les cellules pendant la croissance des tissus et l’embryogénèse. Des gouttes fonctionnalisées avec des protéines d’adhésion comme les cadhérines ont été introduites entre les cellules dans les tissus (cf. **Figure 2.16**). La mesure du stress mécanique exercé par le tissu sur les gouttes a été effectuée par une analyse de la courbure gaussienne de la goutte dont la tension de surface était bien caractérisée.

VII. Gouttes d’émulsions pour l’étude de la phagocytose

L’utilisation des gouttelettes d’émulsions pour la compréhension des mécanismes de phagocytose remonte à 1973 lorsque Stossel *et al.* (Stossel *et al.*, 1972) ont étudié les effets de différentes drogues et hormones sur la vitesse initiale d’internalisation de gouttes constituées d’huile minérale et fonctionnalisées avec des macromolécules courantes comme l’albumine ou la gélatine. Cette étude a montré que l’utilisation de tensioactifs non ioniques pour la formulation des gouttes inhibait la phagocytose, alors que la présence de charges cationiques ou anioniques à la surface avait tendance à la stimuler. Cette observation est en accord avec ce qui avait été mesuré par Tabata *et al.* (Tabata and Ikada, 1988) pour des particules de polymère, et a été confirmée pour des émulsions formulées avec du poloxamer par Davis *et al.* (Davis and Hansrani, 1985).

Plusieurs études se sont inspirées de la méthode de préparation des émulsions proposée par Stossel *et al.*, pour la formulation de gouttes d’huile de paraffine contenant de la cholestanone comme marqueur de spin et fonctionnalisées cette fois-ci avec du lipopolysaccharide (LPS), de la BSA ou encore des protéines du complément (Ito *et al.*, 1981; Matsui *et al.*, 1983). Ces études ont apporté de nouvelles réponses quand aux effets de la température d’incubation, la présence de cations divalents et de certains inhibiteurs dans le milieu extracellulaire.

En effet, la présence de Ca^{2+} et Mg^{2+} dans le milieu d’incubation avec les cellules est essentielle pour l’étape d’attachement de la particule à la surface de la cellule mais n’ont aucun effet sur l’étape

d'ingestion. Par ailleurs, l'utilisation d'une drogue inhibitrice de la polymérisation de l'actine, la cytochalasine B, inhibe les deux étapes, tandis que la colchicine n'inhibe que l'étape de fixation. Des effets de la température d'incubation sur l'efficacité de l'internalisation ont aussi été observés. Ainsi, de faibles températures diminuent considérablement le nombre de particules opsonisées attachées à la surface de la cellule. De plus, les constantes de vitesse de l'ingestion diminuent aussi pour des températures inférieures à 30°C.

Plus récemment, Hsu et *al.* (Hsu and Peng, 2001) ont étudié la phagocytose de gouttes d'émulsions de perfluorocarbène préparées avec comme surfactants du Rf-PEG (perfluoroalkylé), pluronic F-68 et des phospholipides de jaune d'œuf. Ils ont démontré que la présence du tensioactif PEG modifié induisait l'inhibition de la phagocytose (Hsu and Peng, 2001).

Toutes ces études sont des études macroscopiques réalisées à partir de techniques analysant un grand nombre de cellules à la fois : RMN (Hsu and Peng, 2001), RPE (Matsui et al., 1983), radiomarquage (Forsgren et al., 1977), densité optique (Stossel et al., 1972), etc. Bien que quantitatives, elles ne permettent pas d'avoir des informations sur les phénomènes à l'échelle de la cellule unique, et ne sont réalisées qu'avec des matériaux assez peu caractérisés. Par exemple, les distributions de tailles, concentrations en objets et caractérisation fine des surfaces sont souvent des données manquantes qui rendent difficile une analyse microscopique de la phagocytose des émulsions.

Objectifs du travail de doctorat : Vers de nouveaux matériaux

Jusqu'à présent, la majorité des études concernant la phagocytose utilise des particules de polymère. Elles représentent donc un matériau de choix pour la modélisation du processus de phagocytose. En plus d'avoir des tailles et des morphologies bien contrôlées, on peut fonctionnaliser leurs surfaces avec des protéines biologiquement actives ainsi que des molécules chimiques. Elles sont ainsi parfaitement internalisées dans diverses lignées cellulaires, donnant accès à de nombreux paramètres qui gouvernent le processus de phagocytose. Bien que ces modèles de particules représentent un système très pratique et flexible pour des analyses pertinentes dans la compréhension du phénomène de phagocytose, leur utilisation comporte toutefois certaines limites.

En effet, nous avons soulevé, des études présentées dans ce chapitre, un point essentiel qui est la sensibilité du processus de phagocytose aux paramètres physiques (*i.e* taille, géométrie, etc) et mécaniques de la particule cible à internaliser. Ainsi, il a été démontré que dans le cas des billes de polyacrylamide fabriquées avec différents degrés de réticulation, les particules rigides qui en résultent sont plus efficacement internalisées que celles qui sont déformables (Beningo and Wang, 2002). Ces dernières ne permettent pas la formation du *cup* d'actine qui initie l'internalisation suggérant l'existence d'une mécano-sensibilité cellulaire durant la phagocytose.

Par ailleurs, on sait depuis plusieurs années maintenant que selon les interactions et sollicitations mécaniques de son environnement, la cellule modifie son comportement en réponse à ces signaux. Les stimuli mécaniques par exemple, peuvent activer la migration cellulaire à travers la réorganisation du cytosquelette et les adhésions focales, (Heidemann and Kaech, 1999; Riveline et al., 2001). Ainsi, la signalisation mécanique peut jouer un rôle tout aussi important dans le processus de phagocytose.

Les particules de polymères en polystyrène, du fait de leur rigidité, ne donnent pas accès au comportement des cellules en réponse à des sollicitations mécaniques.

Par ailleurs, nous avons vu que la fonctionnalisation des particules de polymères, qui vise la reconnaissance par les macrophages en tant qu'objets cibles, n'est pas totalement représentative de ces derniers. En effet, un paramètre essentiel des cellules phagocytées par les macrophages réside en la mobilité latérale des antigènes présents à leurs surface (Berk and Hochmuth, 1992; Cherry, 1979; Edidin and Zuniga, 1984). Cette mobilité ne peut être reproduite par des particules de polymère solides. En effet, ces objets sont généralement opsonisés par des ligands fixés par adsorption non spécifique et ne peuvent diffuser à la surface pour répondre aux sollicitations des récepteurs de la

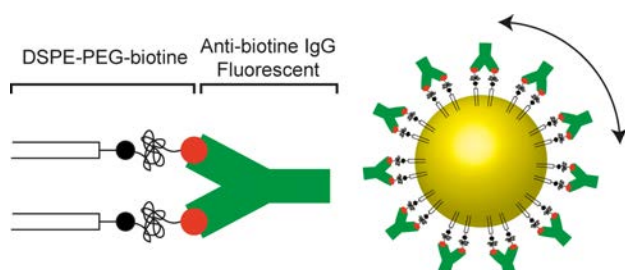
membrane cellulaire (Champion & Mitragotri, 2006b; Pacheco, White, & Sulchek, 2013; Sharma et al., 2010). Il serait donc plus intéressant pour le biologiste d'avoir recours à des objets déformables, modélisant au plus près le comportement cellulaire.

Dans ce contexte, l'usage des gouttes d'émulsions est déjà très répandu dans différents domaines comme la cosmétique, l'agroalimentaire ou la pharmaceutique. Leur utilisation présente des avantages pratiques en termes de coût et de facilité de préparation tout en considérant la diversité des matières premières disponibles. Selon la taille (micro, nano, macro-émulsions), la composition du cœur des gouttes (naturelles ou synthétiques), la surface (présence de tensioactifs, phospholipides, antigènes, polymères...) on peut avoir accès à des gouttes avec des propriétés différentes.

Ces gouttes ont précédemment fait l'objet d'études pour la compréhension du mécanisme de la phagocytose. Bien que quantitatives, ces études ne donnent pas accès aux informations à l'échelle de la cellule unique ni d'autres éléments sur l'influence possible de la nature de l'interface liquide vs. solide. D'autre part, les résultats des expériences biophysiques réalisées avec des gouttes d'émulsions montrent que deux de leurs propriétés physico-chimiques sont intéressantes. Outre l'accès à des densités contrôlées de protéines actives à leurs interfaces, les gouttes d'émulsions liquides présentent des surfaces totalement fluides qui peuvent être fonctionnalisées avec des ligands libres de diffuser à l'interface.

Nous avons donc choisi de les utiliser en tant que système modèle pour l'étude et la compréhension du phénomène de phagocytose qui nous intéresse. Ces gouttes constituent un nouveau modèle plus proche des membranes des cellules cibles et permettent la modélisation de la diffusion latérale des antigènes à leurs surfaces.

Ainsi, nous proposons, dans une première partie de l'étude, de fabriquer et de caractériser des gouttes d'émulsions d'un diamètre qui correspond à celui d'une cellule (7 μm). Au vu de la reconnaissance essentielle par les macrophages, les gouttes doivent être fonctionnalisées. La figure suivante présente un schéma de principe de la fonctionnalisation des gouttes.



Représentation schématique de la méthode de fonctionnalisation utilisée permettant d'obtenir des gouttes fonctionnalisées avec des IgGs libres de diffuser à la surface.

Nous avons choisi de les fonctionnaliser par des immunoglobulines IgGs fluorescentes, latéralement mobiles à la surface. Dans une deuxième partie, nous étudierons la phagocytose de ces gouttes par des macrophages.

On cherche tout d'abord à déterminer si les gouttes sont spécifiquement internalisées par les macrophages. La cinétique d'internalisation ainsi que l'influence de la densité d'IgGs en surface sur l'efficacité de la phagocytose seront étudiés. Par la suite, nous allons comparer ces résultats avec des billes de polystyrène dans la même gamme de taille et fonctionnalisées avec les mêmes densités d'IgGs. On veut déterminer s'il y a une différence dans la reconnaissance des deux types de particules. Enfin, des hypothèses seront établies nous permettant de conclure quand à l'intérêt de l'utilisation de nos objet pour la modélisation de la phagocytose induite par les récepteurs Fc γ R.

Chapitre 3 : Synthèse et caractérisation des matériaux

I. Choix de la stratégie de fonctionnalisation	74
II. Matériaux utilisés	75
III. Réalisation d'émulsions	78
III.1. Réalisation d'émulsions polydisperses par cisaillement dans un mortier.....	78
III.2. Réalisation d'une émulsion monodisperse en utilisant la "Cellule de Couette ".....	79
III.3. Vieillissement de l'émulsion.....	82
IV. Fonctionnalisation de la surface	84
IV.1. Estimation de la quantité de biotine à l'interface des gouttes	85
IV.2. Visualisation de la présence d'IgGs par microscopie de fluorescence.....	86
IV.3. Estimation du temps caractéristique d'attachement des IgGs fluorescents	87
V. Caractérisation des gouttes fonctionnalisées.....	87
V.1. Méthode de détermination de la taille et de la concentration des gouttes.....	87
V.2. Quantification de la densité d'IgGs de surface par cytométrie de flux.....	89
V.3. Spécificité de l'adsorption des IgGs à la surface des gouttes	95
V.4. Contrôle de la densité de fonctionnalisation	96
V.5. Diffusion latérale des IgGs à la surface des gouttes	99
V.6. Mesure de la tension interfaciale des gouttes.....	99
V.7. Mesure du potentiel zêta des gouttes	102
VI. Fonctionnalisation des billes de polystyrène.....	104
VI.1. Fonctionnalisation des billes par des IgGs anti-biotines	104
VI.2. Saturation de la surface des billes avec des IgGs Lapin anti Chèvre FITC.....	105
Conclusion sur les matériaux fonctionnels étudiés.....	107

Préambule

L'objectif est de construire et caractériser des objets pouvant être phagocytés de manière efficace dans les gammes de tailles correspondant à celles de cellules (5 – 10 μm). Pour avoir une reconnaissance spécifique, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la phagocytose induite par les récepteurs Fc γ R. Parmi les différents matériaux utilisables, les gouttes lipidiques liquides sont des candidats intéressants. En effet, ce sont des matériaux dont l'usage est très répandu comme vecteurs colloïdaux de médicaments pour diverses applications thérapeutiques (Tamilvanan, 2004). Des études récentes ont de plus montré que les gouttes peuvent être fonctionnalisées par des molécules d'intérêt biologique (Boukellal et al., 2004) latéralement mobiles à l'interface (Fattaccioli et al., 2008).

Nous proposons donc de fabriquer et de caractériser des gouttes d'émulsions fonctionnalisées par des immunoglobulines IgGs, qui constituent un nouveau modèle pour l'étude de la phagocytose en culture *in vitro*. Dans ce cadre d'étude de la phagocytose, il y a plusieurs contraintes. Tout d'abord, pour avoir une particule modèle de cellules à phagocyter, il faut choisir une taille d'objet dans la même gamme.

Nous avons donc construit des gouttes d'environ 7 μm de diamètre. Ensuite, pour avoir une reconnaissance spécifique par les récepteurs Fc γ R il faut présenter en surface les ligands spécifiques. Nous montrerons dans la suite qu'une adsorption directe des immunoglobulines n'est pas réalisable sur notre système, aussi nous avons opté par une fixation de type ligand-récepteur sur la surface de la goutte ayant une fonctionnalisation primaire en biotine.

I. Choix de la stratégie de fonctionnalisation

Plusieurs méthodes peuvent théoriquement être mises en œuvre pour fonctionnaliser la surface de gouttes avec des immunoglobulines :

1. La première serait d'adsorber directement les IgGs à la surface des gouttes. Outre le fait que l'adsorption n'est pas la méthode optimale pour avoir une bonne orientation des protéines et garder leur fonctionnalité intacte, nous montrerons par la suite que ce protocole n'est pas utilisable avec nos objets.
2. La seconde serait de fonctionnaliser la surface des gouttes en créant une liaison covalente entre des molécules de l'interface eau/huile et des groupements présents dans la séquence primaire de la protéine (amino, carboxylique, etc.). Cette méthode a été mise en œuvre par Song *et al.* avec un couplage de type carbodiimide-sNHS entre des lipides DSPE-PEG-COOH et des anticorps (Song *et al.*, 1996). Nous n'avons pas mis cette méthode en œuvre car là encore, nous n'avons aucun contrôle de l'orientation des IgGs à la surface.
3. La troisième méthode serait d'introduire une fonctionnalisation primaire de type biotine à la surface des gouttes, puis d'utiliser des immunoglobulines anti-biotines. La fonctionnalisation primaire pourrait être réalisée de plusieurs manières :

Fattaccioli *et al.* (Fattaccioli *et al.*, 2008) ont fonctionnalisé des gouttes d'huile de soja avec de la biotine grâce à un protocole de type EDC-sNHS (Hermanson, 2013) les acides carboxyliques présents naturellement à la surface de l'huile par de la biotine amino-modifiée ($\text{NH}_2\text{-PEO}_3\text{-Biotine}$). Ces groupements COOH sont la conséquence de l'existence d'acides libres dans l'huile qui agissent comme surfactants pour l'émulsion (cf. **Figure 3.1**).

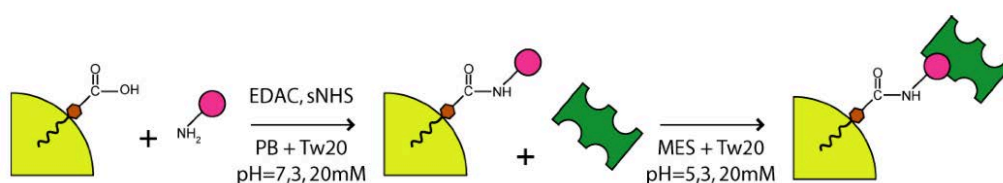


Figure 3.1. Représentation schématique de la méthode de fonctionnalisation de la surface en deux étapes (Fattaccioli, 2006).

Alors que ce protocole fonctionne très bien dans le cas où l'on veut attacher aux gouttes, dans un second temps, de la streptavidine, nous n'avons pas été en mesure d'obtenir des résultats convaincants dans le cas de l'utilisation d'immunoglobulines anti-biotines.

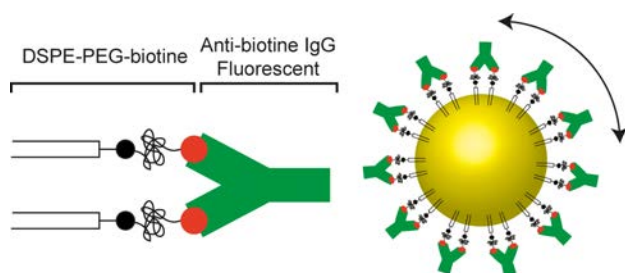


Figure 3.2. Schéma représentatif de la méthode utilisée. À l'aide de phospholipides biotinylés dissouts dans l'huile nous pouvons faire interagir des anti-biotines efficacement orientées et totalement libres de diffuser à l'interface.

Finalement, nous avons opté pour l'utilisation de phospholipides biotinylés, le DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotine, que nous avons dissout dans l'huile avant de réaliser les émulsions. Cette approche de fonctionnalisation est plus simple et rapide que les méthodes décrites si-dessus, et avait déjà été mise en œuvre dans le passé par d'autres groupes (Pontani et al., 2012; Trichet et al., 2007; Winter et al., 2003). *A priori*, cette solution de fonctionnalisation présente tous les avantages, tant en terme de fluidité de l'interface qu'en terme d'orientation des immunoglobulines vis-à-vis des récepteurs cellulaires (cf. **Figure 3.2**). Pour être capables de caractériser simplement la fonctionnalisation, mais aussi faciliter la visualisation de la dynamique spatio-temporelle des immunoglobulines lors du processus de phagocytose, nous avons choisi de travailler avec des IgGs fluorescents.

Dans la suite, nous allons premièrement décrire succinctement les matériaux utilisés pour réaliser les gouttes. Ensuite, nous détaillerons les deux méthodes de fabrication des émulsions que nous avons utilisées, l'une permettant d'obtenir des distributions monodisperses. Nous décrirons alors les méthodes de caractérisation de la taille et de la surface des gouttes. Enfin, je décrirai rapidement les protocoles de fonctionnalisation de billes de polystyrène par des immunoglobulines, leur caractérisation ainsi que l'objectif de leur utilisation.

II. Matériaux utilisés

Huile de soja. Les émulsions que nous avons étudiées sont des émulsions directes d'huile dans l'eau. Nous avons choisi d'utiliser l'huile de soja, car c'est une huile végétale biocompatible et largement utilisée dans les applications pharmaceutiques qui font intervenir le relargage de principes actifs (Abdekhodaie et al., 2012).

L'huile de soja est riche en acides gras polyinsaturés et notamment en acides gras essentiels alpha linoléique (cf. **Table 3.1**). Elle contient majoritairement de l'acide oléique (16%), de l'acide linoléique (50%), et de l'acide alpha-linolénique (12 %) (Ivanov et al., 2010). Les suspensions de gouttes d'huile de soja sont très stables (Chung et al., 2001). Cette stabilité est due à la composition riche en

triglycérides, molécules amphiphiles, et des traces d'acidité libre qui chargent négativement les gouttes et jouent le rôle de surfactants anioniques. La fraction en acides libres de l'huile de soja utilisée dans nos expériences a été analysée par le laboratoire CETIOM avec l'aide de M. T. Chardot (Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech) et varie entre 0,05 et 0,1%_{m/m} en fonction de l'état de vieillissement de l'huile.

Types d'acides gras	Pourcentage (% _{w/w})
Acide palmitique (C16: 0)	16,95 ± 0.09
Acide stéarique (C18: 0)	5,15 ± 0.32
Acide oléique (C18: 1, cis)	16.0 ± 0.21
Acide linoléique (C18: 2, cis : cis)	47,57 ± 0.15
Acide linolénique (C 18: 3)	12,11 ± 0.17
Acide arachidique (C20: 0)	1,40 ± 0.30

Table 3.1. Composition en acides gras (%_{w/w}) de l'huile de soja (Ivanov et al., 2010). Le composant principal est l'acide linoléique C18: 2.

Alginate de sodium. Les alginates sont des polysaccharides issus d'algues brunes. Les alginates sont utilisés comme épaississants, gélifiants, émulsifiants et stabilisants de produits industriels tels que les gelées alimentaires, les produits de beauté, et les peintures. L'ajout d'alginate de sodium permet d'augmenter la viscosité de la phase aqueuse ce qui permet une bonne fragmentation ultérieure. La formule chimique de l'alginate est présentée dans la **Figure 3.3**.

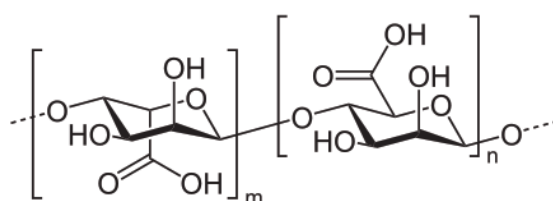


Figure 3.3. Formule chimique de l'acide alginique. Dans notre cas, nous utilisons de l'alginate de sodium.

Poloxamer 188 (Pluronic F68 ou Synperonic F68). Le Poloxamer 188 est un tensioactif de type copolymère tribloc formé de deux branches hydrophiles de polyéthylène glycol et d'une branche hydrophobe de polypropylène glycol (cf. **Figure 3.4**), couramment utilisé dans des formulations pharmaceutiques. En fonction du fabricant ou du fournisseur, il peut avoir pour nom commercial Pluronic F68 ou Synpéronic F68. On trouve commercialement des milieux de culture contenant une grande quantité de Pluronic F68 (jusqu'à 10% en masse) car ce dernier a un effet bénéfique sur la cicatrisation des pores de membranes cellulaires qui peuvent se former suite à des stress mécaniques liés par exemple au transport (Maskarinec et al., 2002). Le Pluronic F68 a une masse molaire de 8400

g.mol^{-1} et les bras PEG ont une longueur d'une dizaine de nanomètres lorsque le surfactant est adsorbé sur une surface de polystyrène (Lee et al., 1989). Sa CMC (Maskarinec et al., 2002) est de $0,125 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($0,1 \text{ \%}_{\text{m/m}}$).

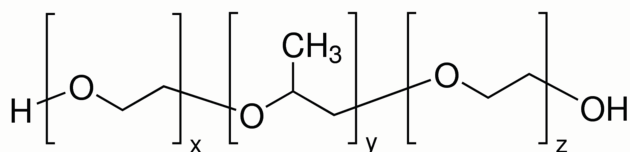


Figure 3.4. Le Pluronic F68 (Poloxamer 188) est composé d'un copolymère triblocs constitué d'une chaîne centrale polyoxypropylène hydrophobe et de deux chaînes hydrophiles polyoxyéthylène (formule générale : $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$), $x = z = 76$ et $y = 30$.

Tween 20. Le Tween 20 ou Polysorbate 20 (cf. **Figure 3.5**) est un tensioactif ethoxylé non toxique utilisé comme excipient dans les applications pharmaceutiques en tant que stabilisant des émulsions et des suspensions (Verbrugghe et al., 2010). Sa CMC (Hsu and Nacu, 2003) est égale à $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($0,0074 \text{ \%}_{\text{m/m}}$).

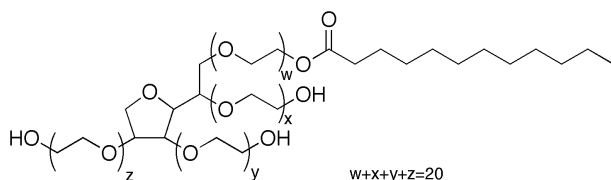


Figure 3.5. Formule chimique du Tween 20 ou Polysorbate 20. On a $w+x+y+z = 20$.

Phospholipides biotynilés. Pour réaliser la fonctionnalisation primaire des émulsions, nous avons incorporé à l'huile des phospholipides biotynilés de type DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotine (**Figure 3.6**) (distearoylphosphoethanolamine). La biotine, à la tête du phospholipide, de part la nature hydrophile du PEG, va se mettre à la surface des gouttes et permettre la liaison aux immunoglobulines anti-biotines fluorescentes décrites ci-dessous. La longueur du bras espaceur PEG est d'environ 4 nm (Efremova et al., 2000).

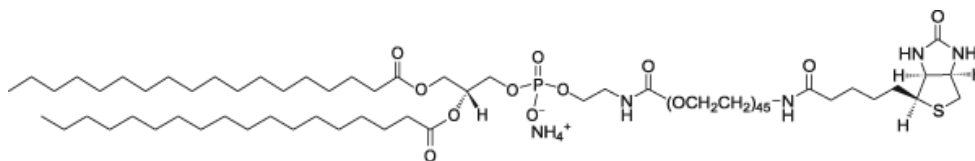


Figure 3.6. Le phospholipide biotynilé DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotine a la formule chimique suivante $\text{C}_{124}\text{H}_{280}\text{N}_5\text{O}_{56}\text{PS}$ ($\text{MW}=3016,78 \text{ g.mol}^{-1}$). Ce lipide est constitué d'un espaceur hydrosoluble et d'une biotine. Les deux chaînes aliphatiques hydrophobes vont se solubiliser dans l'huile.

IgGs anti-biotines fluorescentes. Les immunoglobulines utilisées pour fonctionnaliser les gouttes sont des IgGs de souris (isotype : IgGk, clone : 3D6.6) fournie par la société Jackson Immunoresearch (West Grove, PA). Pour aider à la visualisation microscopique, nous avons utilisé des IgGs fonctionnalisés par des fluorophores Alexa 488 (cf. **Figure 3.7**). L'immunoglobuline peut se lier par sa

partie Fab à deux antigènes, et par sa partie Fc à des récepteurs de type Fc γ . Grâce à leur forte affinité aux récepteurs Fc portés par les phagocytes, K_D de l'ordre de $5 \cdot 10^{-7}$ à 10^{-10} M (Jeong et al., 2010) ($5 \cdot 10^7 \leq K_a \leq 10^{10} \text{ M}^{-1}$). La constante de dissociation du complexe biotine/IgGs anti-biotines en solution est élevée, de l'ordre de $10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ (Jung et al., 2008).

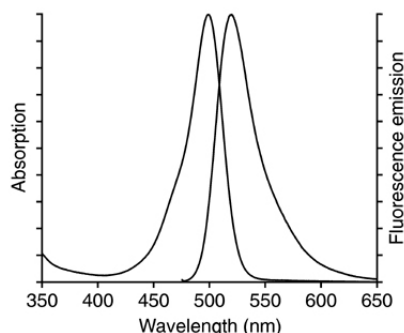


Figure 3.7. Spectre normalisé d'absorption et d'émission du fluorophore Alexa 488 ($\lambda_{\text{Exc}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$). Les spectres sont similaires à ceux de la fluorescéine.

III. Réalisation d'émulsions

L'opsinisation des gouttes s'effectue en utilisant des émulsions présentant des groupements biotine à leur surface puis en attachant à ces biotines des IgGs anti-biotines. La fonctionnalisation primaire est réalisée en dissolvant des phospholipides biotynilés de type DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotine.

Pour la fabrication de nos gouttes, nous avons choisi d'utiliser deux méthodes distinctes de fabrication: (i) fragmentation avec un mortier en agate et (ii) méthode de fragmentation avec un émulsificateur de Couette. Cette méthode nous permet d'avoir des gouttes avec des distributions de tailles très serrées et constituent un bon modèle pour l'étude des mécanismes biophysiques qui nous intéressent.

III.1. Réalisation d'émulsions polydisperses par cisaillement dans un mortier

Cette technique nous permet simplement et rapidement d'apprécier la qualité de fonctionnalisation des gouttes en n'utilisant que de faibles quantités de produits mais aussi d'avoir des résultats rapides de tests préliminaires de molécules biologiquement actives (streptavidine, immunoglobulines, biotine, etc). Dans ce cas, la fabrication de l'émulsion se fait manuellement en imposant une contrainte mécanique qui fournit l'énergie nécessaire à la création des interfaces des gouttes grâce au pilon et mortier.

Pratiquement, nous déposons tout d'abord un volume de 500 μL de phase continue contenant de l'eau, 15%_{m/m} de Pluronic F68 et 1%_{m/m} d'alginate de sodium au fond du mortier. Ensuite, nous ajoutons peu à peu 1,5 mL d'huile de soja éventuellement complétée en phospholipides (voir protocole dans la partie **Annexes**).

Cette technique conduit à des distributions polydisperses de petite taille comme on peut le voir dans la **Figure 3.8**. Nous avons utilisé ces objets dans les expériences préliminaires de phagocytose dans lesquelles nous avons évalué l'effet de la taille des objets sur l'internalisation.

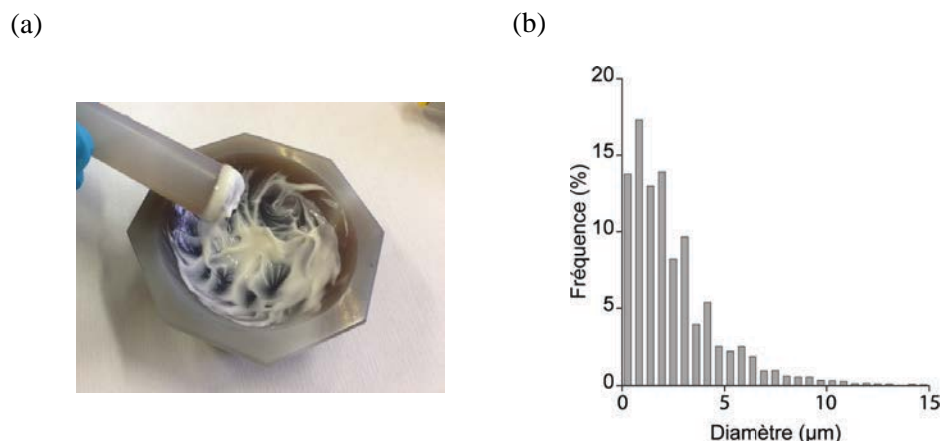


Figure 3.8. (a) Image du mortier en agate utilisé. (b) Distribution des gouttes d'émulsion faites au mortier en fonction de la taille obtenue à partir d'analyse d'images du microscope par le logiciel d'imagerie Image J. L'émulsion est polydisperse avec un diamètre moyen $< 5 \mu\text{m}$ pour 60% des gouttes.

III.2. Réalisation d'une émulsion monodisperse en utilisant la "Cellule de Couette"

La taille des gouttelettes que nous voulons fabriquer est un paramètre clé dans le sens où nous voulons construire des objets dans les gammes de tailles correspondant à celles des cellules et qui sont de l'ordre d'une dizaine de microns. Ces gouttes doivent avoir une distribution de tailles monodisperse. Pour la fabrication de ces émulsions, nous avons utilisé un émulsificateur de Couette dont le principe a été développé par Mason *et al.* (Mason and Bibette, 1997) et étudié par Mabillet *et al.* (Mabillet et al., 2000).

Cette technique permet d'obtenir des tailles de gouttelettes inférieures à $10 \mu\text{m}$, pour des systèmes présentant une viscosité importante en soumettant une première émulsion grossière à haute fraction volumique en phase dispersée fragmentée à la main (le *premix*) à un cisaillement spatialement homogène pendant un temps donné. Après fragmentation, le diamètre moyen des gouttes est fortement réduit et la distribution finale devient étroite, avec un CV (ratio de l'écart-type sur la moyenne) de l'ordre de la quinzaine de pourcents dans les meilleurs cas (cf. **Figure 3.9a**).

La cellule de Couette est un dispositif expérimental constitué de deux cylindres coaxiaux séparés par un faible entrefer d'une centaine de microns (cf. **Figure 3.9b**). Le cylindre extérieur est fixe tandis que le cylindre intérieur tourne à vitesse constante. Ce type de géométrie permet de cisailer de manière homogène un liquide ou une suspension présents dans l'entrefer. Au laboratoire, nous avons un des

prototypes fabriqués par la société TSR (Pessac, France), avec lequel nous pouvons produire quelques centaines de grammes d'émulsion grâce à un système de piston qui injecte continûment le *premix* dans l'entrefer (cf. **Figure 3.9c**).

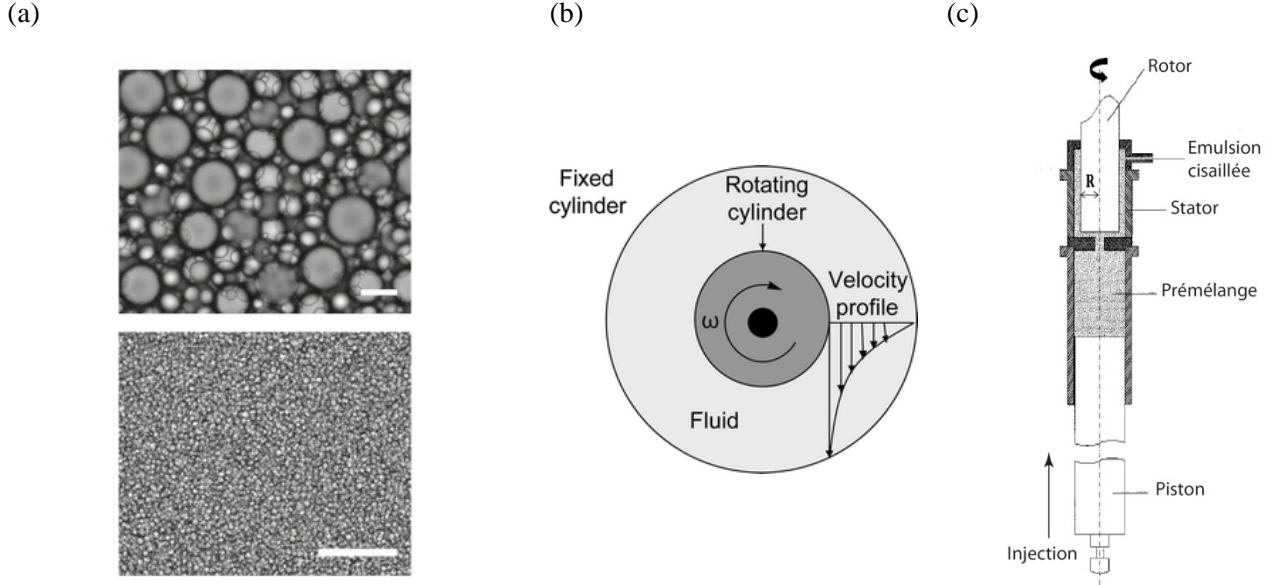


Figure 3.9. (a) Photographie d'un *premix* à la main et une émulsion fragmentée après passage en Couette. Échelle : 30 μm . (b) Plan d'une cellule de Couette avec le rotor interne, le stator externe, et une représentation du profil de vitesse. Dans un écoulement de Couette, le cisaillement est constant quelle que soit la distance à la paroi. (c) Schéma de l'émulsificateur de Couette que nous avons utilisé.

Si on considère une goutte de rayon R , de viscosité η_d dispersée dans un fluide de viscosité η_c . Comme nous l'avons évoqué dans la partie bibliographique relative aux émulsions, la déformabilité d'une goutte peut se caractériser par sa pression de Laplace :

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R}$$

où σ est la tension interfaciale entre les deux liquides, R le rayon de la goutte à fragmenter et ΔP la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la goutte.

Cette goutte est soumise à la contrainte visqueuse imposée par le cisaillement et définie par :

$$\tau = \eta_c \dot{\gamma}$$

où $\dot{\gamma}$ est le gradient de cisaillement appliqué et η_c la viscosité de la phase continue. On peut définir alors le nombre capillaire:

$$C_a = \frac{\tau}{\Delta P} = \frac{\eta_c \dot{\gamma}}{2\sigma} R$$

C_a est une grandeur adimensionnelle qui quantifie la compétition entre le cisaillement qui tend à déformer la goutte et la pression de Laplace qui tend à préserver sa forme sphérique. La fragmentation de la goutte initiale en plusieurs petites gouttes provient d'une instabilité capillaire dite instabilité de

Rayleigh, qui tend à minimiser l'énergie de surface lorsque la goutte initiale est assez allongée à cause du cisaillement (cf. **Figure 3.10**)

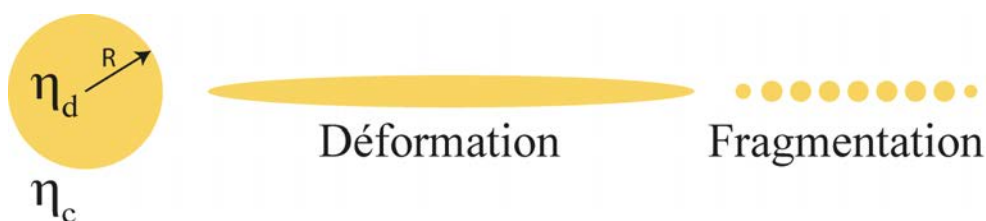


Figure 3.10. Processus de fragmentation qui utilise l'instabilité de Rayleigh. Lorsqu'une goutte de viscosité interne η_d est cisailée dans une phase externe de viscosité $\eta_c > \eta_d$, celle-ci s'allonge puis se divise en plusieurs petites gouttes.

Sans rentrer dans les détails (Leal-Calderon et al., 2007), l'utilisation d'un émulsificateur de Couette nécessite de travailler (i) avec une phase externe plus visqueuse que la phase à fragmenter ($\frac{\eta_d}{\eta_c} < 1$) et (ii) à des fractions volumiques en phase dispersée (huile) telles que les gouttes du *premix* soient au contact entre elles ($\Phi_{Huile} > 75\%_{w/w}$).

Pratiquement, on prépare 5 g d'une solution aqueuse contenant 15%_{w/w} de Pluronic F68, 1%_{w/w} d'alginate de sodium à laquelle on incorpore à la main et peu à peu 15 g d'huile de soja à la spatule. Les solutions de F68 et d'alginate nécessitent d'être préparées en avance de manière à obtenir des solutions homogènes.

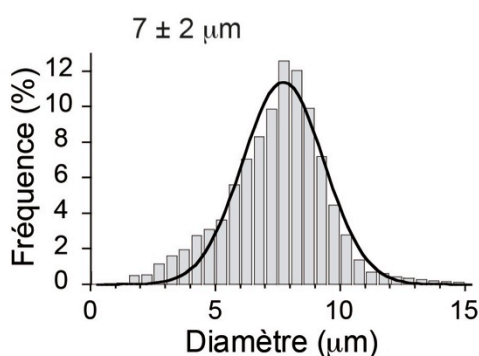


Figure 3.11. Distribution des gouttes d'émulsion en fonction de la taille obtenue à partir d'analyse d'images du microscope par le logiciel d'imagerie Image J. La distribution de taille suit une fonction gaussienne qui donne un diamètre moyen de $7 \pm 2 \mu\text{m}$.

En utilisant un entrefer de 100 μm et en appliquant une vitesse de rotation de 200 rpm, on obtient une émulsion dont le diamètre moyen est de l'ordre de 7 μm avec une polydispersité de 15% environ (cf. **Figure 3.11**). L'alginate de sodium permet d'augmenter la viscosité de la phase externe de manière importante et est donc ajustée pour pouvoir obtenir la taille de goutte désirée.

Pendant la réalisation du pré-mélange ou lors de l'étape de fragmentation, une population de petites gouttes peut apparaître. Afin de les éliminer, on rajoute une étape de décantation à l'abri de la lumière et en phase diluée dans une ampoule à décanter. La fraction finale en huile est de 5%_{m/m}, celle du tensioactif Pluronic F68 est de 1%_{m/m}. La phase sous-nageante composée d'eau, de tensioactifs et de petites gouttes browniennes est éliminée, les gouttes d'intérêt formant rapidement une phase séparée.

L'étape de décantation est renouvelée jusqu'à ce que la partie sous-nageante devienne limpide, indiquant qu'il n'y a plus de petites gouttes. On obtient alors une crème surnageante que l'on récupère. La fraction massique en huile de cette crème est d'environ 60%. Cette fraction est déterminée par pesée après séchage de la phase aqueuse.

III.3. Vieillessement de l'émulsion

Les émulsions sont des suspensions thermodynamiquement métastables dont la durée de vie est finie dans le temps. Les modes de déstabilisation sont nombreux et bien décrits dans la littérature : coalescence, mûrissement d'Ostwald, floculation ou crémage/sédimentation (Leal-Calderon et al., 2007).

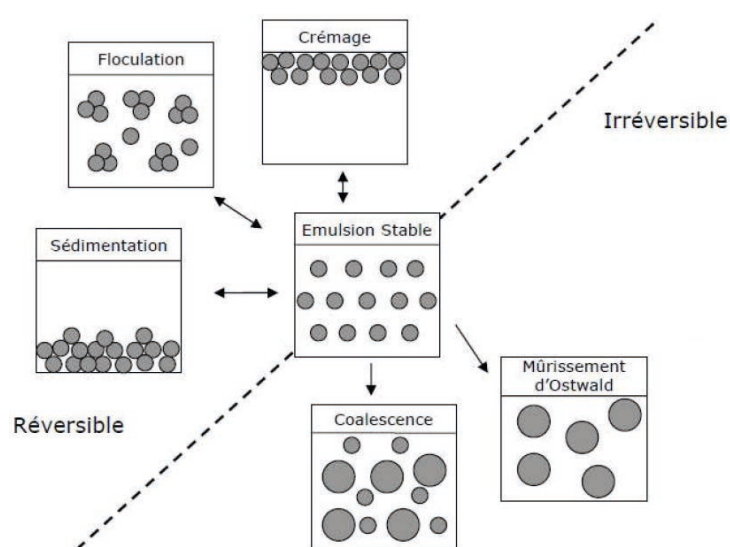


Figure 3.12. Modes possibles de déstabilisation d'une émulsion. Certains modes sont réversibles (floculation ou sédimentation) et d'autres sont irréversibles (coalescence ou mûrissement d'Ostwald).

Ceux-ci peuvent conduire à une déstabilisation irréversible de l'émulsion qui modifie la distribution de taille et peut même conduire à la destruction de l'émulsion et à la séparation macroscopique des deux phases (cf. **Figure 3.12**). Les modes réversibles, souvent associés à la gravité ou à des interactions attractives de type déplétion (Mason et al., 1995), conduisent au crémage ou à la sédimentation en fonction de la densité de la phase dispersée, et n'ont aucune incidence sur la distribution de taille initiale.

Dans les matériaux à base d'huile de soja de notre étude, les mécanismes de coalescence décrits ci-dessus sont inexistantes aux échelles de temps de stockage auxquelles nous travaillons pour peu que l'on les conserve dans des conditions contrôlées en luminosité et en température. En effet, l'huile de soja contient un mélange de triglycérides dont une grande partie des chaînes latérales est composée de lipides polyinsaturés comme l'acide linoléique. Ces acides se dégradent au contact de l'oxygène de

l'air et de la lumière (cf. **Figure 3.13**) et participent au rancissement de l'huile à l'odeur bien caractéristique. Pour éviter ce phénomène ainsi que la coalescence (Boyd et al., 1972), nous stockons les émulsions dans l'obscurité à une température de 12°C. Pratiquement, il s'agit d'une cave à vin à refroidissement Peltier.

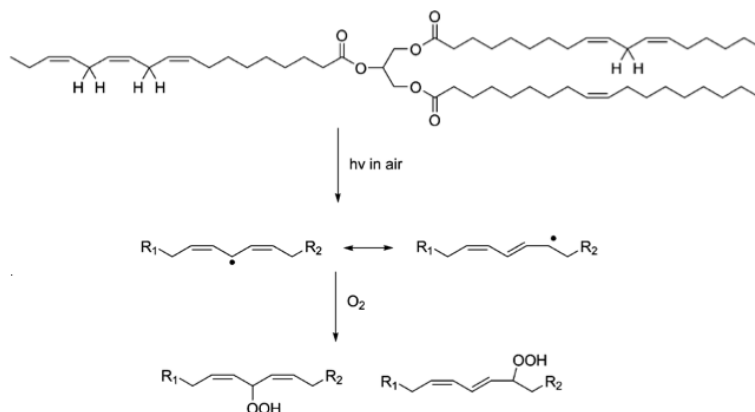


Figure 3.13. Schéma bilan d'un exemple de l'oxydation d'une huile végétale au contact de l'oxygène de l'air et de la lumière. Image adaptée de (Xia and Larock, 2010).

Outre la stabilité de l'émulsion en tant que particule support, nous voulons aussi avoir une stabilité de la fonctionnalisation par la biotine présente à l'interface. La biotine est portée par un phospholipide pegylé dont le squelette est une molécule de glycérol (cf. **Figure 3.13**). Cependant, l'hydrolyse des liaisons esters des phospholipides est observée au cours du temps en condition aqueuse, par la libération successive des deux acides qui conduit au départ du groupement phosphate-PEG₂₀₀₀-biotine en solution (Grit and Crommelin, 1993; Kensil and Dennis, 1981; Zuidam and Crommelin, 1995).

Nous avons observé expérimentalement qu'au bout de 6 mois, les émulsions n'étaient plus capables de fixer des IgGs anti-biotines et nous en avons conclu que les phospholipides biotinylés étaient complètement hydrolysés. Par conséquent, les lots d'émulsion sont fabriqués en tenant compte de cette contrainte.

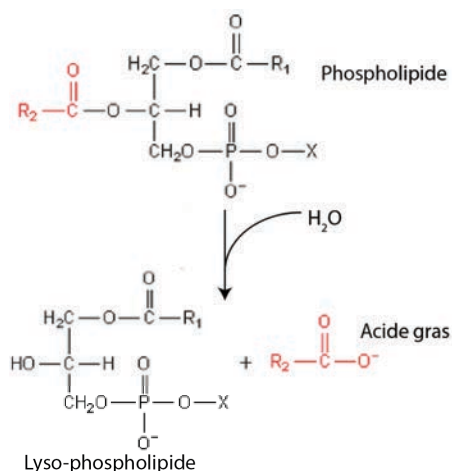


Figure 3.14. Représentation de l'équation bilan de l'hydrolyse d'un phospholipide en lyso-phospholipide et acide gras.

Dans nos expériences de phagocytose, nous travaillons dans des milieux qui ne contiennent pas de surfactants de manière à éviter des dégradations potentielles des membranes cellulaires. Nous observons que dans ces conditions, les gouttes restent stables dans le milieu cellulaire et en absence de tensioactifs. Cependant, on observe parfois la formation de quelques agrégats de gouttes dus à la force ionique élevée du milieu ($I \sim 150 \text{ mM}$). En effet, dans une solution physiologique (contenant $0,15 \text{ M}$ de cations monovalents et $0,15 \text{ M}$ d'anions monovalents), la double couche électrique existant à la surface des gouttes est comprimée par les sels ajoutés dans le milieu. Il n'y a plus de répulsion électrique et les gouttes peuvent venir en contact les unes avec les autres en créant des agrégats.

D'un point de vue strictement expérimental, et en tenant compte des remarques ci-dessus, la manipulation des gouttes fonctionnalisées n'est pas différente de celle de microparticules de polymères commerciales.

IV. Fonctionnalisation de la surface

Pour permettre des études de phagocytose spécifique, il faut obtenir des objets qui présentent un groupement que les macrophages sont capables d'identifier. Les gouttes d'émulsions présentent à leurs surfaces des biotines sur lesquelles peuvent interagir des immunoglobulines IgGs anti-biotines de manière spontanée. La constante de dissociation du complexe biotine/IgGs anti-biotines en solution est élevée, de l'ordre de $10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ (Jung et al., 2008) ce qui permet une fonctionnalisation efficace. L'étape de fonctionnalisation consiste donc à incuber les gouttes d'émulsions biotinylées dans une solution d'IgGs d'une concentration donnée.

Avant la fonctionnalisation, l'émulsion biotinylée est lavée trois fois avec un tampon phosphate/Tween20 0,2%_{m/m} pour remplacer une partie du tensioactif utilisé lors de l'obtention des gouttes par du Tween 20. Les protocoles de fonctionnalisation sont détaillés dans les **Annexes**.

IV.1. Estimation de la quantité de biotine à l'interface des gouttes

Nous disposons de quatre lots d'émulsions préalablement biotinylées à des concentrations de phospholipides dans l'huile de 0.015, 0.03, 0.05 et 0.15 mg.mL⁻¹. Connaissant la fraction volumique en huile Φ , le rayon moyen des gouttes r , et si nous faisons l'hypothèse que tous les lipides biotinylés amphiphiles sont à l'interface des gouttes, nous pouvons estimer l'aire occupée par le lipide pour une concentration donnée en DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotine.

En effet, pour un volume total d'émulsion V , le volume en huile est égal à :

$$V_H = \Phi V$$

Pour des gouttes de rayon moyen r , le volume d'une goutte vaut :

$$v = \frac{4}{3}\pi r^3$$

Le nombre de gouttes dans un volume V donné est donc égal à :

$$N = \frac{3\Phi V}{4\pi r^3}$$

La surface totale disponible pour ces N gouttes est égale à :

$$S = N \cdot 4\pi r^2 = \frac{3\Phi V}{r}$$

Pour une concentration C [mg.mL⁻¹] de lipides dans l'huile, la nombre total de lipides présents dans un volume d'huile donné ΦV est égal à :

$$N_L = N_A \frac{C\Phi V}{M}$$

avec N_A le nombre d'Avogadro et M [g.mol⁻¹] la masse molaire du lipide.

L'aire disponible par lipide en fonction du diamètre moyen $d = 2r$ est donc égale à :

$$a_{Biotine} = \frac{S}{N_L} = \frac{6M}{CN_A d}$$

Les applications numériques pour nos concentrations utilisées sont données dans la **Table 3.2**. On voit que l'aire disponible varie sur un ordre de grandeur, entre environ 30 et 300 nm² par PEG-biotine. En se basant sur le travail de d'Efremova *et al.* (Efremova et al., 2000) qui ont mesuré les dimensions latérales et l'extension de chaînes de PEG₂₀₀₀ incorporées dans des bicouches lipidiques, les espaceurs sont toujours dans une configuration de type *mushroom*, quelle que soit la concentration dans l'huile

considérée. Dans ces conditions, l'extension des chaînes PEG est d'environ 4 nm (Efremova et al., 2000).

Concentration initiale en biotine (mg.mL ⁻¹)	0,015	0,03	0,05	0,15
Densités surfaciques en biotine (nm ² /biotine)	270	135	84	27

Table 3.2. Correspondance des concentrations en biotine (mg.mL⁻¹) avec les densités surfaciques (nm²/biotine) pour des gouttes de 7 µm de diamètre.

L'opsonisation des gouttes s'effectue par l'attachement spécifique d'IgGs anti-biotines fluorescentes aux biotines présentes à l'interface. Les lots d'émulsions ci-dessus ont donc été incubés dans des solutions d'IgGs de concentrations croissantes allant de 0.003 à 0.3 mg.mL⁻¹ ce qui correspond à 2.10^{-8} à 2.10^{-6} mol.L⁻¹ (les IgGs ayant une masse molaire de 150 kDa). Dans les paragraphes suivants, nous allons donner les résultats de la caractérisation des émulsions vis-à-vis de la fonctionnalisation par les IgGs.

IV.2. Visualisation de la présence d'IgGs par microscopie de fluorescence

Afin d'apprécier rapidement la qualité de la fixation des IgGs sur nos gouttes, on prélève quelques microlitres de l'émulsion finale qu'on place dans un système lame-lamelle et observe au microscope à fluorescence. Les IgGs anti-biotines portent des fluorophores Alexa 488 qui permettent cette observation. Afin de démontrer que cette fluorescence est bien due aux anticorps, nous avons observé des gouttes biotinylées (non fonctionnalisées) au microscope et vérifié qu'elles n'étaient pas fluorescentes en absence des IgGs.

Le profil de l'intensité de fluorescence d'une goutte est donné sur la **Figure 3.15**. On est en présence d'une couronne fluorescente en surface des gouttes donnant une intensité plus forte sur les bords démontrant ainsi que les IgGs anti-biotines sont bien en surface.

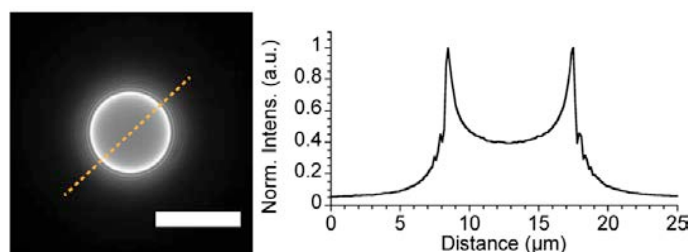


Figure 3.15. Image d'une goutte fonctionnalisée par des IgGs fluorescents en microscopie de fluorescence et son profil d'intensité. Barre d'échelle : 10 µm.

Une fois que les IgGs se trouvent à la surface de la goutte, celle-ci ne perd pas de sa fluorescence pendant plusieurs heures, indiquant la stabilité de cette fonctionnalisation. On peut donc les utiliser tout

au long des expériences sans que la densité à la surface ne soit modifiée.

On peut donc simplement par microscopie à fluorescence observer que la fonctionnalisation a été efficace. Cependant cette technique reste qualitative et il nous faut déterminer de façon quantitative l'étendue de la fonctionnalisation pour étudier l'impact de la densité d'IgGs de surface sur la phagocytose.

IV.3. Estimation du temps caractéristique d'attachement des IgGs fluorescents

Dans un premier temps, nous avons évalué le temps caractéristique nécessaire à l'attachement des IgGs anti-biotines à la surface des gouttes. Pour une concentration intermédiaire de 0.03 mg.mL^{-1} en IgGs, nous avons mesuré la fluorescence des gouttes (0.03 mg.mL^{-1} de DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotine) en fonction du temps. La courbe de cinétique a été réalisée en prélevant toutes les 5 minutes quelques microlitres de la solution et en mesurant l'intensité de fluorescence des gouttes avec un cytomètre. La **Figure 3.16** montre que la vitesse de fixation ralentit fortement au delà d'une trentaine de minutes, ce temps ayant été choisi comme paramètre pour toutes les expériences ultérieures. Les paramètres expérimentaux sont détaillés dans les **Annexes**.

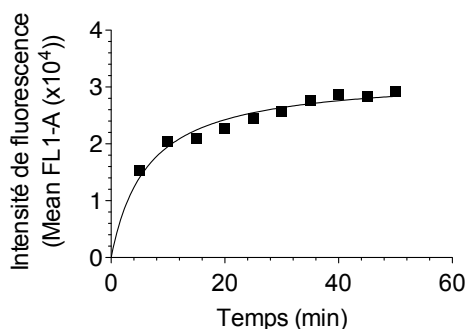


Figure 3.16. Evolution de l'intensité de fluorescence des gouttes en fonction du temps d'incubation pour des émulsions à 0.03 mg.mL^{-1} de DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotine et incubées dans une solution de 0.03 mg.mL^{-1} d'IgGs.

V. Caractérisation des gouttes fonctionnalisées

Dans le paragraphe suivant nous allons décrire le travail fourni pour exploiter différentes techniques de caractérisation pour déterminer les tailles, charges et densités de surfaces des gouttes d'émulsions fabriquées. Des techniques qualitatives et quantitatives ont été utilisées pour observer la présence d'IgGs en surface des gouttes. En parallèle d'autres paramètres physico-chimiques des gouttes ont été évalués, la charge de surface et la tension de surface, ce qui donne des informations nécessaires à la compréhension des comportements observés dans des milieux biologiques.

V.1. Méthode de détermination de la taille et de la concentration des gouttes

La mesure de la densité volumique exacte des gouttes et leur distribution de taille de manière précise est nécessaire pour permettre de fixer un ratio nombre de gouttes/nombre de cellules reproductible. À

cet effet nous avons développé une méthode de mesure sous microscope à partir de lames de comptage de cellules commerciales et nous avons comparé aux résultats obtenus par cytométrie de flux.

Pour une suspension de gouttes dont la fraction en huile est connue, on introduit un volume de 7 μL dans une des cupules d'une plaque FastRead102, utilisée pour le comptage des cellules en biologie. Connaissant l'épaisseur de la cupule et la taille du champ d'observation, on peut en déduire le nombre de gouttes par unité de volume en comptant les objets grâce à une routine informatique.

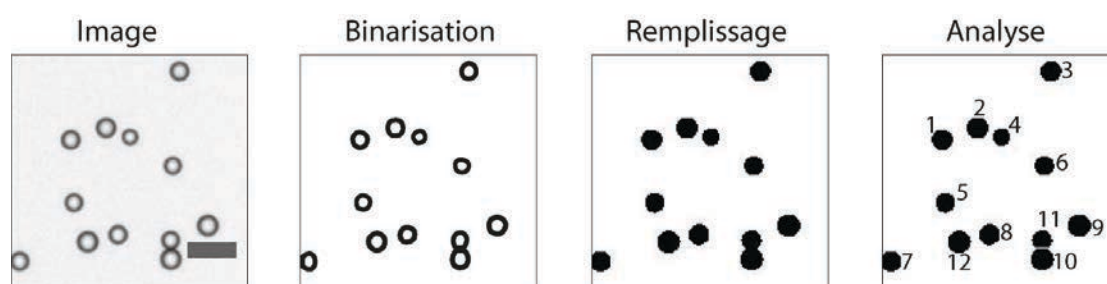


Figure 3.17. Image en microscopie en transmission de gouttes d'émulsions qui a été modifiée avec le logiciel Image J. Les gouttes étant très contrastées il est aisé de les seuiller et de les binariser avant de mesurer leur nombre et leurs tailles. Échelle : 10 μm .

Concrètement, on réalise plusieurs images en microscopie en transmission avec un objectif de faible grossissement (10X). Ces images sont alors traitées individuellement de manière à calculer la densité moyenne de gouttes par unité de volume. *FIJI (Fiji is not ImageJ)* est un logiciel de traitement d'images. Il peut être utilisé pour compter et analyser la répartition de tailles des gouttes fonctionnalisées, ainsi que les cellules, en le complétant par des macros et des extensions.

Étape de la mesure	Densité (goutte. μL^{-1})
Avant Lavages	$5 \cdot 10^5$
Après Lavages	$4,5 \cdot 10^5$

Table 3.3. Tableau de mesure du nombre de gouttes mesuré par le logiciel de traitement d'images Image J.

Le programme que nous avons mis au point, détaillé en **Annexes**, comporte plusieurs étapes qui consistent (i) à transformer les images obtenues en images bitonales à 1 bit (2^1) après seuillage et remplissage de manière à obtenir des particules entièrement noires ; (ii) à séparer les agrégats de particules et (iii) enfin analyser les différents paramètres dont nous avons besoin comme le nombre et la taille des gouttes ou des cellules, la circularité et la densité de particules (cf. **Figure 3.17**). Les résultats de mesure d'une émulsion dont la fraction massique est de 5% avant et après lavages sont représentés dans la **Table 3.3** ci-dessus.

Pour une émulsion dont la fraction massique est de 5% nous obtenons une concentration de $5 \cdot 10^5$ goutte. μL^{-1} . Il est important de connaître cette densité afin d'ajuster le nombre de gouttes exposées au

cellules lors des expériences de phagocytose, la dose étant un paramètre important dans ces études.

V.2. Quantification de la densité d'IgGs de surface par cytométrie de flux

La cytométrie de flux est une méthode largement utilisée dans la recherche biologique et médicale. C'est une technique de caractérisation précise et rigoureuse de particules isolées individuellement et en suspension dans un liquide. Elle se base sur des marqueurs fluorescents spécifiques qui ont une affinité particulière pour un constituant cellulaire ou couplés à un ligand propre tel qu'un anticorps. Ces marqueurs permettent ainsi d'apporter des informations caractéristiques des cellules analysées comme par exemple, la taille, la forme et l'intensité de fluorescence. Les cytomètres de flux modernes sont capables d'analyser plusieurs milliers d'événements par seconde et les trier selon des critères de diffusion ou de fluorescence avec des taux de pureté supérieurs à 90% (Shapiro, 2005). En analyse médicale, la haute précision et large utilisation de la cytométrie en routine ont permis de décrire de nouveaux sous-types cellulaires et de mesurer l'état d'activation, de maturation et de prolifération des cellules (Hartmann et al., 1999).

Représentant une méthode utile pour l'analyse des propriétés cellulaires, la cytométrie de flux a également été utilisée pour l'analyse d'autres particules telles que des billes et des liposomes (Fuller and Sweedler, 1996) ou encore pour caractériser le contenu fluorescent des émulsions doubles (w/o/w) où des réactions biochimiques ont été réalisées (Hai et al., 2004).

Plus récemment la cytométrie de flux a permis de caractériser des gouttes d'émulsions d'huile dans l'eau (Fattaccioli et al., 2009). Elle permet d'avoir accès à la densité de protéines à la surface par mesure de la fluorescence. La taille de chaque goutte de l'échantillon peut être évaluée en appliquant la théorie de Mie au montage optique du cytomètre et en exploitant numériquement les signaux de diffusion vers l'avant et le coté de chaque goutte passant devant le détecteur.

En se basant sur cette dernière technique d'utilisation, nous allons décrire comment nous avons utilisé le cytomètre de flux pour caractériser la densité de nos gouttes et le nombre de protéines à leur surface.

V.2.1. Généralités sur la cytométrie de flux

Pour pouvoir être analysées les particules doivent être mises en suspension à une concentration volumique en objets tels que l'on ait une fréquence d'acquisition compatible avec les spécifications de l'appareil. Elles doivent être confinées dans la zone centrale de la chambre, alignées les unes après les autres et excitées une à une avec le faisceau lumineux. C'est à l'aide d'un système de centrage hydrodynamique que l'échantillon est dilué en faisant intervenir un fluide dit de gaine qui subit une

accélération progressive et entraîne l'étirement du liquide et l'alignement des particules au centre du jet.

L'illumination des particules se fait alors par un ou plusieurs lasers à différentes longueurs d'onde qui vont illuminer les objets un à un et les fluorochromes qu'ils portent (cf. **Figure 3.16**). Les particules diffusent la lumière dans toutes les directions de l'espace et les différents signaux émis sont sélectionnés par des circuits optiques composés d'une alternance de miroirs et de filtres, et sont acheminés vers des systèmes de détection, les photodiodes.

L'intensité de la diffusion dans l'axe du rayon incident (paramètre FSC : diffusion aux petits angles) est corrélée à la taille et à la surface des particules analysées et celle diffusée sous un angle de 90° (paramètre SSC : diffusion aux grands angles) est proportionnelle au contenu et à la structure intracellulaire.

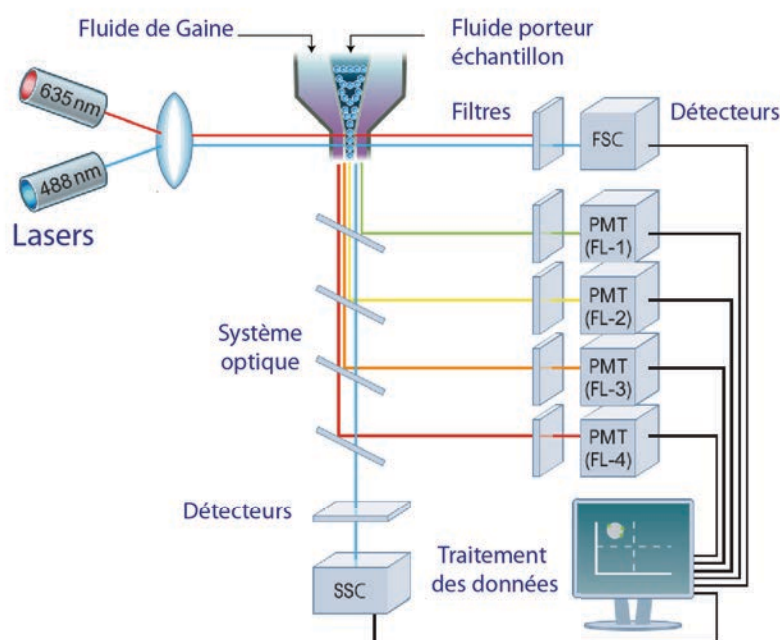


Figure 3.18. Schéma du système de focalisation hydrodynamique d'un cytomètre de flux couplé au système optique d'illumination et de mesure des deux paramètres de diffusion *FSC* et *SSC* ainsi que les signaux de fluorescence. Image adaptée de (Rahman, 2006).

Les deux paramètres de diffusion, vers l'avant (*FSC*) et sur le côté (*SSC*) permettent d'avoir une information liée à la forme et à la taille des objets analysés.

Les signaux de fluorescence peuvent être émis par la cellule elle-même mais le plus souvent sont apportés à la cellule par un fluorochrome. Les molécules fluorescentes sont caractérisées par leur spectre d'excitation et d'émission et ont la capacité de se fixer de façon spécifique à certains constituants cellulaires comme l'ADN/ARN, exemple Hoechst (365 nm). Leur spectre d'émission peut

être sensible à l'environnement comme la variation du pH ou la concentration en Ca^{2+} . Enfin les fluorochromes peuvent être couplés avec des ligands spécifiques comme des anticorps qui vont cibler une molécule de surface ou dans un compartiment cellulaire (Shapiro, 2005).

Les signaux optiques sont convertis en signaux électriques et sont enregistrés par un logiciel spécifique. Les résultats obtenus peuvent être représentés de plusieurs manières soit selon des histogrammes de fréquence d'événements ou alors des diagrammes de points à plusieurs paramètres. Dans la représentation bi-paramétrique de la **Figure 3.19a** par exemple, chaque point représente une particule analysée. On arrive à séparer les différentes populations de cellules analysées qui apparaissent comme des nuages de points bien distincts en traçant des contours qu'on appelle *Gating*. L'intensité de fluorescence reflète la quantité de fluorophores portée par chaque objet passant devant le détecteur.

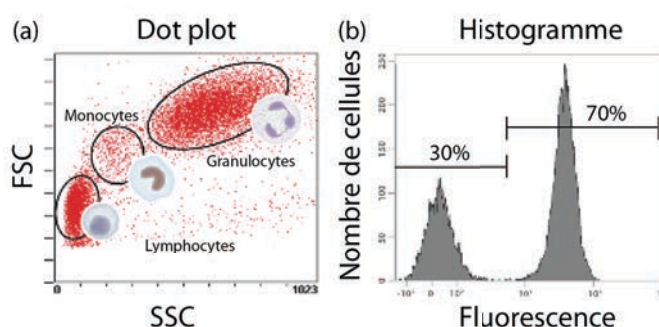


Figure 3.19. (a) Représentation bi-paramétrique de l'intensité de diffusion vers l'avant FSC en fonction de celle vers le côté SSC. Les populations de cellules apparaissent comme des nuages de points homogènes où chaque point représente une cellule. (b) Histogramme de diffusion sur le côté où on peut isoler deux populations d'intensités de fluorescence différentes. Images adaptées de (Rahman, 2006).

Pour des cellules l'interprétation des signaux de diffusion consiste à associer la diffusion vers l'avant (FSC) à la taille des cellules et la diffusion sur le côté (SSC) à une grandeur appelée *granulosité* qui informe sur leur structure cellulaire.

V.2.2. Caractérisation des émulsions par cytométrie de flux

Contrairement à des cellules qui ont un indice optique proche de celui du milieu tamponné dans lequel on les suspend, les huiles végétales ont un indice de refraction de l'ordre de 1,48 qui modifie l'interprétation des signaux de diffusion. Partant de la théorie de Mie et de la description analytique de la diffusion quasi-inélastique de sphère homogènes, Fattaccioli *et al.* (Fattaccioli et al., 2009) ont calculé numériquement les paramètres FSC et SSC d'une population polydispense d'émulsion ; mesurés par ailleurs sur un cytomètre BD FacsCalibur. Comme nous pouvons le voir sur la **Figure 3.20a**, le paramètre FSC oscille en fonction de la taille, mais le paramètre SSC est monotone croissant.

Dans le cas des gouttes, l'interprétation des signaux est donc l'inverse de celle qui serait faite pour des cellules. La **Figure 3.20a** montre la superposition d'une courbe expérimentale et de la courbe théorique correspondant à l'appareil de mesure. La superposition permet d'associer les valeurs de diffusion de chaque particule à une taille définie. Le cytomètre mesurant pour chaque objet sa fluorescence en plus des signaux de diffusion, il est donc possible de tracer la courbe de fluorescence en fonction de la taille des gouttes très simplement.

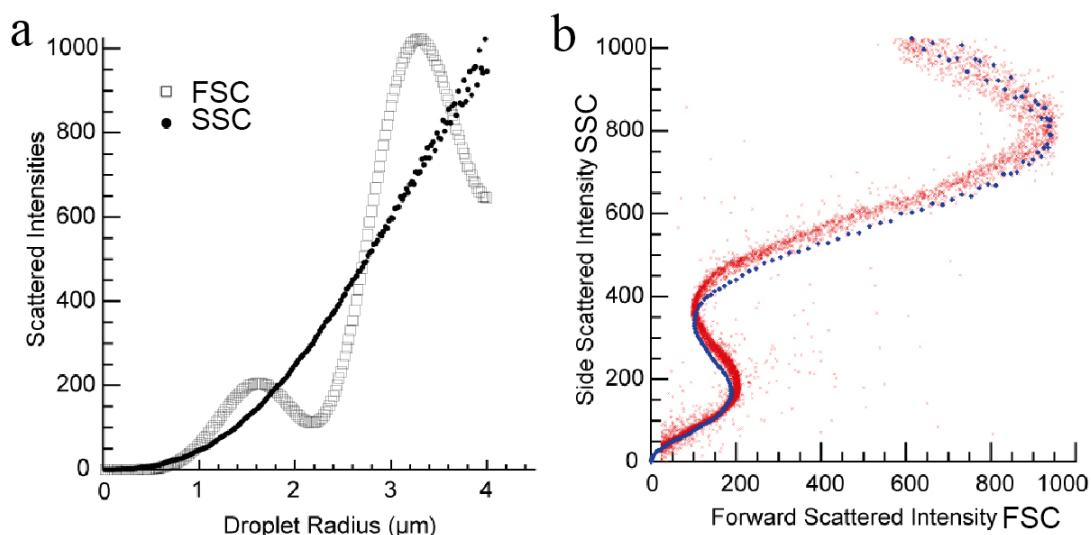


Figure 3.20. (a) Evolution des intensités de diffusion FSC et SSC, calculées numériquement, en fonction de taille des gouttes d'huile. FSC montre des oscillations alors que le paramètre SSC est monotone croissant. (b) Superposition du diagramme de diffusion $SSC=f(FSC)$ calculé numériquement (bleu) avec une courbe expérimentale enregistrée pour une émulsion d'huile de soja polydispense (rouge) avec un cytomètre de type B Facscalibur.

Dans nos expériences, les mesures ont été réalisées avec un cytomètre de type BD Accuri C6 dont la construction optique est différente de celle du cytomètre utilisé pour le développement de la méthode, mais le principe reste le même. Comme nous travaillons avec des émulsions monodisperses dont la distribution de taille est mesurée avec un microscope (cf. **Figure 3.21a**), nous pouvons uniquement utiliser le caractère monotone du paramètre SSC en fonction de la taille des gouttes pour nos analyses. Le diagramme de diffusion de nos émulsions est représenté dans **Figure 3.21b** ci-dessous et correspondent à des courbes en S formées par un nuage de points continu. Chaque point correspond à une taille de goutte bien déterminée. La taille moyenne déterminée par microscopie est de l'ordre de 7 μm pour une polydispersité de 15%. La distribution de taille en SSC possède la même allure que celle obtenue en microscopie optique

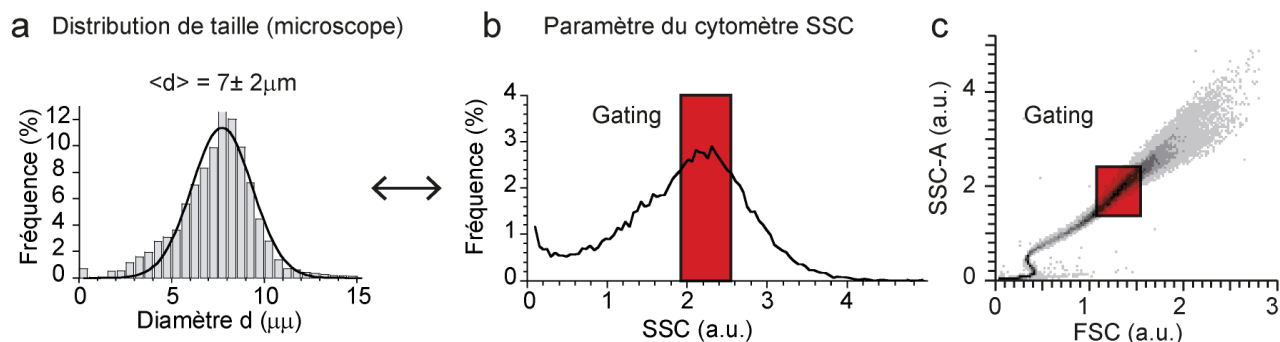


Figure 3.21. (a) Distribution de taille des gouttes obtenue en microscopie. (b) Intensités de diffusion sur le côté (SSC) de notre émulsion monodisperse mesurées avec le cytomètre de flux. La diffusion latérale dans notre cas correspond à la taille de nos gouttes et possède la même allure que la distribution de taille mesurée avec le microscope. (c) En rouge, la fenêtre de *gating* correspondant aux gouttes ayant un SSC proche du maximum de la distribution de taille

En se servant de la fonction *Gating* du cytomètre, nous pouvons délimiter la zone correspondante à la population de gouttes qui nous intéresse (de 7 μm de diamètre) et qui représente la majorité de la population que nous allons étudier par la suite. Les statistiques sur les gouttes des *Gatings* faits en SSC ou en FSC sont identiques.

Les gouttes que nous avons formulées sont fonctionnalisées en surface par des IgGs anti-biotines Alexa 488 dont les spectres d'excitation et d'émission sont compatibles avec la longueur d'onde du laser du cytomètre (cf. **Figure 3.7**). L'histogramme de fluorescence que nous obtenons suite à la fonctionnalisation des gouttes avec des IgGs fluorescents est représenté dans la **Figure 3.22**.

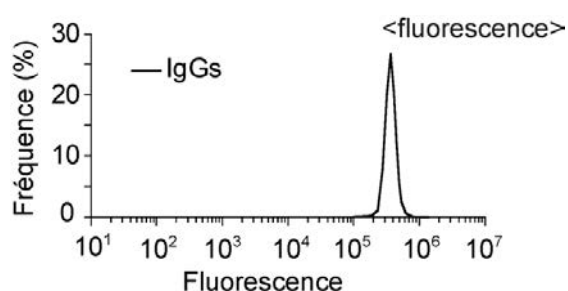


Figure 3.22. Histogramme de fluorescence des gouttes fonctionnalisées correspondant à la zone délimitée par le *Gating* dans la **Figure 3.21b** et dont la taille correspond au diamètre moyen de la population de gouttes.

Cet histogramme traduit la quantité de fluorophores présents en surface des gouttes. C'est à partir de ces histogrammes de fluorescence que nous allons ensuite déterminer la quantité de protéines fixées à la surface de nos objets.

V.2.3. Méthode de détermination de la densité d'IgGs en surface des gouttes à partir de la fluorescence mesurée

Lors de la fonctionnalisation des gouttes, on fixe une certaine concentration d'IgGs anti-biotines fluorescents en solution. Il nous a été possible, à partir de la fluorescence de chaque goutte mesurée par

le cytomètre, de remonter à une densité de protéines à la surface.

Par définition la densité de protéines est le rapport du nombre " N " de protéines, ici les immunoglobulines IgGs anti-biotines, sur la surface " S " de la goutte :

$$\Gamma = \frac{N}{S}$$

Pour cela nous avons, tout d'abord, étalonné le signal de fluorescence en utilisant des billes de quantification commerciales fournies par les constructeurs de cytomètres avec des concentrations calibrées en fluorophores (Ici, Alexa 488 et FITC). Nous avons utilisé les kits QuantumTM FITC-5 MESF (Premix) et QuantumTM Alexa Fluor[®] 488 MESF distribué par Bangs Laboratories, Inc.

Une fois passé au cytomètre le lot de billes de calibration nous donne un histogramme de fluorescence représenté dans la **Figure 3.23** ci-dessous. On obtient un histogramme de fluorescence avec les cinq distributions de fluorescence distinctes relatives à des concentrations en fluorophores différentes et calibrées. Le fabricant fournit une fiche descriptive qui donne la quantité de fluorophores correspondant à chaque pic et le signal de fluorescence est mesuré à l'aide du cytomètre.

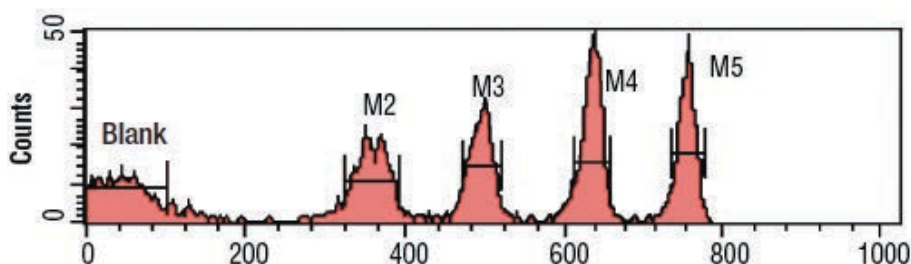


Figure 3.23. Histogramme de fluorescence des billes de calibration à différentes concentrations en fluorophores. Chaque pic correspond à une concentration donnée en fluorophores.

On peut donc tracer la courbe du nombre de fluorophores (FITC ou Alexa 488) en fonction de l'intensité du signal de fluorescence (cf. **Figure 3.24**). Il s'agit de la courbe d'étalonnage qui va nous permettre de déterminer le nombre de fluorophores pour chaque goutte d'émulsion. Ce nombre est converti en nombre d'IgGs par goutte en le divisant par le nombre de fluorophores portés par chaque protéine. Le ratio de nombre de fluorophores/protéine est donné par le fournisseur d'anticorps pour chaque lot commercialisé.

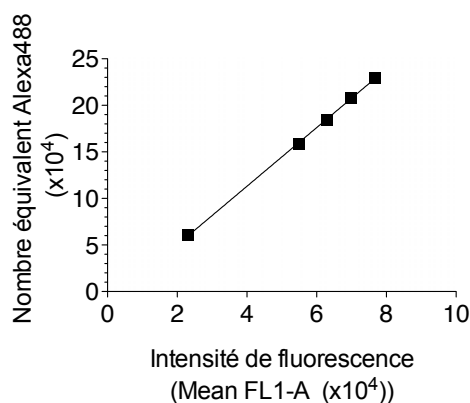


Figure 3.24. Droite d'étalonnage du nombre de fluorophores Alexa 488 portés par les IgGs en fonction de l'intensité de fluorescence mesurée en cytométrie.

Nos gouttes sont fonctionnalisées par des IgGs anti-biotines portant un nombre d'Alexa 488 compris entre 4 et 8 unités. Ce nombre de fluorophores n'est pas fixe et dépend du lot d'IgGs utilisé. Dans la plupart des lots, le nombre d'Alexa 488 est de 5 unités par protéine. C'est donc ce nombre que nous avons utilisé pour toutes les expériences.

Cette méthode permet donc de mesurer de façon quantitative le nombre d'IgGs présents en surface des gouttes, dans une gamme allant de 10^2 à 10^6 , gamme limitée par le protocole de fonctionnalisation et non par les limites de détection de cette technique. Ces caractérisations quantitatives peuvent s'appliquer à d'autres objets fonctionnalisés avec une entité fluorescente et permet d'avoir des études plus fines sur l'influence de la densité de fonctionnalisation.

V.3. Spécificité de l'adsorption des IgGs à la surface des gouttes

La réalisation de courbes de titrations oblige à s'intéresser au caractère spécifique de l'attachement des IgGs, notamment pour connaître la valeur du bruit de fond de signal, conséquence de leur éventuelle adsorption directe sur la surface.

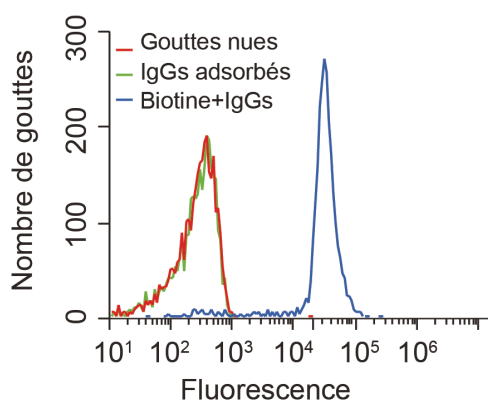


Figure 3.25. Profil d'intensité de fluorescence de gouttes nues (sans biotine), gouttes nues incubées dans une solution d'IgGs à 0.03 mg.mL^{-1} et gouttes biotinylées incubées avec la même concentration d'IgGs.

À l'aide du cytomètre, nous avons mesuré la fluorescence des gouttes non biotinylées, c'est-à-dire sans l'incorporation des phospholipides dans la phase huile avant de procéder à son émulsification. Nous avons aussi mesuré la fluorescence de ces mêmes gouttes (non biotinylées) incubées avec des IgGs en suivant le même protocole que pour les gouttes biotinylées.

Les deux courbes correspondant aux profils d'intensité que nous obtenons (cf. **Figure 3.25**) en rouge et en vert) se recouvrent complètement démontrant qu'il n'y a aucune adsorption non spécifique des IgGs en absence de biotines à la surface des gouttes. En comparant ces résultats avec ceux obtenus après incubation des gouttes biotinylées avec une solution d'IgGs (courbe en bleu), on observe une fluorescence 2 à 3 ordres de grandeurs plus intense. On démontre ainsi que la fonctionnalisation de la surface est spécifique et n'a lieu qu'en présence de biotine à la surface de la goutte.

V.4. Contrôle de la densité de fonctionnalisation

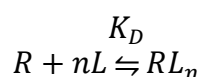
Nous disposons de quatre lots d'émulsions à quatre concentrations initiales différentes en biotine dans l'huile. Pour chaque émulsion nous avons fait varier la concentration en IgGs et nous avons mesuré la fluorescence obtenue avec le cytomètre. Comme on l'avait décrit précédemment, chaque intensité de fluorescence est convertie en un nombre de molécules d'IgGs à la surface d'une goutte.

Les courbes obtenues sont des isothermes d'opsonisation normalisées par rapport à leurs valeurs de saturation (cf. **Figure 3.26**). Les courbes brutes ayant des valeurs en ordonnées différentes, leur normalisation est nécessaire pour pouvoir les comparer. Elles sont décrites par la loi de Hill à 3 paramètres. Cette loi décrit le cas particulier de la fixation d'un même ligand sur plusieurs sites d'une protéine, ce qui est justement notre cas. Elle est donnée par la loi suivante :

$$\theta = \frac{[L]^n}{K_D + [L]^n}$$

où θ représente la fraction des sites comportant un ligand lié, $[L]$ est la concentration du ligand et K_D est la constante de dissociation apparente. La constante n s'appelle la constante de Hill et décrit classiquement le degré de coopérativité de la fixation du ligand. Cette coopérativité désigne la propriété qu'ont les protéines possédant un ou plusieurs sites de fixation leur permettant de se lier à un substrat ou des ligands. La constante de Hill n augmente avec le degré de coopérativité. La liaison d'un ligand est dite à coopérativité négative quand $n < 1$ et indique que cette liaison diminue l'affinité de la protéine pour des liaisons ultérieures. Inversement si $n > 1$ la liaison au ligand est dite à coopérativité positive et indique que la liaison augmente l'affinité de la protéine pour des liaisons ultérieures du ligand.

L'équation de la réaction se traduit par l'expression suivante :



La constante de dissociation de cette réaction est donc:

$$K_D = \frac{[R][L]^n}{[RL_n]}$$

Le nombre de protéines adsorbées par rapport au nombre total de sites occupés est alors égal à :

$$\frac{Bound}{Total} = \frac{[RL_n]}{[L] + [RL_n]} = \frac{[L]^n}{K_D + [L]^n}$$

En combinant les deux dernières expressions nous obtenons un équation réduite :

$$\frac{Bound}{Total} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[L]}{K_D}\right)^n}$$

Dans notre cas, les ligands L correspondent aux immunoglobulines avec chacune 2 sites de fixation à la biotine et les récepteurs R correspondent à la surface des gouttes avec leurs groupements biotine :

D'après ce qui précède, on peut écrire :

$$IgGs \text{ par goutte} = \frac{(IgGs \text{ par goutte})_{Max}}{1 + \left(\frac{[IgG_{bulk}]}{K_D}\right)^n}$$

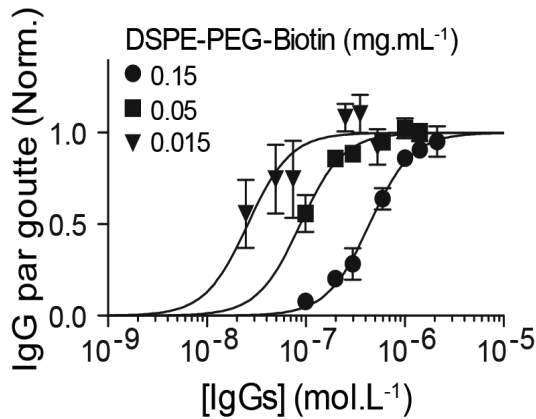


Figure 3.26. Isothermes d'opsonisation normalisées par rapport à leurs valeurs de saturation pour trois concentrations initiales en biotine. Les courbes sigmoïdales sont décrites par la loi de Hill à 3 paramètres.

La valeur de K_D correspond à la concentration en immunoglobulines nécessaire pour arriver à 50% de la saturation accessible des interfaces. La **Figure 3.26** montre que les courbes de titration en fonction de la concentration en IgGs sont correctement modélisées avec une constante de Hill égale à $n = 2$ pour les trois conditions.

DSPE-PEO ₂₀₀₀ -biotin (mg.mL ⁻¹)	0.015	0.03	0.05	0.15
(IgGs par goutte) _{Max}	$6.8 \pm 0.4 \cdot 10^3$	$5.9 \pm 0.2 \cdot 10^4$	$3.5 \pm 0.05 \cdot 10^5$	$5.5 \pm 0.1 \cdot 10^5$
K_D (mol.L ⁻¹)	$2.6 \pm 0.2 \cdot 10^{-8}$	$3.9 \pm 0.5 \cdot 10^{-8}$	$8.8 \pm 0.5 \cdot 10^{-8}$	$4.4 \pm 0.2 \cdot 10^{-7}$

Table 3.4. Table de correspondance entre les conditions initiales de DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotine dans l'huile et les paramètres de Hill pour les isothermes d'adsorption des immunoglobulines à la surface des gouttes.

Ce paramètre a été fixé en prenant en considération le fait que les IgGs anti-biotines possèdent deux

sites de fixation à la biotine et en faisant l'hypothèse que la fixation d'une seconde biotine sur une immunoglobuline s'effectue très rapidement. (Weiss, 1997).

Les valeurs de saturation en immunoglobulines et celles de K_D sont reportées dans le tableau **Table 3.5** ci-dessus. On voit que le nombre d'IgGs par goutte varie sur deux ordres de grandeur, entre $7 \cdot 10^3$ et $5 \cdot 10^5$.

À partir de la taille moyenne d des gouttes, nous pouvons estimer l'aire par immunoglobuline à la saturation de chaque courbe. En effet on a :

$$a_{IgG} = \frac{\pi d^2}{(\text{IgGs par goutte})_{\text{Max}}}$$

Nous avons tracé sur la figure **Figure 3.27** ci-dessous l'aire a_{IgG} en fonction de la surface occupée par une molécule de biotine $a_{Biotine}$ calculée plus haut, pour quatre concentrations en lipides biotinylés (cf. **Table 3.4**). On voit que notre protocole de fonctionnalisation nous permet de faire varier l'aire par IgG sur deux ordres de grandeurs, entre 10^4 nm^2 par IgG, jusqu'à $10^2 \text{ nm}^2/\text{IgG}$.

La première valeur correspond à une densité un peu plus faible que la valeur physiologique de densité des récepteurs $\text{Fc}\gamma\text{R}$ présents sur la membrane de macrophages (Gandour and Walker, 1983). La seconde valeur est proche de la valeur d'une monocouche compacte d'IgGs à la surface si on considère qu'un IgG occupe une surface de 120 nm^2 (Werner et al., 1972).

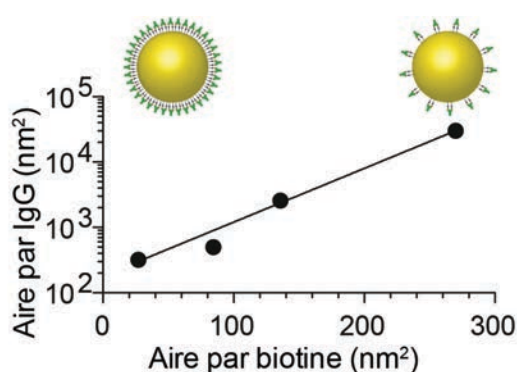


Figure 3.27. Variation de la surface occupée par une molécule d'IgG en fonction de l'aire occupée par une biotine en surface des gouttes.

On remarque sur la figure ci-dessus que l'aire par IgG varie de manière exponentielle en fonction de l'aire par biotine. Pour des faibles densités en biotine, la valeur de saturation correspond à un IgG pour 100 biotines alors que pour les hautes densités en biotine, on compte à peu près un IgG pour une dizaine de biotines. Le procédé de fonctionnalisation par les IgGs est donc d'autant plus efficace que la densité de biotines présentes à l'interface est grande, ce qui pourrait s'expliquer par une meilleure disponibilité des biotines causée par un changement de conformation des chaînes de PEG.

Nous avons donc conçu des gouttes d'émulsions fonctionnalisées avec des densités bien contrôlées d'IgGs à leur surface. Ces densités sont mesurées de façon quantitative, mesure nécessaire à la

compréhension du processus biologique de phagocytose en fonction de la quantité d'IgGs qui nous intéresse.

V.5. Diffusion latérale des IgGs à la surface des gouttes

Plusieurs études récentes se sont intéressées à la mesure du coefficient de diffusion latérale de protéines portées par des lipides à l'interface liquide/liquide d'une émulsion. Ces mesures, réalisées en microscopie de type FCS ou FRAP, aboutissent à des coefficients de diffusion compris entre 1 et 5 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ (Bourouina et al., 2011; Emerard, 2010).

V.6. Mesure de la tension interfaciale des gouttes

Comme nous l'avons vu dans la première partie, les émulsions sont caractérisées par une tension interfaciale σ qui informe notamment sur la déformabilité des gouttes. Il existe plusieurs méthodes de mesure de la tension superficielle (Gast and Adamson, 1997). Dans notre cas, nous avons utilisé la technique classique de la goutte pendante.

Cette méthode est basée sur la forme d'une goutte à l'équilibre. Lorsque les effets gravitationnels (dépendants du volume de la goutte) et les effets de la tension superficielle de la goutte maintenue à l'extrémité d'une pipette verticale sont à l'équilibre, on peut déterminer à travers la forme de la goutte obtenue la tension superficielle (cf. **Figure 3.28**). La tension superficielle s'écrit donc:

$$\sigma = \frac{\rho g V_{max}}{2\pi R}$$

où ρ désigne la densité du liquide en g.cm^{-3} , $g = 9.8 \text{ m.s}^{-2}$ l'accélération de la pesanteur, V_{max} le volume maximal de la goutte, R le rayon extérieur du tube. En pratique, nous analysons la forme d'une goutte de solution aqueuse plongeant dans un bain d'huile de soja. Le forme de la goutte est analysée par analyse d'image avec un tensiomètre Kruss (Drop Shape Analyzer – DSA30) présent au LCMD (ESPCI).

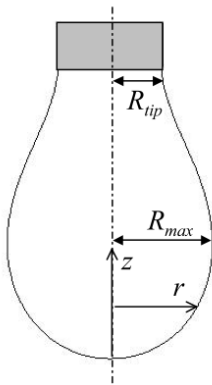


Figure 3.28. Représentation schématique d'une goutte pendante à l'extrémité d'un tube. Image adaptée de (ESPCI).

Nous avons mesuré la tension interfaciale pour deux conditions de tampon, avec un tampon phosphate

(pH = 7.1, 20 mM) et un tampon physiologique DMEM (pH = 7.4). Comme notre protocole de formulation implique deux tensioactifs, nous avons mesuré l'effet de leur présence dans la phase aqueuse.

Nous avons vu précédemment que certains des ingrédients utilisés dans notre formulation étaient sensibles au vieillissement, notamment par hydrolyse ou oxydation. Du fait de leur dispersion en gouttes et de l'augmentation de surface d'échange avec la phase continue, les cinétiques de vieillissement sont potentiellement différentes de celles qui peuvent exister dans un grand volume de ces produits. Autrement dit, la technique de la goutte pendante crée une interface qui n'est pas forcément identique à celle de l'objet tel que nous l'avons formulé.

Yeung *et al.* (Yeung et al., 2000) ont développé une méthode de mesure de tension interfaciale de gouttes d'émulsions basée sur la technique de micropipettes qui est fréquemment utilisée pour caractériser les propriétés mécaniques des membranes cellulaires et des bicouches lipidiques (Herant et al., 2005).

Couplée à un système d'aspiration, la micropipette permet d'attraper une goutte individuellement et de la soumettre à une pression dont la valeur est connue. La gouttelette est alors observée au microscope optique pour permettre une mesure précise de la valeur du rayon de la pipette mais aussi du diamètre de la goutte (cf. **Figure 3.29**).

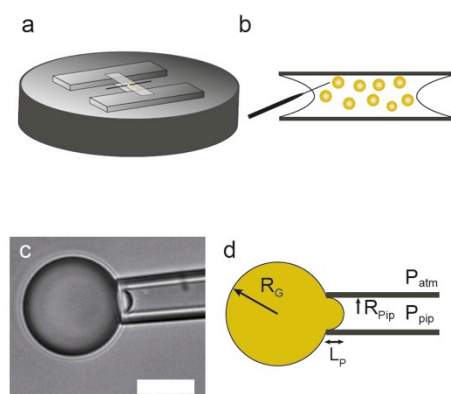


Figure 3.29. (a) et (b) La chambre d'observation est constituée de deux lamelles où des gouttes sont diluées dans du tampon PB à 0,2%_{m/m} Tween20 pour éviter l'adhésion aux parois de la pipette. (c) La goutte est soumise à une aspiration contrôlée par une différence de pression. (d) La mesure du rayon de la goutte et de celle de la pipette permet de mesurer la tension interfaciale.

La loi de Laplace établit une relation entre la différence de pression et la tension superficielle qui peut être utilisée pour analyser les expériences de micromanipulation :

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R}$$

Dans notre cas il y a deux différences de pressions, la première entre la goutte et le milieu extérieur et la deuxième entre la goutte et la pression exercée par l'aspiration dans la micropipette. Ce qui se traduit par ce qui suit :

$$P_{Goutte} - P_{atm} = \frac{2\sigma}{R_G}$$

$$P_{Goutte} - P_{pipette} = \frac{2\sigma}{R_{pip}}$$

Puisque la pression dans la goutte est homogène, on peut combiner les deux équations:

$$P_{atm} - P_{pipette} = 2\sigma \left(\frac{1}{R_{pip}} - \frac{1}{R_G} \right)$$

P_{atm} est connue et constante, $P_{pipette}$ est fixée expérimentalement, le rayon de la pipette et le rayon de la goutte sont mesurés par microscopie, et la tension superficielle des gouttes que nous avons fabriquées peut donc être déduite simplement :

$$\sigma = \frac{P_{atm} - P_{pipette}}{2 \left(\frac{1}{R_{pip}} - \frac{1}{R_G} \right)}$$

Expérimentalement, le système de pression que nous avons utilisé est basé sur le principe des réservoirs hydrostatiques communicants. Un réservoir d'eau est lié à la pipette via un tube. Ce vase est soumis à un déplacement vertical micrométrique. Une seringue est reliée au système et permet de maintenir la goutte dans la micropipette. À l'aide d'un multimètre et d'une sonde de pression, on mesure la différence de pression à l'entrée de la pipette avant et après l'aspiration de la goutte (1 mV = 5 Pa). Le zéro de pression est fait en obtenant l'immobilité d'une poussière dans le tampon utilisé. Les objets dont on veut mesurer la tension et les pipettes sont incubées préalablement à l'expérience dans du tampon PB à 0,2%_{m/m} Tween 20 pour éviter l'adhésion aux parois de la micropipette.

Méthode	Matériau	Condition	Tension interfaciale (mN m ⁻¹)
Micropipette	Emulsion formulée	PB + 0,2% _{m/m} Tween 20	10 ± 2
Goutte Pendante	Huile de soja	PB	6
		PB+1% _{m/m} Pluronic F68	6
		PB + 0,2% _{m/m} Tween 20	5,5
		DMEM	4
		DMEM 1% _{m/m} Pluronic F68	4
		DMEM + 0,2% _{m/m} Tween 20	2,5

Table 3.6. Comparaison des mesures de tensions interfaciales réalisées avec des micropipettes ou la technique de la goutte pendante. Mesures effectuées à 25°C.

Les micropipettes sont obtenues à partir de capillaires de verre dont le diamètre final est de l'ordre du

micron. Pour les préparer d'une manière reproductible et précise, il existe des étireuses qui vont chauffer le capillaire par un faisceau laser tout en exerçant une traction sur chacune des extrémités pour le séparer en deux pointes fines. Le programme utilisé fournit des pointes avec des diamètres intérieurs de l'ordre du micron ($3 - 5 \mu\text{m}$) qui correspondent parfaitement au diamètre de nos gouttes.

La **Table 3.6** présente les résultats obtenus avec les deux techniques. On remarque que les valeurs mesurées sont globalement assez faibles et sont toutes inférieures à la dizaine de mN.m^{-1} . La tension de surface huile de soja/eau est de l'ordre de la trentaine de mN.m^{-1} mais Gaonkar a montré que la présence d'impuretés naturelles comme des mono- et diglycérides pouvait faire diminuer la tension à des valeurs proches de celles que nous observons (Gaonkar, 1989).

Les tensions interfaciales mesurées dans le DMEM sont systématiquement plus faibles que celles mesurées dans le PB, ce qui peut s'expliquer par la composition complexe du milieu de culture qui contient des molécules qui ont une légère activité de surface¹ comme par exemple les acides aminés.

La présence de Pluronic F68 ou de Tween 20 dans le milieu n'affecte que très peu la tension de surface de l'huile de soja. La tension superficielle mesurée directement sur les gouttes formulées par la méthode des micropipettes est égale à $10 \pm 2 \text{ mN.m}^{-1}$. Quelle que soit la technique utilisée, nous mesurons des valeurs qui sont très proches entre elles et nous ne pouvons pas conclure sur l'influence d'un surfactant par rapport à un autre à l'interface eau/huile pour les émulsions formulées.

V.7. Mesure du potentiel zêta des gouttes

Nous avons vu dans le **Chapitre 1** que le phénomène de phagocytose est sensible à la charge de surface des particules ingérées. Il est donc important de déterminer la charge de surface des gouttes ainsi que l'éventuel effet de la fonctionnalisation de l'interface sur celle-ci.

Par définition on appelle potentiel zêta le potentiel électrique dans la double couche interfaciale entre une surface chargée, ici celle de la goutte, et la solution électrolytique. Les forces électrostatiques dues à la charge de surface attirent les espèces de charge opposée tandis que les espèces de même charge vont être repoussées. La variation progressive du potentiel exercé par la charge de surface se produit au sein de la « double couche ». Les ions fortement liés à la surface chargée forment la couche compacte ou dense dite de Stern et sont immobiles à la surface (cf. **Figure 3.30**). En dehors de ce plan, les ions forment la partie mobile donc diffuse de la double couche. Le plan de cisaillement est défini hydrodynamiquement par le plan qui sépare ces deux types de comportement du liquide vis à vis de la particule. Le potentiel au plan de cisaillement est appelé potentiel électrocinétique, plus communément

¹ La composition exacte est disponible sur le site du fabricant : <http://www.lifetechnologies.com/fr/fr/home/technical-resources/media-formulation.42.html>

appelé potentiel zêta. La mesure du potentiel zêta est réalisée par analyse du mouvement électrophorétique d'une suspension de particules, dans un appareil dédié.

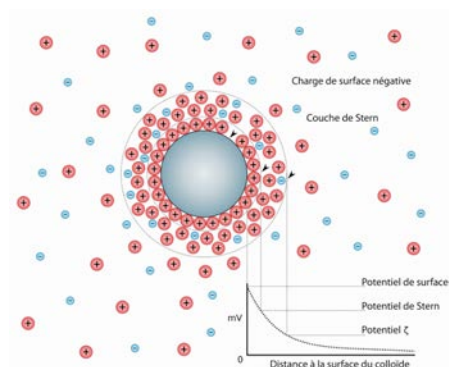


Figure 3.30. Représentation schématisée du potentiel zêta et de la double couche du nuage ionique créé par la présence d'une particule chargée négativement dans un électrolyte.

Nous avons mesuré le potentiel zêta de nos émulsions à différentes étapes de la fonctionnalisation : gouttes nues sans lipides biotinylés présents dans l'huile, gouttes biotinylées et gouttes fonctionnalisées avec des IgGs. L'appareil que nous avons utilisé pour la mesure de ce potentiel est le Nanosizer ZS zetasizer (Malvern Instruments, Malvern). L'analyse est réalisée à 25°C, dans un tampon phosphate à 0,2%_{m/m} Tween20 ayant une force ionique constante de 20 mMol et un pH égal à 7.1.

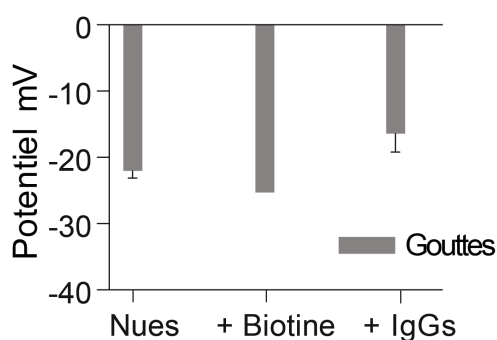


Figure 3.31. Comparaison du potentiel ζ des gouttes d'émulsions à différentes étapes de fonctionnalisation de l'interface. Chaque valeur obtenue correspond à la moyenne de trois séries de dix acquisitions.

Comme on peut le voir sur la **Figure 3.31** le potentiel zêta des différentes gouttes est négatif et ne dépend pas de la fonctionnalisation de l'interface. Ce potentiel est de l'ordre de - 20 mV, mesure qui est en accord avec les observations de la littérature pour des formulations similaires (Hsu and Nacu, 2003). Le caractère anionique des gouttes trouve son origine dans l'acidité libre de l'huile que nous avons utilisée. Dans les conditions de pH que nous utilisons (pH physiologique neutre), les groupements carboxyliques sont déprotonés et présentent à l'interface de groupements COO^- .

VI. Fonctionnalisation des billes de polystyrène

Dans les études de phagocytose qui seront détaillées ultérieurement, nous avons comparé l'internalisation des gouttes avec celle observée par des particules solides de taille équivalente. Partant de la littérature existante, nous avons choisi de travailler avec des particules de polystyrène de diamètre égal à 6 microns (Polysciences, polystyrene DVB). Après fonctionnalisation, les billes ont été caractérisées par cytométrie en utilisant la même méthode que les gouttes d'émulsions.

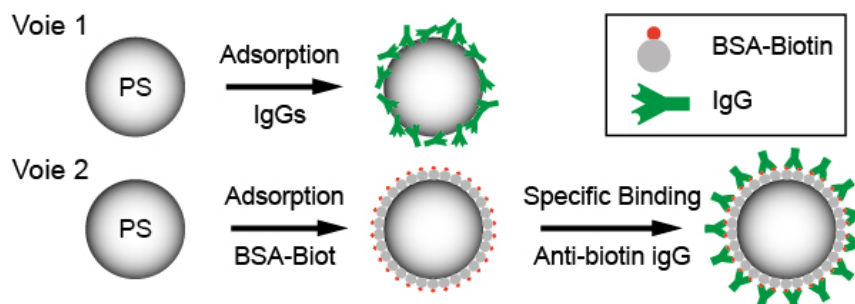


Figure 3.32. Schéma de principe des deux méthodes de fonctionnalisation de la surface des billes de polystyrène. Voie 1 : Adsorption directe des IgGs de types différents. Voie 2 : Adsorption de BSA biotinyllée à la surface des billes suivie par l'incubation avec les IgGs anti-biotines.

Nous avons vu que dans le cas des gouttes, nous étions capables de faire varier la densité d'IgGs sur 3 ordres de grandeur et d'arriver à des densités de saturation de l'interface. Dans le cas des billes, nous voulons être capables d'avoir là aussi une grande dynamique de fonctionnalisation. À saturation, si on considère qu'un IgG occupe une surface de 120 nm^2 , une bille de 6 microns doit porter à sa surface un peu moins de 10^6 IgGs.

VI.1. Fonctionnalisation des billes par des IgGs anti-biotines

Dans un premier temps, nous avons tenté de fonctionnaliser les billes de polystyrène avec les mêmes IgGs anti-biotines que nous avons utilisées pour les émulsions, et nous avons exploré deux voies distinctes de fonctionnalisation (cf. **Figure 3.32**).

La première voie est *a priori* la plus simple et consiste en l'adsorption directe des IgGs anti-biotines à la surface des billes (cf. protocole dans la partie **Annexes**).

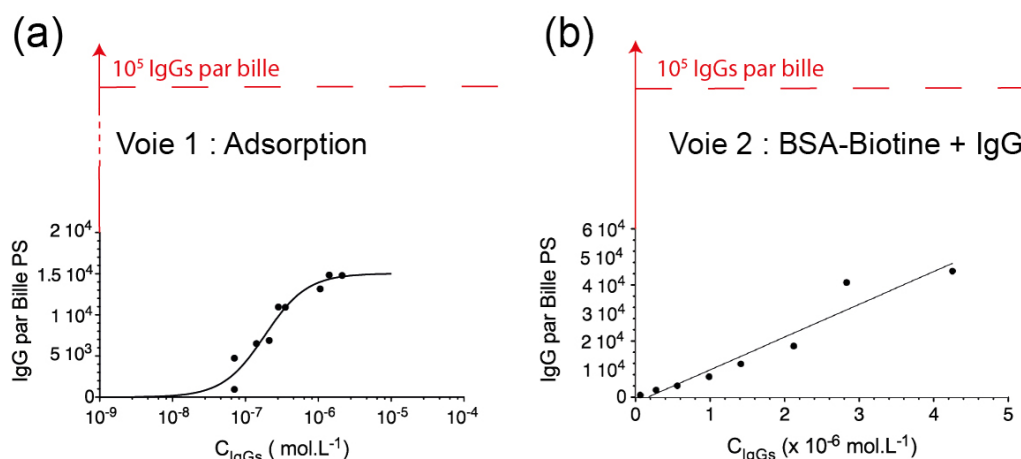


Figure 3.33. Courbes de fonctionnalisation de la surface des billes avec en (a) le protocole en deux étapes faisant intervenir de la BSA-biotine et en (b) l'opsonisation par adsorption physique directe des IgGs en surface.

La **Figure 3.33** montre que nous ne pouvons pas fixer plus de $2 \cdot 10^4$ IgGs par bille, valeur bien inférieure à celles correspondant à une monocouche dense d'anticorps. Ce résultat semble en contradiction avec les protocoles utilisant l'opsonisation par adsorption (Chow et al., 2001) qui permettent en général de saturer les interfaces. Toutefois, les solutions d'IgGs anti-biotines fluorescentes récupérées chez le fournisseur contiennent environ 1 mg.ml^{-1} d'anticorps mais aussi env. 15 mg.ml^{-1} de BSA qui sert d'agent stabilisant. Nous expliquons les valeurs obtenues dans nos conditions par une compétition d'adsorption de la BSA avec les IgGs, la BSA étant une protéine plus petite et plus facilement adsorbée à la surface (Tenzer et al., 2013).

La seconde voie a consisté dans un premier temps à adsorber une première couche de BSA conjuguée à plusieurs biotines et à utiliser l'interaction spécifique des IgGs antio-biotines pour décorer la surface des billes. Outre une éventuelle meilleure efficacité de greffage, nous avons fait l'hypothèse qu'en éloignant les IgGs de la surface de polystyrène et en utilisant une fonctionnalisation primaire de type biotine, les opsonines seraient mieux orientées que dans le cas de leur adsorption directe. La **Figure 3.33b** montre qu'au maximum de la courbe de titration, la densité d'IgGs est plus grande que dans le cas d'une adsorption directe, mais que sa valeur reste malgré tout un ordre de grandeur plus faible que la densité théorique à saturation.

VI.2. Saturation de la surface des billes avec des IgGs Lapin anti Chèvre FITC

Pour être capables de saturer la surface des billes avec des immunoglobulines, nous avons finalement travaillé avec des IgGs anti-chèvre produits dans le lapin (Anti-Goat IgG-FITC produced in rabbit, Sigma-Aldrich, F7367) fonctionnalisés par du FITC. Ces anticorps génériques sont disponibles à des concentrations beaucoup plus grandes que les IgGs anti-biotines et les solutions ne contiennent pas de

BSA pour la stabilisation. Le protocole de fonctionnalisation des billes est décrit dans les **Annexes**. Du fait que ces protocoles sont communs dans la littérature consacrée à la phagocytose, nous n'avons pas réalisé de courbe complète de titration en fonction de la concentration en IgGs en solution. Toutefois, cette méthode permet d'obtenir des densités de 7.10^5 IgGs par bille, soit quasiment la valeur de saturation théorique calculée plus haut.

Conclusion sur les matériaux fonctionnels étudiés

Nous avons donc à notre disposition une série de matériaux: des gouttes monodisperses avec différentes densités d'IgGs en surface, des suspensions polydisperses plus petites et des billes de polystyrène fonctionnalisées. Les gouttes faites au mortier permettent de faire des tests rapides et apprécier la qualité du greffage pour optimiser les protocoles. Ces différentes gouttes permettent d'étudier l'influence de la taille sur le processus phagocytaire que nous voulons étudier et l'influence de la densité de fonctionnalisation par des anticorps spécifiques. Les gouttes issues de la cellule de couette ont un diamètre moyen de l'ordre de 7 μm de diamètre et sont fabriquées de manière reproductible et contrôlée pour servir de modèle de phagocytose de grands objets tels que les cellules sénescents ou apoptotiques.

Pour la compréhension du processus de phagocytose et les phénomènes relatifs à la dynamique de surface dans la zone d'adhésion avec une cellule, nous avons fonctionnalisé nos gouttelettes d'émulsion avec différentes densités d'IgGs anti-biotines fluorescents. Grâce à la cytométrie de flux nous avons été capables de convertir de façon quantitative une fluorescence donnée en un nombre de protéines par goutte. Ce nombre d'IgGs à la surface des gouttes est un paramètre important qui influence la phagocytose comme nous allons le voir dans le chapitre suivant. Nous avons vu qu'on pouvait passer de surfaces très diluées en protéines à des surfaces complètement recouvertes formant une monocouche stable avec une répartition homogène d'IgGs anti-biotines fluorescents à la surface. Pour la plupart des expériences de phagocytose qui vont suivre, nous avons choisi de fonctionnaliser nos gouttes avec $2 \cdot 10^4$ protéines à leur surface, c'est la densité minimale qui permet d'avoir une internalisation efficace des gouttes.

Nous avons effectué des mesures de tension de surface qui traduisent la résistance des gouttes à la déformation. Des valeurs précises et stables ont été obtenues nous permettant d'envisager d'utiliser ce matériau en tant que capteur de force pour étudier les forces appliquées par des cellules par exemple.

Finalement, nous avons fonctionnalisé des billes de polystyrène rigides avec les mêmes densités d'IgGs à la surface. Ces billes nous seront utiles à la compréhension des mécanismes de reconnaissance de pathogènes et leur internalisation à travers la comparaison de la phagocytose d'objets liquides (gouttelettes) vs. solides (billes) et l'évaluation de l'influence de la diffusion libre des anticorps en surface sur le processus de phagocytose.

Chapitre 4 : Phagocytose des gouttes d'émulsions

I. Construction de la chambre d'observation et conditions expérimentales	112
II. Processus d'internalisation des gouttes d'émulsions.....	113
III. Analyse quantitative du processus de phagocytose.....	115
III.1. Choix d'une méthode de quantification de l'internalisation.....	116
III.2. Cinétique de l'internalisation	117
III.3. Qu'en est-il des macrophages qui ne phagocytent pas ?.....	119
III.4. Spécificité de l'internalisation des gouttes d'émulsions fonctionnalisées	120
III.5. La spécificité dépend de la taille des objets à internaliser	122
III.6. La phagocytose dépend de la densité d'immunoglobulines à la surface des gouttes	124
IV. Rôle de la mobilité latérale des IgGs dans le processus de phagocytose.....	130
IV.1. Étude de la phagocytose de billes de polystyrène fonctionnalisées.	130
IV.2. Dynamique des Immunoglobulines à l'interface goutte-cellule.....	133
V. Autres observations pendant et après l'internalisation	136
V.1. Disparition de la fluorescence des gouttes au cours de l'internalisation	136
V.2. Déformation des gouttes pendant le processus de phagocytose	138
Conclusion sur la phagocytose des gouttes d'émulsions fonctionnalisées	140

Préambule

Dans ce chapitre, nous nous intéressons au processus de phagocytose, plus particulièrement la phagocytose induite par les récepteurs FcγR et le mécanisme qui lui est associé (cf. **Figure 4.1**) à travers l'utilisation de gouttes d'émulsions fonctionnalisées.

Les gouttes utilisées sont des particules liquides de grande taille avoisinant celle des cellules et fonctionnalisées avec des IgGs latéralement mobiles à leurs surfaces. Les questions qui se posent alors : les gouttes sont-elles reconnues et internalisées par les macrophages ? leurs tailles, charges et densités de surface ont-elles une incidence sur le mécanisme de phagocytose ?

Pour y répondre les macrophages sont incubés avec les gouttes fonctionnalisées et suivis au cours du temps par microscopie confocale et de fluorescence.

D'autre part, ces gouttes ont la particularité d'être fonctionnalisées avec des immunoglobulines qui ont la possibilité de diffuser sur toute leur surface, il est donc important d'étudier les effets de cette mobilité sur leur internalisation et notamment répondre à la question suivante : la mobilité latérale des IgGs a-t-elle une incidence sur l'internalisation des gouttes ? Dans ce contexte, nous avons comparé, à tailles et densités d'opsonines comparables, la phagocytose des gouttes et de billes en polystyrène rigides.

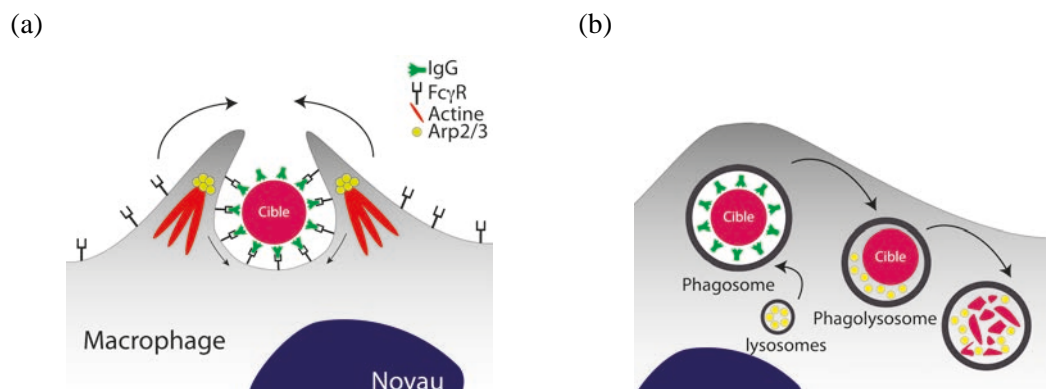


Figure 4.1. Modèle de phagocytose par la reconnaissance via les récepteurs Fcγ de particules opsonisées par des anticorps. (a) Reconnaissance d'une particule par ses récepteurs (b) Internalisation de la particule et formation du phagosome.

I. Construction de la chambre d'observation et conditions expérimentales

Travailler avec des émulsions impose une contrainte expérimentale due à la densité de ces dernières plus faible que l'eau. Il faut donc un dispositif expérimental permettant la mise en contact des gouttes et des cellules.

La chambre d'observation a été construite sur mesure et réalisée à partir de deux lamelles de verre (20 mm x 20 mm), préalablement lavées à l'acétone pour enlever tous les résidus organiques, stérilisées à l'éthanol, et assemblées par un adhésif double face qui permet d'obtenir une épaisseur de 100 μm et un volume total dans la chambre de 40 μL .

L'une des lamelles est pré-incubée 24 h avant les expériences pour y faire adhérer les macrophages. Avant de monter la chambre d'observation, la lamelle supportant les cellules est d'abord lavée avec du milieu DMEM pour éliminer les débris cellulaires.

Le choix des cellules s'est porté sur une lignée de macrophages de souris RAW 264.7 Lifeact_mCherry qui permet la visualisation de l'actine (voir le chapitre **Annexes** pour les conditions de culture cellulaire ainsi que les détails sur la lignée et sa transfection). La lignée cellulaire nous a été gracieusement fournie par le groupe de P. Jurdic (IGFL, ENS Lyon, France).

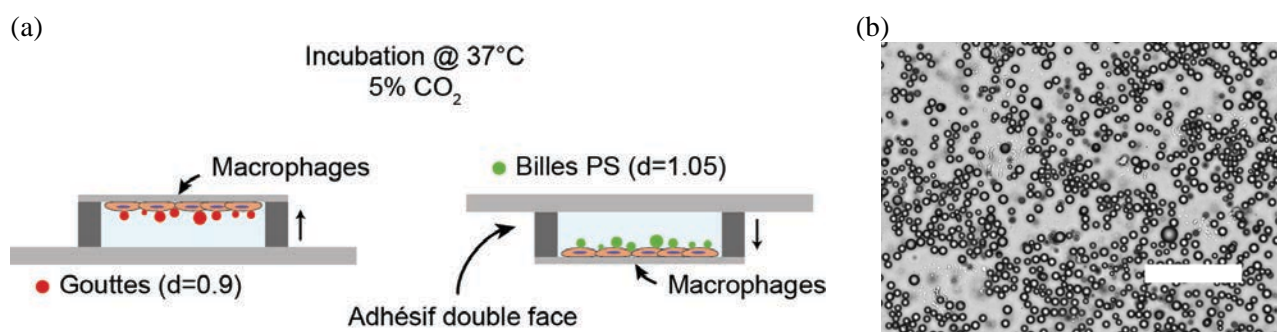


Figure 4.2. (a) Représentation schématique de la configuration de l'expérience et des chambres d'observation lamelle-lamelle incubées à 37°C sous 5% de CO_2 . (b) Image en microscopie optique de transmission (10x) d'une suspension de gouttes dans du DMEM. Echelle : 100 microns.

Une fois la chambre montée, les gouttes d'émulsion ou les billes en polystyrène en suspension à une concentration initiale de deux particules par cellule dans du DMEM ont été introduites dans les chambres d'observation par capillarité et incubées à 37°C sous 5% de CO_2 pendant un temps déterminé et en présence de macrophages (cf. **Figure 4.2**).

Les gouttes d'émulsion, ayant une plus faible densité que la phase aqueuse ($d = 0,92$), remontent et viennent au contact des cellules RAW 264.7 Lifeact_mCherry. Au contraire les billes PS étant plus

denses que le milieu d'incubation, elles sédimentent au fond de la chambre qui est retournée cette fois ci de façon à ce que la configuration permette leur adhésion aux cellules (cf. **Figure 4.2a**).

La concentration initiale de particules en suspension a été déterminée par la méthode de mesure sous microscope décrite dans le chapitre précédent et vérifiée en cytométrie de flux. Le nombre des cellules est de 10^6 par lamelle, correspondant à la densité montrée sur la **Figure 4.2b**.

Le suivi se fait soit sur des cellules fixées après un temps qui varie entre cinq et 120 minutes ou en temps réel sur des cellules vivantes.

Afin de visualiser l'actine lors de la phagocytose, nous avons marqué l'actine sur cellules fixées. Le marqueur utilisé est de la phalloïdine couplée à un fluorophore rouge, Atto-555. Bien que les macrophages soient transfectés avec le Lifeact_mCherry qui marque la fluorescence de l'actine dans le rouge, les cellules perdent de leur fluorescence entre 3 et 4 passages après leur décongélation dans les conditions de culture que nous avons utilisées. Pour être sûrs de visualiser les filaments d'actine sur cellules fixées, nous ajoutons donc de la phalloïdine marquée.

Le suivi en temps réel permet de visualiser l'internalisation des objets et la dynamique des récepteurs en surface à la fois des gouttes mais aussi des membranes cellulaires. Le temps moyen pour que les particules entrent en contact avec les cellules est inférieur à 5 minutes.

Pour évaluer l'effet de la fonctionnalisation de surface, nous avons travaillé sans sérum pour être dans des conditions telles que la phagocytose non spécifique, par rapport à la présence des IgGs, soit minimale. En effet, le sérum est la fraction liquide du sang coagulé d'un fœtus, sans cellules, fibrinogènes et autres facteurs coagulants. Cependant, comme il a déjà été souligné dans le chapitre 2, le sérum contient des facteurs de croissance, des protéines comme les immunoglobulines et des fractions d'endotoxines (LPS) qui peuvent s'adsorber de manière non spécifique à la surface des gouttes ou des billes et induire des variations dans la réponse immunitaire (Cooper et al., 1984; Kielian and Blecha, 1995; Tobias and Ulevitch, 1993).

Travailler sans sérum permet donc de s'assurer que la surface des objets étudiés est celle induite par la fonctionnalisation sans interférences de l'adsorption de protéines supplémentaires.

II. Processus d'internalisation des gouttes d'émulsions

Nous avons fixé les paramètres en choisissant une densité d'IgGs de 3.10^4 prot/goutte et le ratio initial goutte:cellule a été fixé à 2:1.

Les images obtenues en microscopie en transmission et de fluorescence montrent qu'au bout de cinq minutes les gouttes adhèrent à la surface du macrophage. Cette adhésion est rapidement suivie par la

polymérisation locale de l'actine marquée (cf. **Figure 4.3**-5minutes) et la formation du *cup* contenant la goutte. La phagocytose de grosses particules est un processus qui nécessite la contribution de l'actine (dépendant de l'actine) pour permettre au macrophage d'étendre sa membrane autour de la goutte en l'enrobant entièrement formant le *cup* d'actine (Groves et al., 2008; May and Machesky, 2001). L'existence d'un *cup* est donc la marque que le processus mis en jeu est de la phagocytose (Swanson, 2008).

Au bout de trente minutes, les gouttes sont phagocytées par les macrophages, comme le montre la **Figure 4.3**. On remarque sur l'image en transmission que la visualisation des gouttes internalisées est aisée, ce qui facilitera la quantification des processus. À la fin de l'internalisation des gouttes, on remarque que le *cup* d'actine a disparu, ce qui est en accord avec les résultats de la littérature (Swanson, 2008).

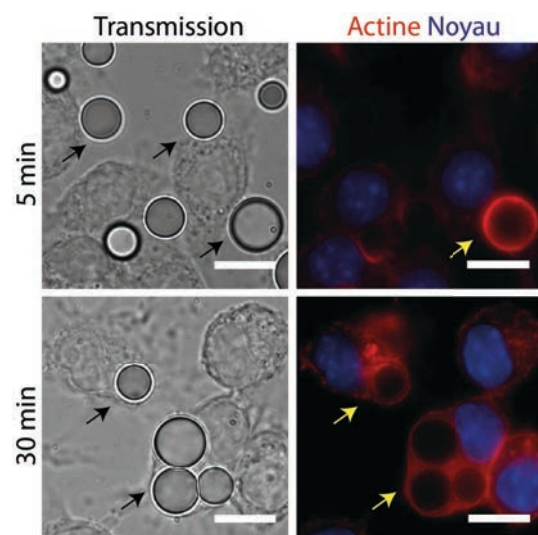


Figure 4.3. Images en microscopie en transmission et en fluorescence de la phagocytose des gouttes fonctionnalisées avec des IgGs à 5 et 30 minutes d'incubation avec les macrophages. Rouge : actine, Bleu : noyau. Échelle : 10 μ m.

Une fois que le processus d'internalisation commence, quelques minutes suffisent pour qu'une goutte fonctionnalisée avec des IgGs soit entièrement internalisée, comme le montre la **Figure 4.4**. Ceci est en accord avec les observations faites dans la littérature avec des particules de polymère dans la même gamme de taille (Champion and Mitragotri, 2006).

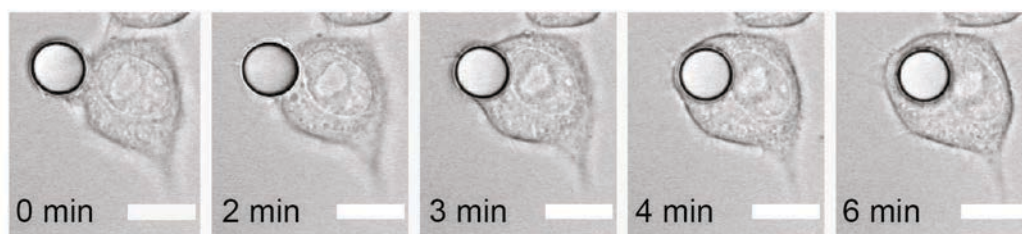


Figure 4.4. Observation en microscopie confocale en transmission de l'ingestion d'une goutte d'émulsion fonctionnalisée avec des IgGs. Échelle : 10 μ m.

La **Figure 4.5** montre un macrophage contenant trois gouttes, chacune correspondant à trois moments distincts de son internalisation. Sur cette image, nous visualisons le noyau (bleu), l'actine (rouge), et les IgGs des gouttes en vert. Notons que les gouttes fonctionnalisées par des IgGs ont une surface fluorescente et homogène lorsqu'elles sont dispersées dans un tampon, comme nous l'avons montré sur la **Figure 3.15**. Dans l'étape 1, nous observons, en plus de la forte polymérisation d'actine présentée ci-dessus, une concentration des IgGs dans la zone de contact avec le macrophage. La goutte 2 est imagée à une étape plus tardive de son internalisation, lorsque le phagosome est formé le *cup* d'actine dépolymérisé. Les IgGs ont retrouvé maintenant une répartition homogène autour de la surface. Enfin, la goutte 3 est la plus avancée dans sa phagocytose, et celle-ci ne fait plus apparaître de fluorescence sur sa surface.

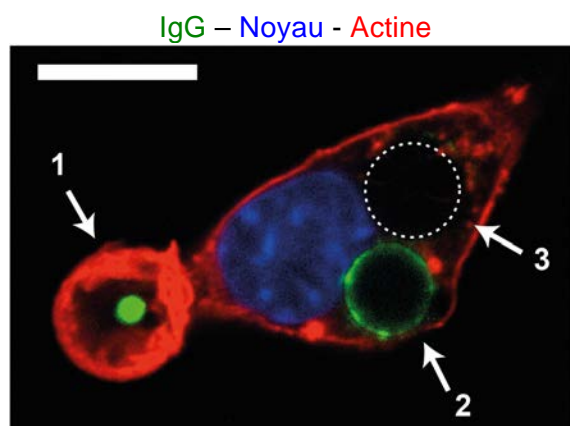


Figure 4.5. Image en microscopie confocale d'un macrophage contenant trois gouttes opsonisées à des stades différents de l'internalisation : (1) extension de membrane associée à l'existence d'un *cup* d'actine, (2) goutte internalisée autour de laquelle l'actine s'est dépolymérisée et (3) goutte ayant perdu sa fluorescence. Les pointillés blancs sont superposés à la goutte qui n'est pas visible en fluorescence. Échelle : 10 µm.

Dans la suite, nous nous sommes spécifiquement intéressés à décrire de manière quantitative les étapes qui correspondent à la goutte 1 de la figure ci-dessus. Bien que nous n'ayons pas réalisé d'études exhaustives, nous discuterons qualitativement, en fin de chapitre, des étapes correspondant aux gouttes 2 et 3.

III. Analyse quantitative du processus de phagocytose

Dans cette partie, nous allons étudier plus en détails l'internalisation des gouttes d'émulsions par les macrophages et présenter les différentes hypothèses émises quant à l'identification du mécanisme de ce processus complexe. La première étude concernera la cinétique d'internalisation des gouttes, au niveau de la cellule unique *i.e* le temps nécessaire à une cellule au contact de la goutte pour l'internaliser et au niveau de la population de cellules *i.e* le temps nécessaire à internaliser la quantité maximale des gouttes présentes. Pour cette étude nous avons fixé les paramètres en choisissant une densité d'IgGs de $3 \cdot 10^4$ IgGs par goutte sur une durée de deux heures. Cette densité correspond,

comme nous le verrons par la suite, à la quantité d'IgGs minimale pour induire une phagocytose efficace des gouttes. Le ratio initial goutte:cellule a été fixé à 2:1.

III.1. Choix d'une méthode de quantification de l'internalisation

Afin de rendre compte de l'efficacité de la phagocytose, nous avons mesuré sur une population d'environ 200 macrophages choisis au hasard (soit 20 images au microscope avec un objectif 100x) le nombre de cellules qui internalisent entre une et cinq particules. Deux paramètres ont été définis, l'index de phagocytose « PI » (pour *Phagocytic Index*) et le pourcentage des cellules qui internalisent des gouttes « %CI ».

Le calcul de l'index de phagocytose est réalisé selon le protocole mis au point par Campbell *et al.* (Campbell et al., 2001), et prend en compte non seulement le nombre (en pourcentage) de cellules qui sont phagocytaires, mais aussi leur capacités « activité » phagocytaires (combien de particules sont internalisées par cellule), ce qui nous donne rapidement accès à l'efficacité de l'internalisation.

Le calcul de cet index par cette méthode est commun à beaucoup d'études vues dans la littérature (Benigno and Wang, 2002; Hishikawa and Cheung, 1991) cependant il existe aussi d'autres méthodes qui prennent en compte, en plus des particules internalisées, celles qui sont attachées à la surface des macrophages (Champion et al., 2008; Doshi and Mitragotri, 2010; Sharma et al., 2010). Pour nos études, nous ne nous sommes intéressés qu'aux particules complètement internalisées comme signe indicateur de l'efficacité de l'internalisation.

L'index de phagocytose, PI, correspond à la moyenne arithmétique pondérée du nombre total de particules internalisées par cellule.

$$PI = \frac{\sum_{n \geq 0} n \times (NC_n)}{NC_{Total}} \times 100$$

où NC_n correspond au nombre des cellules qui internalisent n particules et NC_{Total} correspond au nombre total de cellules analysées.

Comme le paramètre PI est sensible à l'existence de cellules non compétentes pour la phagocytose, nous introduisons aussi le paramètre %CI qui quantifie, indépendamment du nombre de particules ingérées, la proportion de cellules qui internalisent au moins une particule sur l'ensemble des cellules analysées. On a donc :

$$\%IC = \frac{\sum_{n \geq 1} (NC_n)}{NC_{Total}} \times 100$$

III.2. Cinétique de l'internalisation

Afin d'évaluer le comportement des gouttes au niveau cellulaire et d'élucider les mécanismes mis en jeu pendant leur phagocytose, la cinétique d'internalisation a été évaluée. Cette étude nous permettra de comparer nos résultats de cinétique avec ceux observés dans la littérature.

La **Figure 4.6** ci-dessous montre l'évolution temporelle de deux paramètres expérimentaux définis précédemment. Ces deux paramètres augment linéairement pendant les vingt premières minutes puis atteignent un plateau au bout de 45 minutes d'incubation des gouttes avec les cellules.

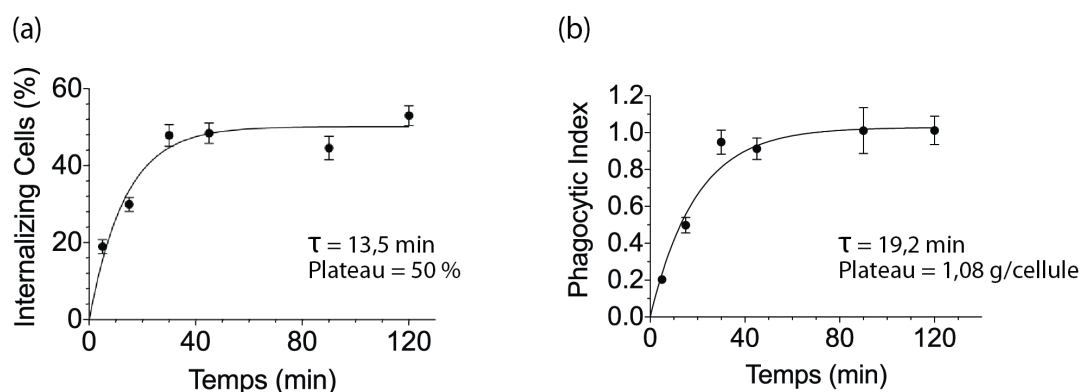


Figure 4.6. Évolution en fonction du temps du %IC et du PI. Les courbes obtenues ont été modélisées par une cinétique d'ordre 1. Les valeurs au plateau sont égales respectivement à 50% en IC% et 1,08 goutte/cellule en PI. Les constantes de temps τ sont respectivement égales à 13 et 19 min.

La courbe obtenue a été modélisée par une cinétique de type ordre 1 :

$$Y = Plateau * \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right)$$

de laquelle on peut déduire la constante de temps d'internalisation caractéristique τ qui est de l'ordre d'une quinzaine de minutes.

Au bout de 45 minutes d'incubation, 50% des cellules analysées ont internalisé au moins une goutte. L'index de phagocytose PI au plateau, correspond dans les mêmes conditions à une goutte par cellule, soit 50% des gouttes mises au départ au contact des cellules ont été complètement internalisées (cf. **Figure 4.6**).

Les ordres de grandeurs des paramètres cinétiques sont en accord avec les observations faites dans la littérature (Hampton, 1994; Unkeless & Eisen, 1975), en tenant compte du fait que les valeurs des constantes peuvent légèrement varier selon la lignée cellulaire étudiée et les caractéristiques de l'objet à phagocyter (Bizal and Butler, 1991). Bizal *et al.* ont par exemple étudié la phagocytose de levures inactivées (*Saccharomyces cerevisiae*) par des macrophages alvéolaires et des macrophages péritonéaux de souris. La comparaison des constantes de vitesses de l'internalisation mesurées

montrent que la phagocytose est plus rapide dans le cas des macrophages péritonéaux ($K = 0,047 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$) par rapport aux macrophages alvéolaires ($K = 0,016 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$). La valeur que nous observons est de l'ordre de $0,052 \pm 0,008 \text{ min}^{-1}$. Cette valeur est légèrement supérieure à celle que nous venons de mentionner en raison du type différent de macrophages (murins) utilisés. On peut cependant dire que globalement l'échelle de temps du phénomène est similaire.

D'autre part, afin de rendre compte de ce qui se passe à l'échelle de la cellule unique, il est intéressant d'examiner l'évolution de la statistique de l'internalisation, *i.e.* le nombre de gouttes internalisées par cellule, en fonction du temps. Nous avons mesuré ce nombre entre zéro et cinq considérant négligeable le nombre des cellules qui internalisent plus de cinq gouttes.

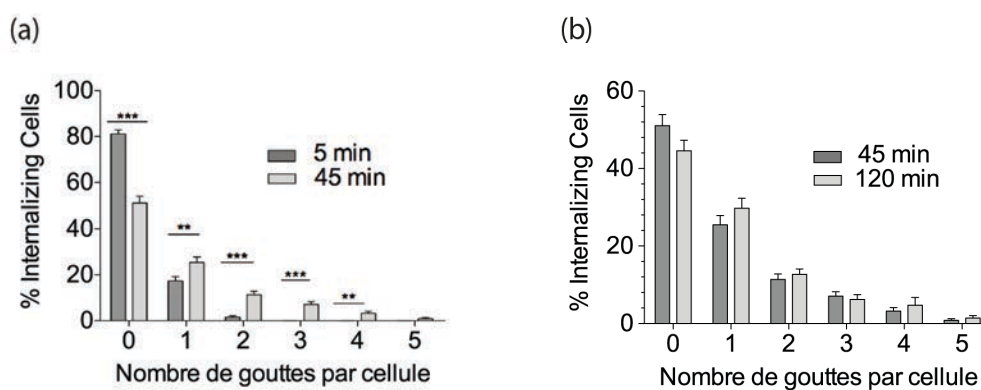


Figure 4.7. Distributions du pourcentage des cellules en fonction du nombre de gouttes internalisées entre 5 et 45 minutes (a), et entre 45 et 120 minutes (b).

La **Figure 4.7** compare les distributions du nombre de gouttes internalisées par cellule à 5 et 45 minutes (a), et 45 et 120 minutes (b). Notons que ces temps correspondent respectivement au début du processus, au temps où le palier est atteint et à la fin de l'expérience. Nous constatons clairement des différences significatives des distributions à 5 et à 45 minutes avec une diminution du pourcentage des cellules phagocytaires non actives au profit de celles qui internalisent jusqu'à 5 gouttes par cellule et qui représentent 50% de la population étudiée. À l'inverse, la comparaison des distributions obtenues entre 45 et 120 minutes montre que le système a atteint l'équilibre et ne varie plus de manière significative.

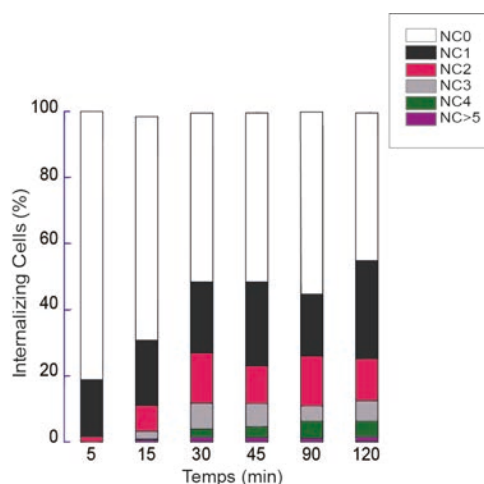


Figure 4.8. Distribution du nombre de cellules qui internalisent entre une et cinq gouttes en fonction du temps. NC_n représente le nombre de cellules avec n gouttes.

Dans la **Figure 4.8**, nous avons représenté l'évolution des distributions du nombre de gouttes par cellule et leur répartition pour chaque temps afin d'avoir une visualisation plus complète de l'ensemble du système. L'équilibre est atteint après 45 minutes d'incubation et 50% des cellules internalisent en majorité de 1 à 3 gouttes d'émulsions.

Ces observations sont en accord avec l'interprétation des résultats de la cinétique du processus et nous permettent de mieux décrire et quantifier la phagocytose des gouttes d'émulsions. Cependant une question se pose : pourquoi la moitié des macrophages ne sont pas capables d'identifier et internaliser les gouttes fonctionnalisées ?

III.3. Qu'en est-il des macrophages qui ne phagocytent pas ?

Dans notre protocole, les macrophages sont mis à adhérer sur les lamelles que nous utiliserons pour les expériences 24 h avant de réaliser les mesures d'internalisation. Dans ces conditions, nous avons mesuré par immunomarquage en fluorescence, pour une population de macrophages, la densité de récepteurs de type $Fc\gamma$ présente à la surface des macrophages (protocole en **Annexes**). Comme le montre la **Figure 4.9a**, la mise en évidence des récepteurs à la surface des cellules révèle à l'échelon cellulaire une hétérogénéité d'expression. Toutes les cellules observées n'expriment pas la même intensité de fluorescence induite par le marquage des récepteurs $Fc\gamma R$ impliqués dans la phagocytose (cf. **Figure 4.9b**). Un comptage rapide nous permet de réaliser qu'environ la moitié des cellules ont une fluorescence plus faible. La différence des macrophages dans leur capacité à internaliser des gouttes pourrait donc être attribuée à cette hétérogénéité.

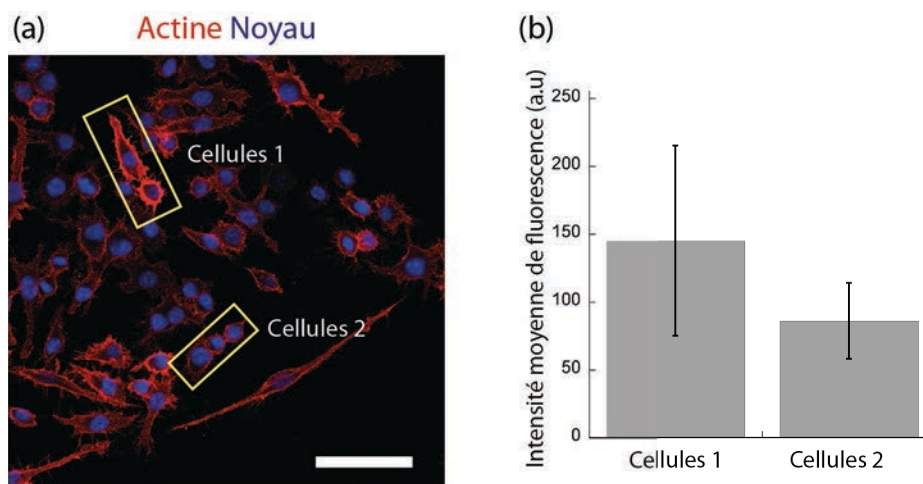


Figure 4.9. (a) Image en microscopie confocale de l'immuno-marquage fluorescent (en rouge) des récepteurs FcγR présents à la surface des macrophages Raw 246.7 Lifeact_mcheery. (b) Histogramme de l'intensité de fluorescence moyenne de deux sous-populations de cellules. Échelle : 30 μm.

Cette hétérogénéité d'expression pourrait être partiellement due au fait que toutes les cellules de la lamelle ne sont pas dans les mêmes phases du cycle cellulaire. En effet, Gandour *et al.* ont étudié l'influence du cycle cellulaire sur la densité et les propriétés des récepteurs Fcγ présents à la surface de macrophages murins. Ils ont démontré que l'activité phagocytaire est fortement dépendante de la phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule (Gandour and Walker, 1983).

Avant d'aller plus loin dans l'étude de la phagocytose, nous devons nous assurer de la spécificité de l'internalisation des gouttes fonctionnalisées. Comme nous l'avons souligné dans le premier chapitre, les macrophages possèdent un grand nombre de récepteurs à leurs surfaces qui leur permettent de reconnaître différents types d'agents infectieux et de les détruire par digestion intracellulaire. Nous nous intéressons plus précisément à la phagocytose induite par les récepteurs FcγR qui implique la reconnaissance des IgGs présents à la surface des objets à internaliser. Afin d'évaluer le rôle de la quantité d'IgGs à la surface des gouttes nous devons nous assurer de la spécificité de la phagocytose que nous observons.

III.4. Spécificité de l'internalisation des gouttes d'émulsions fonctionnalisées

La spécificité de l'internalisation est la capacité du système à reconnaître les gouttes fonctionnalisées avec des IgGs à leurs surfaces. Afin de la mettre en évidence, nous avons évalué l'efficacité de l'internalisation des gouttes avec différentes surfaces : des gouttes nues à base d'huile de soja pure, des gouttes biotinylées formulées avec de l'huile de soja dans laquelle nous avons dissout des

phospholipides DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotine, et enfin des gouttes biotinylées fonctionnalisées avec 3.10^4 prot/goutte d'IgGs anti-biotines à leur surface.

Au bout de 45 minutes d'incubation, qui correspondent au temps nécessaire pour atteindre le palier d'internalisation, les résultats obtenus à la suite des analyses des images sur cellules fixées sont représentés dans la **Figure 4.10**.

Alors que les cellules n'internalisent quasiment pas les gouttes nues et biotinylées dans le domaine de taille considéré, elles sont en revanche activées par la reconnaissance spécifique des IgGs avec $47 \pm 1.8\%$ des cellules qui sont capables d'internaliser en moyenne 0.88 ± 0.04 gouttes opsonisées. Ces valeurs correspondent à celles observées dans l'étude de la cinétique au palier.

De précédentes études ont démontré que l'efficacité de la phagocytose dépend de la charge de surface des particules à internaliser (Tabata and Ikada, 1988). En effet, des particules possédant une forte charge de surface positive ou négative sont connues pour être facilement internalisées et d'une manière non-spécifique. Pour s'assurer que la différence observée est due à une reconnaissance spécifique et non à un effet de charge de surface, le potentiel zéta des gouttes a été évalué. Le potentiel ζ indique que la surface des gouttes est chargée négativement de l'ordre de -20 mV (cf. **Figure 3.31**) et ne dépend pas de la fonctionnalisation de l'interface. Ainsi ce paramètre ne peut pas expliquer les différences observées et l'efficacité de la phagocytose des gouttes d'émulsions fonctionnalisées dépend donc uniquement de la présence des IgGs anti-biotines à leurs surfaces.

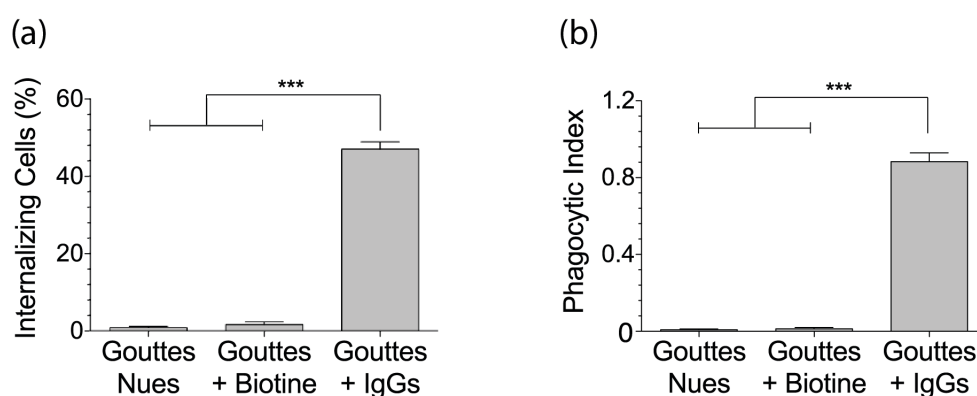


Figure 4.10. Représentation de l'internalisation des gouttes en fonction de leurs propriétés de surface, le %IC en (a) est de l'ordre de 50% et le PI en (b) correspond à 0.8 goutte/cellule. Seules les gouttes avec des $2 \cdot 10^4$ prot/goutte d'IgGs anti-biotine à leur surface sont efficacement internalisées par les macrophages. *** indique $p < 0,001$

Les faibles taux d'internalisation des gouttes nues et biotinylées peuvent être liés à la présence de Pluronic F68 utilisé à 1% lors de la fabrication des gouttes et qui ne se désorbe pas malgré les différentes étapes de lavages (Svitova and Radke, 2005). La présence de ce type de tensioactifs pourrait produire un effet d'écrantage qui inhibe la phagocytose et qui serait éliminé par la fixation

des anticorps anti-biotine à la surface des gouttes, induisant la reconnaissance et la phagocytose par les macrophages. Davis *et al.* ont étudié la phagocytose par des macrophages péritonéaux de gouttes d'émulsions fabriquées à partir d'huile de soja et stabilisées soit avec des mélanges de phospholipides soit avec un tensioactif non ionique le poloxamer 338. Ils ont ainsi démontré que la phagocytose des gouttes stabilisées avec le tensioactif non ionique était la plus lente (Davis and Hansrani, 1985). Stossel *et al.* ont aussi étudié l'effet du poloxamer 188 et 338 sur la phagocytose de gouttes d'émulsion par des neutrophiles. Ils ont démontré que la présence de ces deux tensioactifs inhibe totalement la phagocytose (Stossel et al., 1972).

Nous avons montré donc que les macrophages sont capables de reconnaître spécifiquement les gouttes ainsi conçues. Toutefois, un facteur taille intervient aussi, puisque que nous démontrons dans le paragraphe qui suit que le comportement des macrophages varie vis-à-vis de la taille de la goutte à internaliser.

III.5. La spécificité dépend de la taille des objets à internaliser

Nous avons vu dans le premier chapitre que la phagocytose dépend de la taille des particules internalisées et ce quelque soit le type de récepteur impliqué. L'origine de cette dépendance reste ambiguë (Pacheco et al., 2013; Rudt and Müller, 1993; Simon and Schmid-Schönbein, 1988; Tabata and Ikada, 1988). Cependant, la majorité des études s'accordent sur le fait que les macrophages ont une préférence pour les particules de petites tailles qui correspondent à 2 – 3 μm (Champion et al., 2008; Doshi and Mitragotri, 2010; Koval et al., 1998). Au delà de cette taille, les particules sont à peine internalisées sauf dans le cas d'une interface saturée en immunoglobulines (Zhang et al., 2010). Les études existantes ont donc contribué à la compréhension du processus de phagocytose à travers la modélisation de l'internalisation de petites particules comme les bactéries (0,2 – 2 μm) ou les virus (0,3 μm). Cependant elles ne parviennent pas à rendre compte de la capacité qu'ont les macrophages à internaliser de gros objets comme les cellules sénescents (7 – 9 μm , ex. érythrocytes 8 μm), apoptotiques (< 10 μm) ou encore les cellules cancéreuses (10 – 20 μm).

Dans cette partie, nous allons étudier l'effet de la taille des gouttes sur l'efficacité de l'internalisation. Nous avons à notre disposition deux lots de gouttes d'émulsions. Le premier échantillon correspond à des petites gouttes polydisperses [1 – 4 μm], de taille inférieure à 5 μm , réalisées au mortier, et le deuxième échantillon est une émulsion monodisperse avec un diamètre moyen de 7 μm réalisée avec l'émulsificateur de Couette.

Afin d'évaluer un possible effet de la taille, nous avons d'abord observé l'internalisation des deux lots de gouttes non opsonisées. Les premières informations ont été obtenues par microscopie en

transmission et de fluorescence, au bout de 45 minutes d'incubation avec les cellules. La **Figure 4.11a** montre que les petites gouttes polydisperses sont efficacement phagocytées par les macrophages sans être opsonisées. Leur internalisation est donc non spécifique. En revanche, la **Figure 4.11b** montre que les macrophages en contact avec la population de grosses gouttes monodisperses n'internalisent aucune goutte.

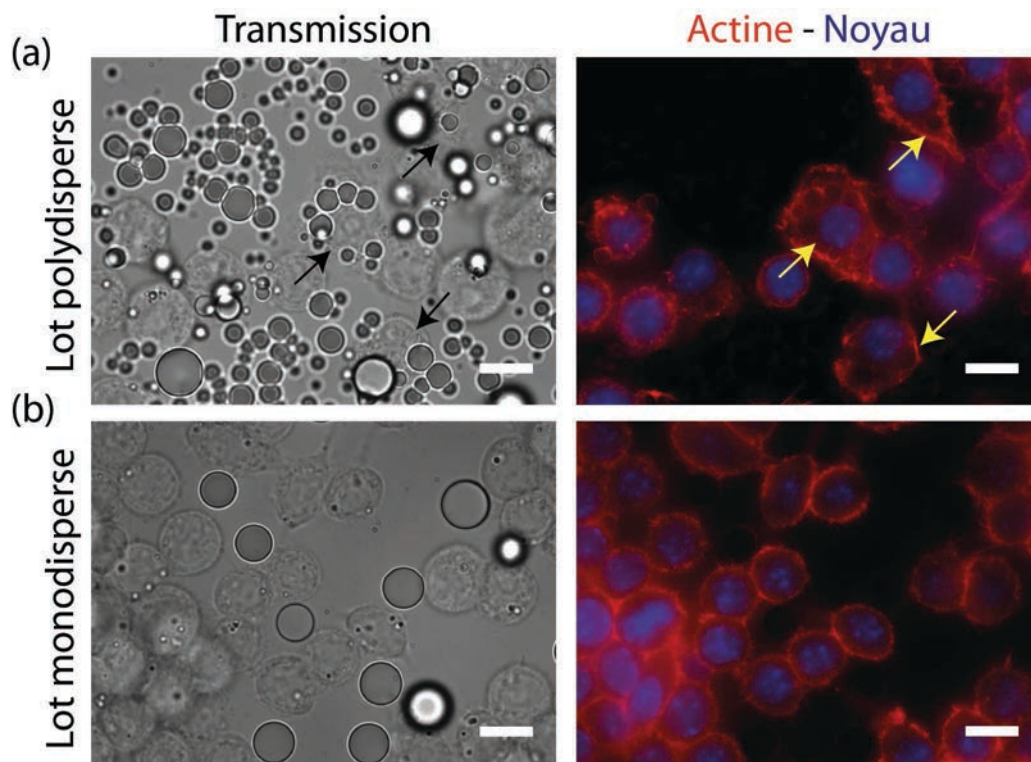


Figure 4.11. Images en microscopie de fluorescence et en transmission de l'internalisation des deux lots de gouttes. (a) Seules les petites gouttes sont internalisées, (b) les macrophages exposés aux plus grosses gouttes monodisperses n'internalisent aucune. Échelle 10 μm .

Par la suite nous nous sommes intéressés à la phagocytose des mêmes lots de gouttes fonctionnalisées avec la même densité d'IgGs. Les photos en microscopie en transmission montrent que dans le cas où les gouttes sont fonctionnalisées, l'internalisation est efficace pour les deux lots d'émulsions (cf. **Figure 4.12**).

On retrouve bien à travers ces expériences que la phagocytose dépend de la taille des objets à internaliser et on observe de plus que celle-ci n'est spécifique que pour des tailles supérieures à 5 μm de diamètre. Dans ce cadre il peut être intéressant de confronter nos résultats à ceux obtenus pour la phagocytose de billes de polystyrène de tailles qui varient entre 1 et 9 μm , (i) non opsonisées impliquant les *scavengers* récepteurs et (ii) opsonisées avec des IgGs impliquant la reconnaissance induite par les récepteurs Fc γ R (Champion et al., 2008; Doshi and Mitragotri, 2010).

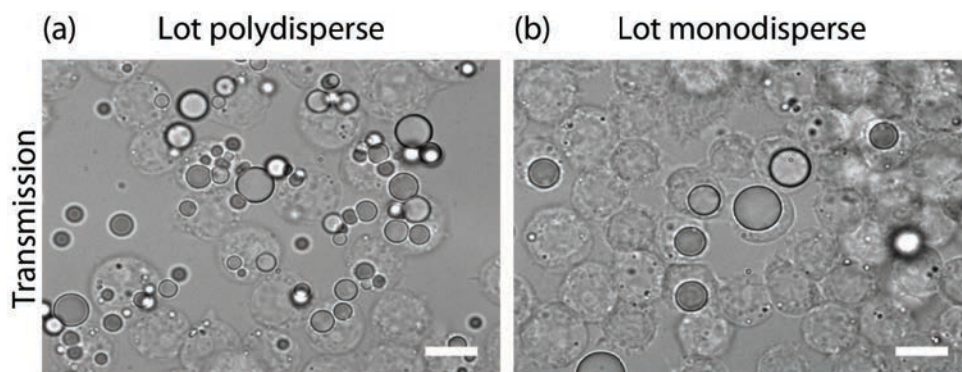


Figure 4.12. Images en microscopie en transmission de l'internalisation des deux lots de gouttes (a) et (b) fonctionnalisées avec la même densité d'IgGs et qui est égale à $3 \cdot 10^4$ prot/goutte.

Ces études ont rapporté que les particules possédant des diamètres de 2 à 3 μm sont celles qui donnent les taux d'internalisation les plus élevés qu'elles soient opsonisées ou pas, au-delà et en-dessous de cette taille l'internalisation des billes est beaucoup plus difficile (cf. **Figure 1.17**).

Bien que la variabilité des lignées cellulaires utilisées dans ces études ne permette pas de comparaison directe, nous pouvons souligner la différence observée avec l'internalisation de nos gouttes d'émulsions. En effet, nous démontrons que pour de petites tailles la phagocytose a lieu même en absence des IgGs alors que pour des gouttes de 7 μm de diamètre une fonctionnalisation de surface est nécessaire pour induire leur internalisation.

Nous démontrons donc que les macrophages sont capables de reconnaître spécifiquement les gouttes ainsi conçues. Nous pouvons maintenant évaluer le rôle de la quantité d'IgGs à la surface des gouttes sur l'efficacité de l'internalisation.

III.6. La phagocytose dépend de la densité d'immunoglobulines à la surface des gouttes

Nous disposons à ce stade d'objets liquides, les gouttes d'émulsions, dont la surface peut être fonctionnalisée avec un excellent contrôle de la densité de protéines. La reconnaissance des gouttes aboutit à leur phagocytose de manière spécifique. Nous proposons donc de déterminer s'il existe une densité minimale d'IgGs à la surface des gouttes nécessaire pour induire la phagocytose par les Fc γ récepteurs. Pour ces études, nous avons fonctionnalisé les gouttes avec des densités croissantes d'IgGs anti-biotines à la surface qui correspondent à une variation de la quantité de protéines de 10^3 IgGs/goutte à $8 \cdot 10^4$ IgGs/goutte (respectivement à $10^5 \text{ nm}^2/\text{IgG}$ et $10^3 \text{ nm}^2/\text{IgG}$) et nous les avons incubées avec des macrophages pendant 45 minutes. Les courbes dose-réponse que nous obtenons sont ainsi représentées dans la **Figure 4.13** et décrivent la réponse cellulaire %IC ou PI (réponse) à des densités croissantes d'IgGs (dose).

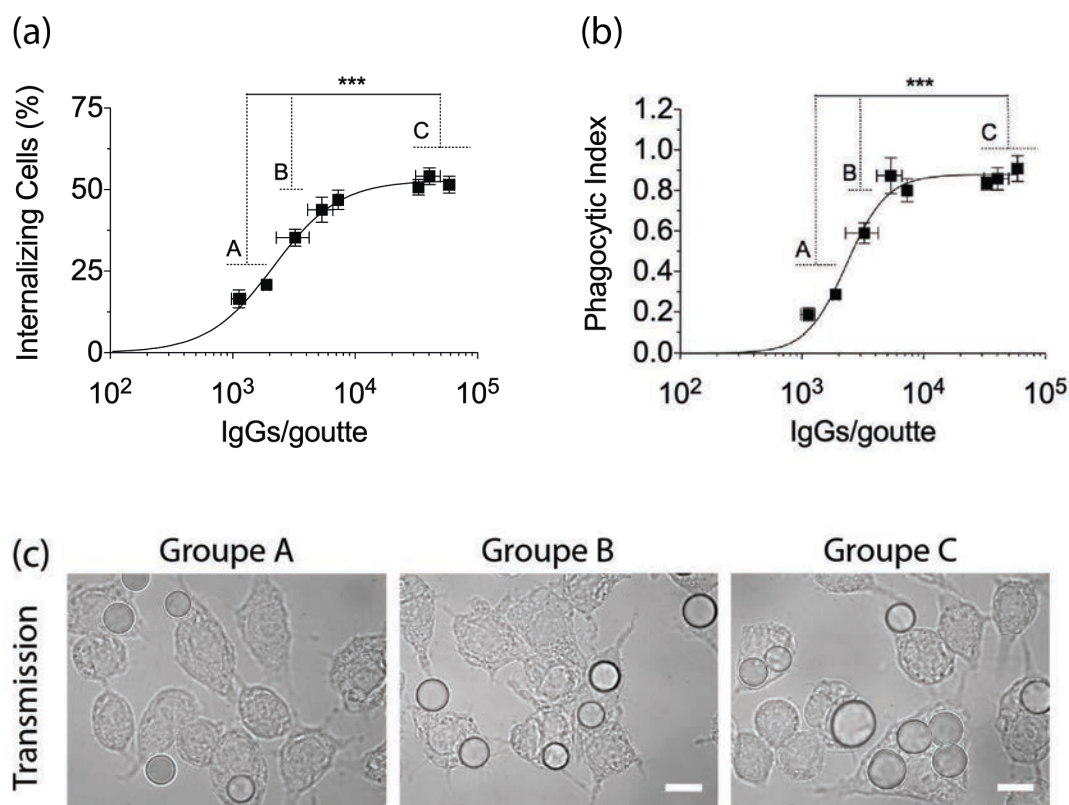


Figure 4.13. Dépendance de l'efficacité de la phagocytose en fonction de la densité d'IgGs anti-biotine en surface des gouttes. (a) %IC en fonction du nombre d'IgGs/goutte. (b) PI en fonction du nombre d'IgGs/goutte. Les deux courbes sont décrites par la loi de Hill à 3 paramètres. Chaque valeur correspond à la moyenne de deux expériences indépendantes. (c) Images en microscopie en transmission de lamelles représentatives des groupes d'expériences A, B et C. Échelle : 10 μ m. *** indique $p < 0,001$.

Nous obtenons des courbes dose-réponse (ou dose-effet, dose-action) qui décrivent la réponse du système en fonction de la densité des IgGs (cf. **Figure 4.13**). La relation dose-réponse est définie selon l'ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S.A.*) comme étant la relation entre "la quantité d'exposition à une substance (dose) et les changements conséquents dans les fonctions physiologiques ou la santé (réponse)". Cette notion permet d'établir des doses seuil qu'on cherche à estimer. Elle est souvent utilisée pour déterminer l'effet de doses croissantes d'une substance à étudier, par exemple obtenir la concentration donnant la moitié de l'efficacité maximale pour comparer entre elles différentes molécules (DeLean et al., 1978).

La courbe dose-réponse est généralement transformée en une sigmoïde en utilisant un repère semi-logarithmique (cf. **Figure 4.14**). La courbe ainsi obtenue donne accès à trois paramètres importants : (i) La dose seuil à partir de laquelle il y a apparition de l'effet, (ii) La dose maximale qui est attribuée lorsqu'on atteint la réponse maximale, (iii) la DE_{50} (Dose Efficace 50) pour laquelle on obtient 50% de la réponse maximale.

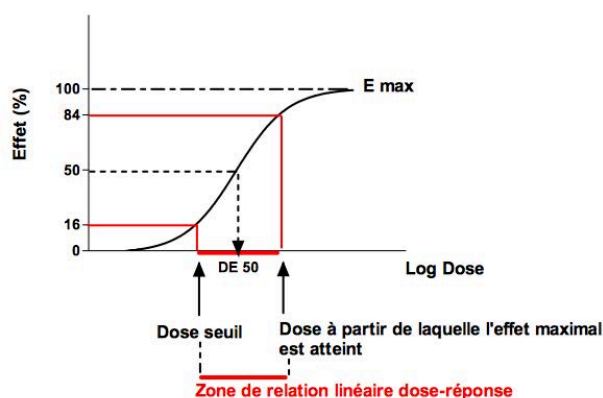


Figure 4.14. Représentation de la courbe dose-réponse ainsi que les principaux paramètres qui en résultent. Image adaptée de (Loichot and Grima, 2006).

La **Figure 4.13** montre que le pourcentage de cellules qui ont la capacité d'internaliser des gouttes (*a*) ainsi que l'indice de phagocytose (*b*) augmentent avec le nombre d' IgGs à la surface et atteignent un plateau au-dessus de 10^4 IgGs/goutte pour lequel $52 \pm 2\%$ des cellules sont capables d'internaliser 0.87 ± 0.81 gouttes ($\%IC_{Max}$ et PI_{Max}). L'étude statistique des résultats de l'expérience montre des différences significatives de l'efficacité de phagocytose entre les densités d'IgGs au plateau (C), à 50% de l'efficacité maximale obtenue (B) et aux faibles densités (A). Par ailleurs au-delà de la densité maximale, la phagocytose reste constante sur une gamme de densités d'un ordre de grandeur (entre 10^4 et 10^5 IgGs/goutte, voir figure 5.10 (a) et (b)). La **Figure 4.13c** montre des images de microscopie caractéristiques des trois conditions A, B, et C.

Les deux courbes suivent une équation de Hill à partir de laquelle nous pouvons extraire la valeur de la densité d'IgGs pour laquelle nous obtenons 50% de l'efficacité maximale de phagocytose.

Prenons l'exemple la courbe $PI = f(\text{IgGs/goutte})$, l'équation de Hill à 3 paramètres correspond dans ce cas à :

$$PI = \frac{PI_{Max}}{1 + \left(\frac{IgG_{50}}{(IgG \text{ per droplet})} \right)^n}$$

où PI_{Max} représente la valeur de saturation de la courbe, IgG_{50} le nombre d'IgGs par goutte nécessaire pour atteindre 50% de la valeur de saturation et n le coefficient de Hill. Nous obtenons donc les valeurs suivantes : $PI_{Max} = 0.87 \pm 0.8$; $IgG_{50} = 2330 \pm 180$ IgGs/goutte; $n = 2.6 \pm 0.5$.

La courbe $\%IC = f(\text{IgGs/goutte})$ donne les résultats suivants : $\%IC_{Max} = 52 \pm 2\%$; $IgG_{50} = 2,15 \cdot 10^3 \pm 200$ IgGs/goutte ; et $n = 1.6 \pm 0.2$.

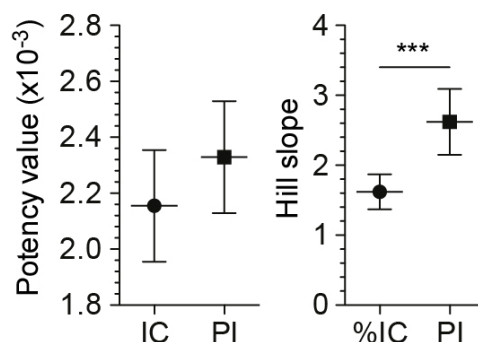


Figure 4.15. Comparaison des paramètres de Hill ; IgG_{50} et n , extraits des courbes $\%IC = f(IgGs/goutte)$ et $PI = f(IgGs/goutte)$.

La comparaison des valeurs extraites des deux courbes $\%IC = f(IgGs/goutte)$ et $PI = f(IgGs/goutte)$ des paramètres de Hill est représentée sur la **Figure 4.15**. Alors que quelle que soit la paramétrisation, les valeurs de IgG_{50} ne sont pas significativement différentes, le coefficient de Hill n est supérieur dans le cas où l'on mesure le PI par rapport au $\%IC$. Ceci s'explique par le fait que tenant compte du nombre de particules internalisées, le PI est sensible aux grandes valeurs, ajoutant donc une plus grande non-linéarité à la courbe.

Notons que le nombre d'IgGs par goutte nécessaire pour atteindre 50% de l'efficacité maximale obtenue est de l'ordre de 2.10^3 , ce qui correspond à environ 0,2% de la monocouche de protéines d'IgGs qu'on peut greffer en surface des gouttes, si on considère qu'une IgG a une aire de 120 nm^2 . Cette densité est extrêmement faible, et nous comparerons un peu plus loin dans le manuscrit cette valeur à des mesures similaires qui ont été réalisées avec des erythrocytes comme cibles.

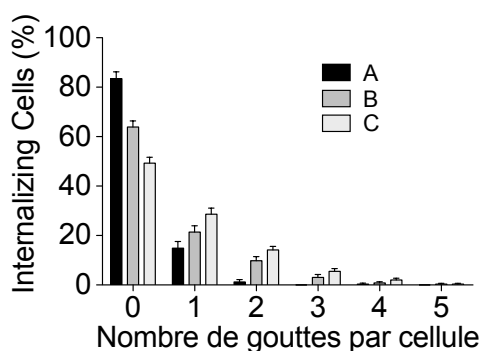


Figure 4.16. Variation du $\%IC$ en fonction du nombre de goutte par cellule pour les trois groupes d'expériences A, B et C correspondant aux densités d'IgGs au plateau (C) à 50% de l'efficacité maximale obtenue (B) et aux faibles densités (A).

Si l'on s'intéresse maintenant à ce qui se passe au niveau cellulaire, on trouve que le nombre de protéines à la surface des gouttes modifie la distribution du nombre de gouttes par cellule.

Nous avons représenté sur la **Figure 4.16** le $\%IC$ en fonction du nombre de gouttes par cellule pour les trois groupes d'expériences A, B et C définis dans la **Figure 4.13c**. Nous voyons que plus la densité d'IgGs croît plus la valeur moyenne du nombre de gouttes par cellule augmente. Ainsi, non seulement la quantité d'IgGs à la surface des gouttes induit une augmentation du nombre des cellules

qui sont phagocytaires mais aussi un accroissement de leur capacité de phagocytose (nombre de gouttes/cellule).

Nous démontrons alors que la densité d'IgGs à la surface des gouttes joue un rôle important que ce soit en stimulant les macrophages pour internaliser des gouttes ou en faisant croître la valeur moyenne du nombre de gouttes qu'ils sont capables de phagocyter. La réponse phagocytaire est donc sensible à ce paramètre et conduit à une relation dose-réponse qui donne accès à d'importants paramètres qui décrivent l'efficacité de notre système.

Dans ce contexte, et malgré le peu d'études existantes sur ce sujet, des observations récentes ont indiqué qu'une densité minimale de protéines est nécessaire pour induire la phagocytose de globules rouges opsonisés avec des IgGs (Gallo et al., 2010). Gallo *et al.* ont ainsi étudié la phagocytose de *SRBC* (*sheep red blood cell*) opsonisés avec des densités croissantes d'IgGs par des macrophages de moelle épinière de souris et qui ont été stimulés au LPS. Cet exemple d'étude est le plus ressemblant de ce qui existe en littérature à notre système, bien que nous avons fait en sorte d'éviter la stimulation des macrophages afin de défavoriser la phagocytose non spécifique des gouttes. La forme de la courbe dose-réponse rapportée (données analysées par nos soins) est similaire à ce que nous observons (cf. **Figure 4.17**).

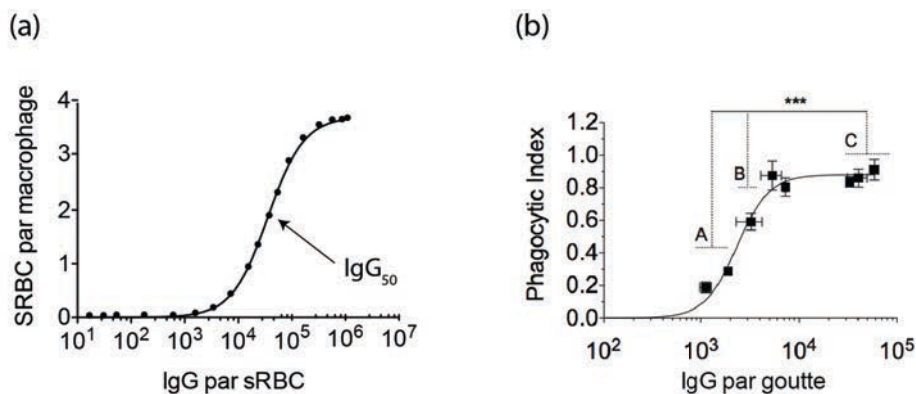


Figure 4.17. (a) Représentation de la phagocytose des SRBC fonctionnalisés avec des IgGs en fonction de la quantité de ces derniers (Gallo et al., 2010). Données analysées par nos soins. *** indique $p < 0,001$.

Cependant, si nous faisons l'hypothèse que les deux types de macrophages utilisés ont le même comportement, la densité évaluée d'IgGs nécessaires à induire l'internalisation efficace des globules rouges est dix fois plus grande ($3 \cdot 10^5$ IgGs/SRBC) que les valeurs de densités que nous observons ($3 \cdot 10^4$ IgGs/goutte) et ce malgré l'ajout du LPS. Pour expliquer cette différence, on peut suggérer le fait que la diffusion des IgGs en surface des gouttes liquides est plus grande qu'en surface des globules

rouges ce qui permet au macrophage de reconnaître la particule et de l'internaliser. En effet, la membrane cellulaire (l'exemple donné ici fait référence aux érythrocytes) est composée d'une bicouche de phospholipides dense traversée par des structures moléculaires. Ces structures peuvent être des glycoprotéines qui constituent les récepteurs ou qui assurent une bonne cohésion entre les films de phospholipides. Cette organisation complexe au sein de la membrane cellulaire fait que celle-ci est plus rigide qu'une simple goutte d'émulsion et que les IgGs sont moins libres de diffuser à la surface.

Ainsi nous venons de voir que la densité d'IgGs en surface des gouttes joue un rôle important dans la phagocytose induite par les récepteurs FcγR. Cependant une question subsiste : Quel est le rôle de la mobilité latérale dans l'efficacité de l'internalisation ? Pour y répondre nous allons comparer l'efficacité de la phagocytose des gouttes avec des billes de polystyrène à travers des expériences d'internalisation dans les mêmes conditions.

IV. Rôle de la mobilité latérale des IgGs dans le processus de phagocytose.

Comme nous l'avons déjà souligné, la majorité des études suggèrent que la phagocytose est peu efficace pour des tailles de particules supérieures à 2 – 3 μm (Champion et al., 2008; Doshi and Mitragotri, 2010). Au delà de cette taille, les particules doivent présenter des surfaces saturées en IgGs pour induire leur internalisation (Zhang et al., 2010). Nos observations semblent montrer que des gouttes d'émulsions de grands diamètres (7 μm) sont facilement internalisées par les macrophages même pour de faibles densités d'IgGs ce qui n'est pas en accord avec ces précédentes observations. Par ailleurs d'autres études ont montré qu'une densité minimale d'IgGs en surface des objets cibles, de l'ordre de 10^4 prot/goutte, est nécessaire pour induire la phagocytose. Cette valeur est dix fois plus grande que celle que nous avons mesurée (Gallo et al., 2010). Le phénomène de mobilité latérale des IgGs en surface des gouttes liquides pourrait donc être à l'origine de l'efficacité observée et expliquer les différences par rapport aux études précédentes. Cependant, il est nécessaire de vérifier cette hypothèse.

Pour compléter notre étude, nous avons étudié la phagocytose de billes de polystyrène de même taille fonctionnalisées avec différentes densités d'IgGs, une densité faible qui correspond à la densité minimale suffisante pour induire l'internalisation efficace des gouttes d'émulsions, une densité forte qui correspond à 10 fois plus que la densité minimale et la saturation totale de la surface des billes en IgGs.

IV.1. Étude de la phagocytose de billes de polystyrène fonctionnalisées.

Pour comparer l'efficacité de phagocytose des billes en polystyrène (PS) avec les gouttes d'émulsion, les paramètres des expériences suivants sont maintenus constants : (i) la gamme de tailles (gouttes 7 μm ; billes 6 μm), (ii) le ratio de particules par cellule (2 particules/cellule) (iii) le temps d'incubation (45 minutes). Concernant les densités d'IgGs, nous avons choisis des valeurs qui se situent dans la zone de saturation des courbes dose-réponse des gouttes présentées sur la **Figure 4.13**.

Comme on peut le voir sur la **Figure 4.18**, la densité d'IgGs dans la gamme 10^4 - 10^5 n'a aucune influence sur l'efficacité de l'internalisation des gouttes d'émulsions qui reste élevée. Au contraire, la densité d'opsonisation influence la phagocytose des billes de PS puisque à une densité 5 fois plus faible que la saturation de l'interface, l'efficacité d'internalisation diminue d'un facteur trois.

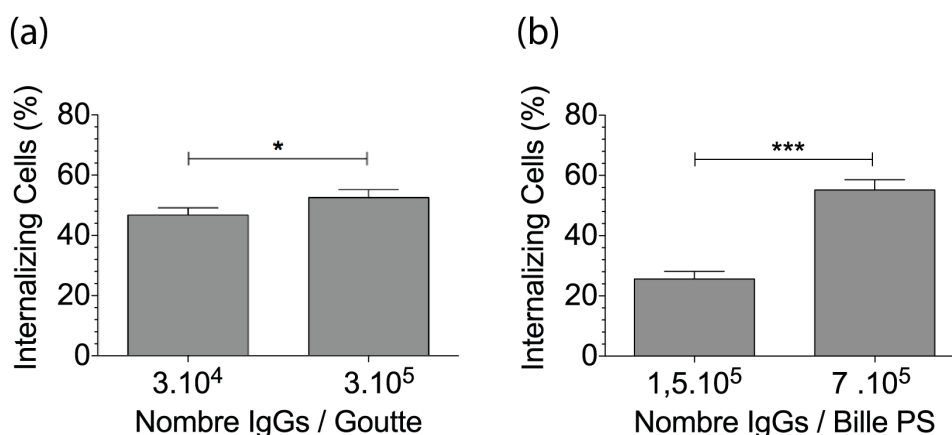


Figure 4.18. Comparaison de l'effet de la densité d'IgGs en surface sur l'efficacité de l'internalisation des gouttes en (a) et des billes en PS en (b). *** indique $p < 0,001$.

Pour de faibles densités d'IgGs, la différence dans l'efficacité de l'internalisation des gouttes vs. billes pourrait être une conséquence de la différence en termes de propriétés mécaniques des cibles comme leur déformabilité.

En effet, il a été démontré que dans le cas des billes de polyacrylamide fabriquées avec différents degrés de réticulation, les particules rigides qui en résultent sont plus efficacement internalisées que celles qui sont déformables (Beningo and Wang, 2002). Nos expériences ne suivent pas cette tendance. En effet, aux faibles densités d'IgGs, les billes rigides en polystyrène sont faiblement internalisées, tandis qu'aux plus fortes densités leur internalisation est similaire à celle des gouttes qui sont déformables. Ce paramètre ne permet donc pas d'expliquer la différence entre l'efficacité d'internalisation de billes et de gouttes opsonisées avec de faibles densités d'IgGs.

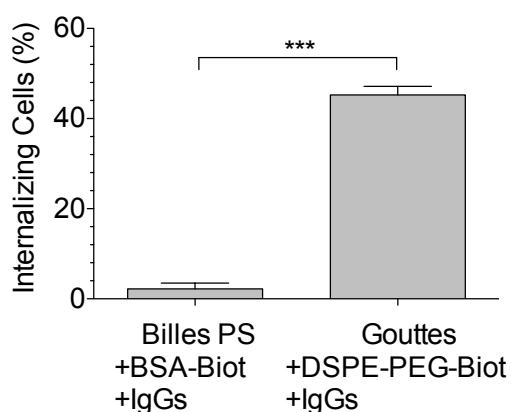


Figure 4.19. Nombre des cellules qui internalisent en %, incubées avec des billes de polystyrène ou des gouttes opsonisées avec la même quantité d'IgGs (3.10⁴ IgGs/particule, après 45 min d'incubation). *** indique $p < 0,001$.

Afin de déterminer s'il y a une perte de fonctionnalité par adsorption directe des IgGs sur les billes une mauvaise orientation des fragments Fc à la surface des billes, nous les avons fonctionnalisées différemment. La première étape consiste à faire adsorber à saturation de la BSA biotinylée, qui donne accès aux biotines en surface. Ensuite, en deuxième étape, nous ajoutons les IgGs anti-biotines

fluorescentes. Nous avons par la suite comparé l'efficacité de la phagocytose des billes ainsi fonctionnalisées avec des gouttes d'émulsions ayant la même densité d'IgGs en surface, de l'ordre de 3.10^4 prot/goutte.

La **Figure 4.19** montre que même avec a priori une meilleure orientation des IgGs en surface des billes, celles-ci sont très faiblement internalisées comparées aux gouttes. La faible internalisation des billes n'est donc pas due à une mauvaise orientation des IgGs en surface. Zhang *et al.* ont précédemment démontré que des billes de polystyrène fonctionnalisées avec de faibles quantités d'IgGs étaient faiblement internalisées, ce qui est en accord avec les résultats que nous obtenons (Zhang et al., 2010). Ceci montre que la densité d'IgGs en surface des particules influence le processus de phagocytose.

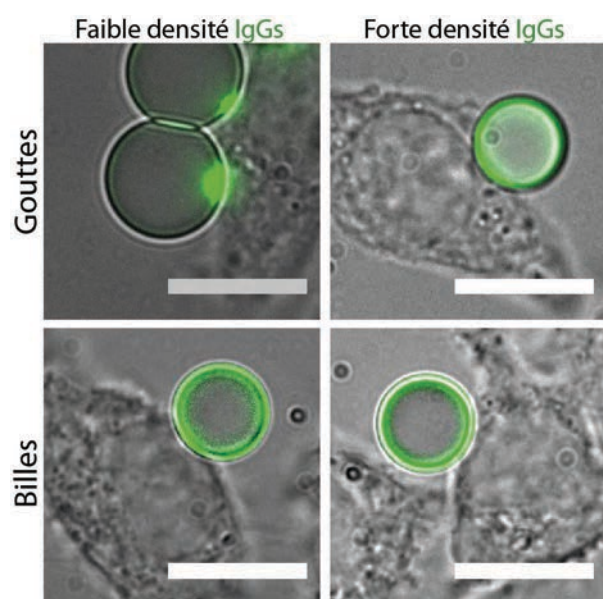


Figure 4.20. Superposition d'images en transmission et en épifluorescence de l'internalisation des gouttes et des billes de polystyrène à deux densités différentes d'IgGs par particule. Échelle : 10 μ m.

En observant les détails de l'internalisation des particules par microscopie de fluorescence, la **Figure 4.20** montre que les IgGs à la surface des gouttes et des billes ont un comportement très différent quand les objets sont au contact des gouttes.

On observe des *clusters* d'IgGs uniquement pour les gouttes d'émulsions fonctionnalisées avec de faibles densités d'IgGs. Dans les conditions où l'on travaille avec de fortes densités, la surface des gouttes est presque saturée en IgGs ce qui rend les variations locales de la répartition des opsonines à peine observables et explique pourquoi aucun *cluster* n'est visible.

Les billes de polystyrène, quant à elles, présentent à leurs surfaces des IgGs incapables de diffuser quelque soit leur densité. Ceci suggère que les différences de propriétés interfaciales des deux types de particules pourraient influencer fortement la réponse phagocytaire.

Il semble donc qu'il y ait un seuil à franchir pour activer les mécanismes d'internalisation via les complexes IgGs-Fc γ R. La mobilité latérale des IgGs dans la zone de contact avec le phagocyte peut augmenter la densité locale dans cette région et aider à franchir ce seuil pour déclencher la phagocytose.

IV.2. Dynamique des Immunoglobulines à l'interface goutte-cellule.

Si on observe la répartition de la fluorescence des IgGs en surface des gouttes on s'aperçoit de leur dynamique en surface au cours de l'internalisation. Cette dynamique est due à la propriété liquide des objets synthétisés qui présentent une surface totalement fluide permettant aux IgGs de diffuser librement.

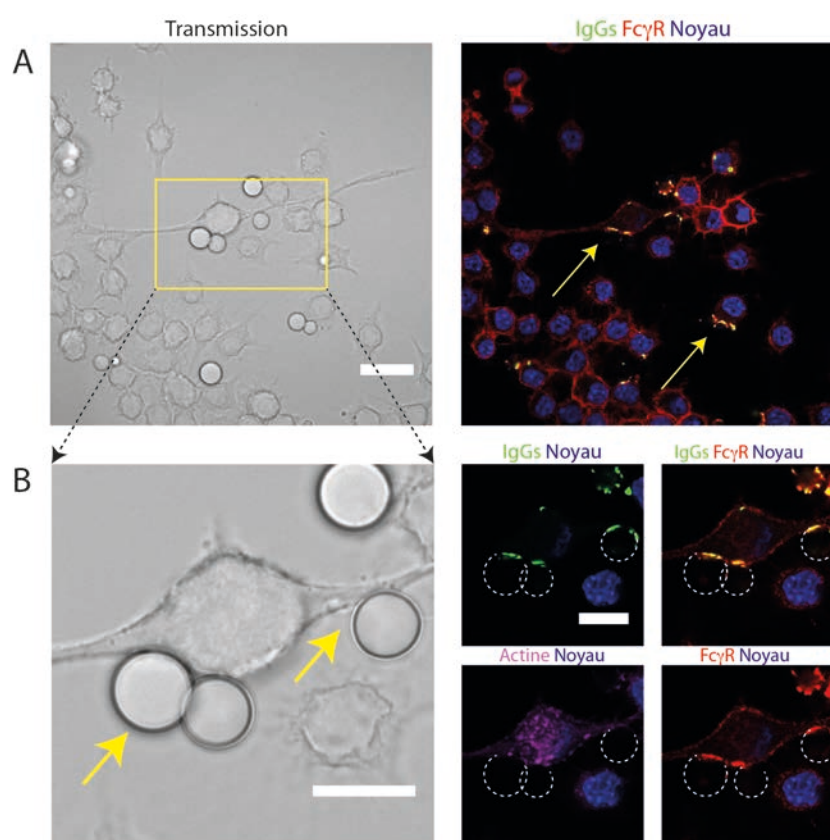


Figure 4.21. (A) Images en microscopie en transmission et en épifluorescence de l'immunolocalisation lors de l'étape de l'adhésion des gouttes aux cellules : IgGs (vert, Alexa-488), récepteurs Fc γ rouge, Alexa-647), réseau d'actine (magenta, Atto-555), noyau (bleu, DAPI). Échelle : 20 μ m. (B) Visualisation au plus près de la membrane cellulaire de la colocalisation des IgGs et des Fc γ en zone d'adhésion. Les lignes en pointillés indiquent la position des gouttes. Échelle : 10 μ m.

IV.2.1. IgGs et Fc γ Clustering

Dès les premières minutes d'incubation des cellules avec la suspension de gouttes fonctionnalisées avec des IgGs fluorescents Alexa 488 à $3 \cdot 10^4$ prot/goutte, nous observons un recrutement très dense

de fluorophores dans la zone de contact qui correspond à la zone d'adhésion aux macrophages (cf. **Figure 4.22**). Les IgGs qui étaient initialement répartis de façon homogène sur toute la surface de la goutte se trouvent maintenant tous dirigés et recrutés en zone de contact. On peut envisager que ce recrutement soit lié à une modification de la densité de récepteurs dans la zone de contact.

Pour démontrer cette hypothèse de recrutement local des récepteurs Fc γ à la surface de la membrane en réponse à la reconnaissance spécifique des fragments Fc portés par les IgGs nous avons réalisé une immunolocalisation sur des cellules fixées. Nous observons que le recrutement des IgGs colocalise avec une accumulation des récepteurs membranaires Fc γ (cf. **Figure 4.21**) dans la zone de contact.

Nous avons suivi en temps réel la dynamique des *clusters* d'IgGs à la surface de la goutte en contact avec une cellule. Comme on peut le voir sur la **Figure 4.22** les IgGs sont latéralement mobiles sur toute la surface de la goutte. Au début, larges et dispersés, ces *clusters* se resserrent en l'espace de quelques minutes pour former un *cluster* plus dense et localisé en zone de contact. Les IgGs sont donc hautement dynamiques et latéralement mobiles au cours de la phase de reconnaissance. Les temps caractéristiques du phénomène montré ici sont bien plus grand que ceux associées à une diffusion libre à l'interface, suggèrent un mouvement causé par un remodelage des structures internes de la cellule avant internalisation.

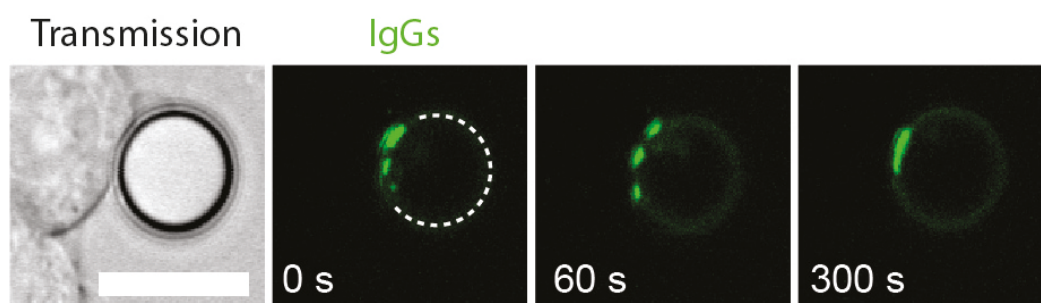


Figure 4.22. Images en transmission et en fluorescence de la dynamique des IgGs à la surface des gouttes. Échelle : 10 μ m.

IV.2.1. *Clustering* actif ou passif ?

L'étude de la phagocytose de gouttes d'émulsions fonctionnalisées par de faibles ou fortes densités d'IgGs a permis de mettre en évidence leur capacité à être internalisées efficacement par des macrophages. Cette internalisation se fait par reconnaissance des IgGs à la surface des gouttes et s'aide pour de faibles densités d'une mobilité latérale en interface qui conduit à la formation de

clusters d'IgGs en zone de contact. L'augmentation locale en IgGs colocalise avec une augmentation de la concentration en récepteurs.

La question que l'on peut se poser maintenant est celle de l'origine de ce recrutement : est-il actif, c'est à dire que c'est l'augmentation du nombre de récepteurs qui fait recruter les IgGs, ou est-ce que ce sont les IgGs qui seuls migrent dans la zone de contact, ce qui active le recrutement de récepteurs entre la goutte et le macrophage.

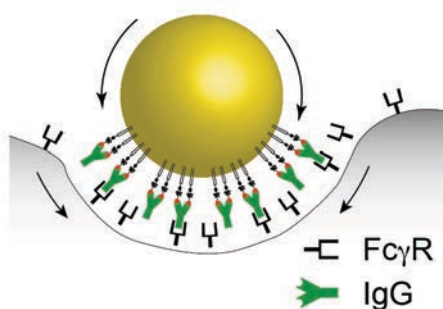


Figure 4.23. Représentation schématisée du processus de recrutement des IgGs et FcγR dans la zone de contact entre la goutte et la cellule.

Plusieurs études récentes (cf. **Chap.2, Section VI**) ont montré que lorsqu'une goutte est en contact avec une surface comme une autre goutte, du verre fonctionnalisé ou une cellule (Bourouina et al., 2011; Fattaccioli et al., 2008; Pontani et al., 2012), les protéines présentes à son interface migrent spontanément dans la zone de contact, même en l'absence de récepteurs. Cette migration peut s'expliquer par le fait que les protéines trouvent un environnement plus favorable dans cette zone plutôt qu'en dehors, et que le fait qu'elles aient un mouvement bidimensionnel les rend plus sensibles à des variations d'énergie faibles. Une confirmation dans notre cas pourrait être obtenue en travaillant avec des macrophages FcγR-K.O., mais nous n'avons pas pu réaliser ces expériences.

Par ailleurs, il a été précédemment établi que la phagocytose s'effectue selon le modèle de fermeture à glissière « *the zippering mechanism* » qui suggère que la phagocytose est contrôlée localement par l'interaction séquentielle des récepteurs avec leurs ligands (Swanson and Baer, 1995). Contrairement à ce qui devrait découler de ce mécanisme, les résultats obtenus semblent indiquer qu'une concentration seuil en zone de contact est seule suffisante à déclencher la phagocytose des gouttes. De plus, pour des densités faibles d'IgGs en surface des billes la phagocytose est nulle. Nos observations expérimentales correspondent donc plus à un modèle de type « *trigger* » qui prédit l'existence d'une réponse tout ou rien et dépend d'une valeur seuil. Ce dernier modèle semble plus compatible avec notre système.

Nous pouvons discuter de la pertinence biologique d'un mécanisme impliquant de la diffusion passive en premier lieu, suivi d'une migration active de récepteurs qui déclenche l'internalisation. En effet, Flanagan *et al.* (Flannagan et al., 2010) ont montré que le processus de reconnaissance d'une

cible par un macrophage s'effectue grâce à une exploration constante de sa surface par des mouvements de lamellipodes. Si on émet l'hypothèse que la mobilité latérale des IgGs dans la zone de contact avec le phagocyte augmente la concentration locale en IgGs et déclenche la phagocytose, le recrutement passif des protéines en zone de contact profite au mécanisme de reconnaissance. Ce phénomène contribue donc à l'efficacité de l'internalisation des gouttes. Il est éventuellement suivi par la formation d'interactions ligands-récepteurs. Ce dernier point peut être intéressant et utilisé par les macrophages pour augmenter leur capacité à internaliser des particules.

V. Autres observations pendant et après l'internalisation

V.1. Disparition de la fluorescence des gouttes au cours de l'internalisation

Lors des expériences d'internalisation que nous avons menées tout au long de ce travail, nous avons pu observer certains événements qui méritent qu'on s'y intéresse. En effet, nous avons constaté que la goutte fonctionnalisée et internalisée par le macrophage perd de sa fluorescence (cf. **Figure 4.24**).

La maturation du phagosome s'accompagne d'une acidification qui pourrait expliquer la perte de fluorescence, notamment dans le cas où les fluorophores seraient sensibles au pH, comme la fluorescéine par exemple. Dans notre cas, nous utilisons des colorants de type Alexa dont la tenue au pH dans la zone acide est très bonne, comme le montrent les informations données par le fabricant².

L'observation en temps réel du processus de phagocytose suggère un autre mécanisme que nous ne sommes pas en mesure d'explicitier à ce stade. La **Figure 4.25** montre le devenir d'une goutte après la fermeture du phagosome. Comme nous l'avons montré sur la **Figure 4.4**, les IgGs ont une distribution homogène autour de la goutte et l'actine s'est dépolymérisée. Au cours du temps, on observe une repolarisation des IgGs d'un côté de la goutte uniquement, puis la disparition de la fluorescence.

La **Figure 4.26** montre une reconstitution tridimensionnelle d'une goutte internalisée réalisée à partir de coupes confocales de cellules fixées. On remarque que les IgGs ne sont pas répartis de manière homogène autour de la goutte, et aussi l'apparition de compartiments fluorescents contenant des IgGs. Notons que ce phénomène de disparition de fluorescence n'est pas observable quand la densité en IgGs en surface des gouttes se rapproche de la monocouche.

Le phénomène observé peut avoir plusieurs sources. En effet, suite à la reconnaissance de la goutte, il y a activation de plusieurs signaux qui conduisent à son internalisation et la formation du phagosome.

² <http://www.lifetechnologies.com/fr/fr/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>

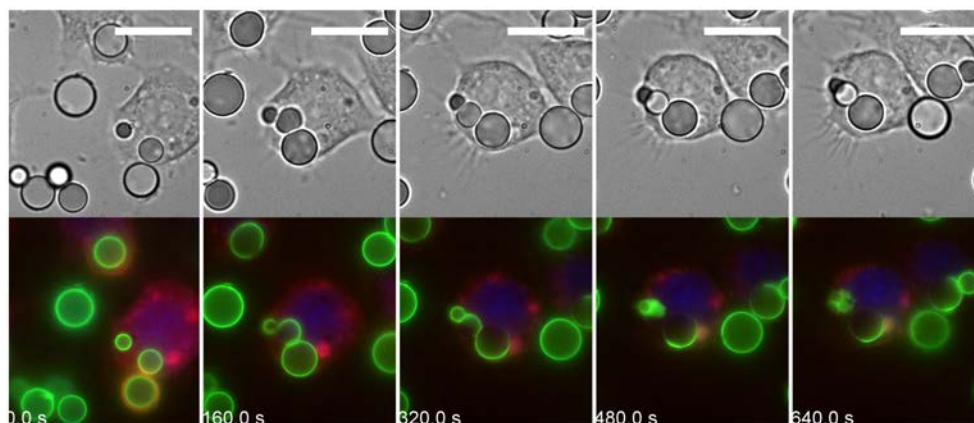


Figure 4.25. Observation en time-lapse de l'internalisation de gouttes fonctionnalisées par des macrophages à 20°C. Échelle : 15 μ m.

À ce stade du processus il existe donc deux voies : (i) une voie qui finit dans les lysosomes et qui assure la destruction : les phagosomes peuvent contenir une cellule entière, des fragments cellulaires, mais aussi une très grande variété de molécules notamment les IgGs récupérés à la surface de la goutte. Les phagosomes peuvent redistribuer rapidement leur contenu, ou au contraire se rapprocher des lysosomes, fusionner avec eux en y déversant leur contenu (Groves et al., 2008; Rosales, 2005). (ii) une voie dite de recyclage qui permet le recyclage de nombreuses molécules vers la membrane plasmique grâce à des vésicules de transport. En effet, les macrophages faisant aussi partie des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), ils ont la possibilité de capturer des antigènes par phagocytose et de les présenter au complexe CMH de classe II. Ils permettent ainsi d'activer les cellules T auxiliaires donnant une réponse immunitaire spécifique.

À ce stade de notre étude, nous n'avons pas de réponse concernant une éventuelle colocalisation des tâches fluorescentes avec le lysosome, ce qui permettrait de nous orienter parmi les deux hypothèses. Néanmoins, nous suggérons que notre système peut amener à mieux comprendre les mécanismes de recyclage et de présentation de l'antigène, voie spécifique de recyclage existant au sein des cellules du système immunitaire. Plus spécifiquement, dans le cas du lymphocyte T, la possibilité de fabriquer des cellules présentatrices d'antigène synthétiques serait une avancée importante dans le domaine de l'immunothérapie (Turtle and Riddell, 2010).

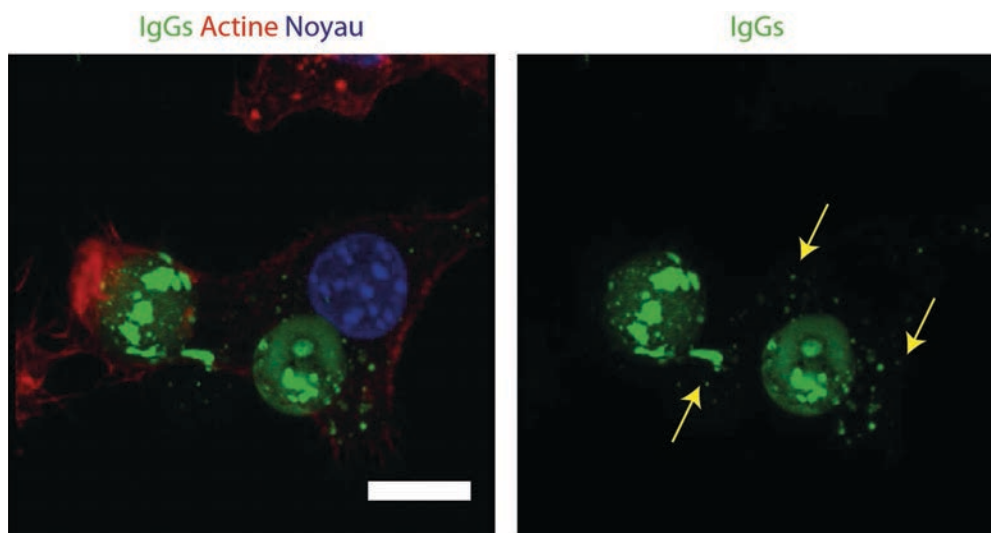


Figure 4.26. Macrophage RAW264.7 LifeAct mCherry fixé et coloré au bout de 45 minutes d'incubation. La goutte internalisée par la cellule immunitaire porte des clusters d'IgGs à la surface. Les flèches jaunes indiquent l'emplacement des points verts correspondants aux IgGs. Échelle : 10 μm .

Comme nous l'avons vu, les modes d'interaction d'une cellule T avec une APC nécessitent souvent l'existence d'une synapse immunologique qui se constitue par l'auto-organisation spatiale et temporelle d'au moins deux types de ligands et de leurs récepteurs respectifs. Au vu de ce que nous avons montré dans ce manuscrit, à la fois en terme de mobilité latérale, mais aussi d'extraction des ligands (perte de fluorescence), il serait intéressant dans un futur proche de passer à un modèle cellulaire de type lymphocyte T ou B et de fonctionnaliser les gouttes avec une paire de ligands impliqués dans les phénomènes de synapse immune.

V.2. Déformation des gouttes pendant le processus de phagocytose

Swanson *et al.* (Swanson et al., 1999) ont montré que la phagocytose d'érythrocytes s'accompagne d'une déformation de leur membrane, conséquence d'une activité contractile de la zone de fermeture du phagosome (cf. **Figure 4.27a**). Dans le cas où un globule rouge seul est internalisé, la force de constriction lui donne une forme ovoïde, alors que quand un globule rouge est partagé entre deux macrophages, les deux cellules le serrent en son milieu car aucune ne peut l'internaliser.

Nous voyons sur la **Figure 4.4** que la goutte en cours d'internalisation se déforme légèrement de manière similaire à ce qui avait été publié par Swanson *et al.* Les gouttes d'émulsions que nous avons fabriquées sont déformables et leur tension interfaciale est de l'ordre de $5 - 10 \text{ mN.m}^{-1}$. Cette valeur est 2 – 5 fois plus grande que la tension de surface mesurée par Fischer-Friedrich *et al.* pour

des cellules Hela en condition de confinement (Fischer-Friedrich et al., 2014). Les macrophages sont capables de déformer légèrement des gouttes liquides plus rigides.

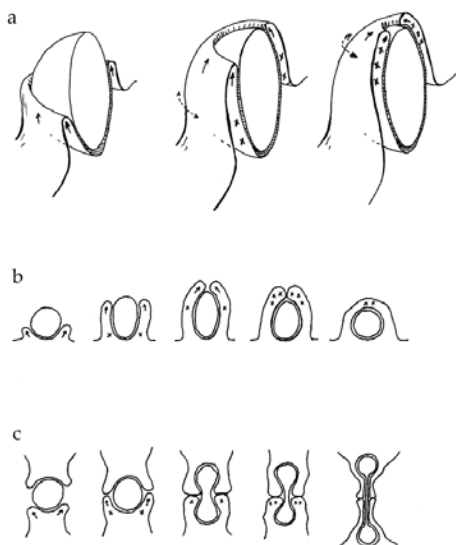


Figure 4.27. (a) Un modèle de phagocytose par les macrophages. L'ingestion se caractérise par l'extension du pseudopodes autour de la cible, suivi d'une constriction de la zone de fermeture du phagosome. L'existence de cette constriction latérale doit (b) déformer une goutte seule ou (c) dans le cas où une cible est partagée entre deux macrophages, on observe la constriction de la cible en son milieu (Swanson et al., 1999).

Dans le cas où une goutte se partage entre deux macrophages, comme sur la **Figure 4.28**, on remarque que les déformations sont visibles et bien plus importantes que ce que l'on observe sur la **Figure 4.4**. Ces déformations peuvent nous conduire à mesurer la force exercée par la cellule sur la goutte lors de sa phagocytose mais aussi lors du mouvement de la cellule dans son environnement.

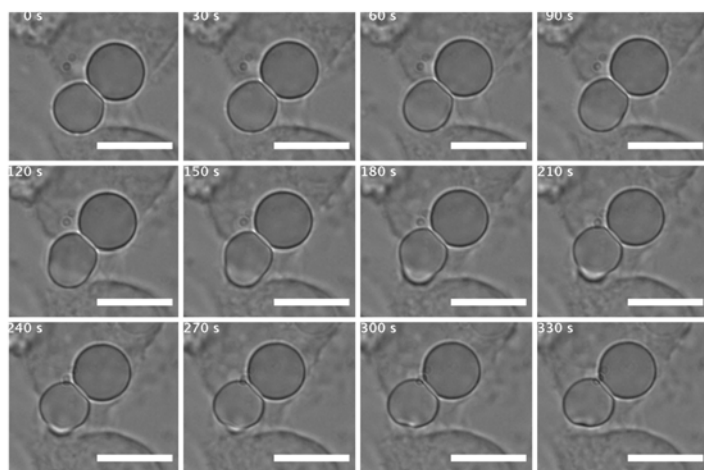


Figure 4.28. Images en microscopie à transmission d'une goutte d'émulsion fonctionnalisée avec des IgGs sur laquelle deux macrophages s'activent. Échelle : 10 µm.

Les gouttelettes d'émulsions que nous avons fabriquées ont la particularité d'être déformables quand elles sont soumises à des forces extérieures. En comparant aux expériences de Swanson *et al.*, il est difficile de conclure à une activité contractile latérale ou une tension dans la direction d'internalisation. Toutefois, nos expériences, bien que très descriptives, montrent que l'on peut observer des déformations mesurables dans le contexte qui nous intéresse.

Ainsi les gouttes d'émulsions ayant une tension superficielle bien contrôlée peuvent aussi être utilisées en tant que capteurs de force et aider à comprendre certains phénomènes biologiques.

Conclusion sur la phagocytose des gouttes d'émulsions fonctionnalisées

L'étude de la phagocytose des gouttes d'émulsions que nous avons conçues a montré que les macrophages ont été parfaitement capables de les reconnaître et de les internaliser de manière spécifique. Un facteur taille intervient aussi puisque nous avons démontré que pour de petites tailles la phagocytose a lieu même en absence des IgGs alors que pour des gouttes de 7 μm de diamètre une fonctionnalisation de surface est nécessaire pour induire leur internalisation. Par ailleurs, l'excellent contrôle de la fonctionnalisation de surface a permis de mettre en évidence l'influence de la densité d'IgGs sur l'efficacité de l'internalisation. La réponse phagocytaire est sensible à ce paramètre et conduit à une relation dose-réponse qui donne accès à la valeur de la dose seuil nécessaire à activer le processus de phagocytose et déclencher l'internalisation. En outre, la densité d'IgGs à la surface des gouttes permet non seulement de stimuler l'internalisation des gouttes par macrophages mais aussi elle permet d'augmenter la valeur moyenne du nombre de gouttes qu'ils sont capables de phagocyter. Pour compléter notre étude, nous avons étudié la phagocytose de billes de polystyrène dans les mêmes conditions. Nous avons démontré que la densité d'IgGs dans la gamme 10^4 - 10^5 n'a aucune influence sur l'efficacité de l'internalisation des gouttes d'émulsions qui reste élevée. Au contraire, la densité d'opsonisation influence la phagocytose des billes de polystyrène. Une observation en microscopie en transmission et de fluorescence a permis de mettre en évidence le rôle de la mobilité latérale dans cette différence. Ainsi, pour de faibles densités d'IgGs l'internalisation des gouttes d'émulsions s'accompagne d'un recrutement des protéines et la formation de *clusters* en zone de contact. Du fait de leur rigidité, les billes en polystyrène fonctionnalisées avec des IgGs incapables de diffuser en surface ne permettent pas cette observation. Ainsi, notre hypothèse est que la mobilité latérale des IgGs permet l'augmentation de la concentration en protéines dans la zone de contact et semble aider à franchir un seuil qui serait susceptible de déclencher la phagocytose

Conclusion et perspectives

Ce mémoire explore le fort potentiel applicatif des émulsions pour l'étude d'un processus clé du système immunitaire : la phagocytose. Le travail de thèse a consisté dans un premier temps à réaliser des gouttes d'émulsions fonctionnalisées avec des IgGs, libres de diffuser à leurs surfaces. Puis j'ai étudié leur adhésion et phagocytose par des macrophages, notamment la lignée de leukemia murine Raw... Ce travail montre que les gouttes d'émulsions ainsi préparées constituent de nouvelles cibles synthétiques possédant des surfaces modèles originales pour l'étude du processus de la phagocytose.

J'ai consacré une grande partie de ce travail à la caractérisation de ces objets et la mise au point d'une méthode de mesure de la densité exacte des IgGs greffées à la surface des gouttes. En se basant sur des notions clés de formulation nous avons conçu des émulsions monodisperses de tailles moyenne de l'ordre de 7 μm . Ces gouttes sont stables et présentent des biotines à leurs surfaces pour permettre de fixer les immunoglobulines anti-biotines. La densité d'IgGs dépend alors uniquement de la concentration en biotine et est spécifique de la présence de ces biotines à la surface des gouttes. L'utilisation de gouttes à différentes concentrations initiales en biotine a ainsi permis de faire varier la quantité d'IgGs et d'obtenir des surfaces allant d'une densité faible en protéines à des surfaces presque totalement recouvertes d'une monocouche stable avec une répartition homogène. Ces densités sont mesurées de façon quantitative, mesure nécessaire à la compréhension de l'influence de la quantité d'IgGs sur le processus biologique de phagocytose.

Une fois ces objets obtenus, j'ai étudié l'influence de leurs caractéristiques sur le processus de phagocytose et les interactions entre gouttes et cellules. Pour cela des gouttes de différentes densités de surface ont été exposées aux macrophages. Parallèlement des billes de polystyrène fonctionnalisées avec différentes densités d'IgGs en surface, comparables aux valeurs utilisées avec les gouttes, ont aussi été présentées aux macrophages. L'objectif étant alors d'évaluer dans quelles mesures les caractéristiques physico-chimiques et la mobilité latérale des antigènes présents à la surface des particules cibles influencent leurs interactions avec les macrophages. Cette étude a ainsi permis d'obtenir des résultats intéressants et prometteurs pour des applications biologiques futures.

Le contrôle quantitatif de la densité d'opsonisation permet de déterminer une concentration seuil induisant une réponse phagocytaire

Les gouttes issues de la cellule de Couette ont un diamètre moyen de l'ordre de 7 μm de diamètre et sont fabriquées de manière reproductible. Leurs surfaces ont été fonctionnalisées avec des densités bien contrôlées d'IgGs. En effet, grâce à la cytométrie de flux nous avons été capables de convertir de façon quantitative la fluorescence mesurée pour les gouttes en un nombre de protéines par goutte. Nous

avons vu qu'on pouvait passer de surfaces très diluées en protéines à des surfaces complètement recouvertes formant une monocouche stable avec une répartition homogène d'IgGs anti-biotines fluorescents. Ces caractérisations quantitatives peuvent s'appliquer à d'autres objets fonctionnalisés avec une entité fluorescente et permettent d'avoir des études plus fines sur l'influence de la densité de fonctionnalisation.

Le nombre d'IgGs à la surface des gouttes est un paramètre important qui influence la phagocytose. La réponse phagocytaire est sensible à ce paramètre et conduit à une relation dose-réponse en forme de *S*. Cette relation donne accès à une quantité minimale d'IgGs nécessaire à induire l'internalisation des gouttes de l'ordre de 3.10^4 IgGs par goutte et décrit ainsi l'efficacité de notre système. En outre, la densité d'IgGs à la surface des gouttes joue un rôle sur : (i) la stimulation des macrophages pour induire l'internalisation des gouttes, (ii) le nombre de gouttes que les macrophages sont capables de phagocyter qui croît avec la densité d'IgGs en surface.

La mobilité latérale des immunoglobulines à la surface des gouttes est un paramètre clé pour la compréhension du mécanisme de phagocytose

La mobilité latérale de IgGs en surface des gouttes joue un rôle important dans la reconnaissance de l'objet cible et sa phagocytose par les macrophages. Plus précisément, j'ai constaté que pour des densités faibles en surface des gouttes, les IgGs sont recrutées dans la zone de contact. Initialement larges et dispersés, ces *clusters* se resserrent en l'espace de quelques minutes pour former un *cluster* plus dense d'IgGs qui colocalisent avec les récepteurs FcγR présents à la surface du macrophage. Notre hypothèse est que les IgGs hautement dynamiques et latéralement mobiles au cours de la phase de reconnaissance induisent une augmentation de la concentration locale en zone de contact et permettent de franchir une dose seuil nécessaire à l'activation du macrophage et la phagocytose de l'objet cible. Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus avec des billes en polystyrène avec les mêmes densités d'IgGs, alors incapables de diffuser en surface qui ne permettent pas de franchir ce seuil et ne sont pas phagocytées aussi efficacement.

Très souvent, les interactions entre deux protéines (ici IgGs/FcγR) dépendent non seulement de leur affinité et de la cinétique d'association mais aussi de la concentration et de la mobilité de la protéine, particulièrement si celle-ci est transmembranaire (Subramanian et al., 2006). Il a été démontré par exemple que les contraintes de mobilité des protéines pendant la synapse immunologique entre les cellules T et les cellules présentatrices d'antigènes influencent fortement la cascade de signalisation (Mossman et al., 2005). En faisant un parallèle entre ces deux processus biologique, on peut faire

l'hypothèse que des liens étroits sont établis entre la cellule et la goutte cible à phagocyter et doivent communiquer des informations nécessaires au déclenchement de la réponse immunitaire.

Par ailleurs, il a été précédemment proposé que la liaison des cibles opsonisées est obtenue par les interactions progressives des IgGs avec les récepteurs FcγR selon le modèle de fermeture à glissière, « *the zippering mechanism* » (Swanson and Baer, 1995). Cependant, mes résultats semblent indiquer qu'une concentration bien déterminée en zone de contact est seule suffisante à déclencher la phagocytose des gouttes. Pour des densités faibles d'IgGs en surface des billes la phagocytose est nulle. Cette observation est contraire aux réponses segmentaires prédites par le modèle de « *zippering* » et indique que la signalisation complète pour la phagocytose nécessite la coordination de plusieurs récepteurs en zone de contact. Nous pouvons donc dire qu'un mécanisme de type « *trigger* » qui est une alternative au « *zipper* » est plus compatible avec notre système. Ce modèle qui prédit l'existence d'une réponse tout ou rien et dépend d'une valeur seuil correspond plus à mes observations expérimentales. Il n'est pas exclu que les deux modèles participent conjointement à la phagocytose *in vivo*.

Goutte opsonisée : un outil pour la compréhension du processus de phagocytose

Les analyses microscopiques que nous avons réalisées ont montré que l'adhésion de la goutte à la surface du macrophage est accompagnée de la formation de *clusters* d'IgGs dans la zone de contact, ce qui augmente la concentration locale d'opsonines et déclenche finalement la phagocytose. Il serait intéressant d'étudier l'influence de ce *clustering* sur la cascade de signalisation qui se déclenche par la suite lors de la phagocytose de grands objets tels que les cellules tumorales ou apoptotiques. Le matériau que nous avons conçu pourrait donc constituer un nouvel outil pour répondre à ce type de questions biologiques.

Par ailleurs, la phagocytose étant un processus en trois étapes, il est intéressant de connaître le devenir des gouttes internalisées. Les cellules sont-elles capables de les dégrader et de les rejeter ? Si c'est le cas alors combien de temps mettent les cellules à excréter totalement, si elles en sont capables, les gouttes ou leur produit de dissolution ? Il serait intéressant de suivre cette cinétique sur un temps plus long, par exemple sur 24 h.

Par ailleurs, nous avons vu qu'une fois à l'intérieur du macrophage, le signal de fluorescence de la goutte disparaît. Cette perte est généralement suivie par l'apparition d'un signal correspondant aux IgGs dans les compartiments intracellulaires (endosomes de recyclage ?) ainsi qu'en surface du macrophage suggérant un éventuel recyclage des IgGs du phagosome vers la membrane plasmique. Les gouttes peuvent donc constituer un outil permettant de suivre en cinétique les voies de transport

intracellulaires des IgGs et d'étudier leur recyclage.

Ciblage spécifique pour formulation galénique (macrophages comme cibles thérapeutiques)

L'administration des principes actifs vers un tissu cible est un défi majeur à relever en matière de *Drug Delivery*. Il faut donc fabriquer des vecteurs biocompatibles, capables d'encapsuler et de transporter les molécules d'intérêt, et d'avoir une forte affinité pour les tissus ciblés. Ajouté à cela, le vecteur idéal doit libérer le principe actif au bon moment. Dans ce contexte, les gouttes d'émulsions que nous avons fabriquées et fonctionnalisées avec des IgGs sont d'excellentes candidates pour une utilisation en tant que vecteurs de molécules lipophiles ciblant les différents types de macrophages. Pour atteindre l'efficacité maximale d'internalisation, nous n'avons besoin que de $2 \cdot 10^4$ IgGs/goutte ce qui représente un ordre de grandeur d'opsonines en moins que dans le cas des billes de polystyrène. Les gouttes présentent donc un réel avantage de ce point de vue. Les IgGs, en tant que marqueurs de reconnaissance latéralement mobiles à l'interface, vont induire l'internalisation efficace de la goutte par les macrophages pour permettre ensuite la libération intracellulaire de principes actifs.

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'accéder à des concentrations seuils d'opsonines permettant la phagocytose et de soulever de nouvelles questions, notamment sur l'influence de la mobilité latérale des protéines en surface des objets cibles des macrophages. Nos gouttes d'émulsions fonctionnalisées permettront d'aborder de nouvelles questions biologiques concernant non seulement les interactions objets cibles/macrophages mais plus généralement pour approfondir les mécanismes moléculaires et mécaniques qui gouvernent les interactions cellule-cellule et cellules-environnement.

Annexes : Matériels et méthodes

I. Émulsions.....	149
I.1. Protocole de fabrication des gouttes d'émulsions fonctionnalisables	149
I.2. Protocole de fonctionnalisation des gouttes d'émulsions avec 2.10^4 IgGs/goutte	149
I.3. Protocole de fonctionnalisation des gouttes d'émulsions avec des concentrations croissantes d'IgGs anti-biotines	150
I.4. Protocole de fonctionnalisation des billes PS en deux étapes	150
I.5. Protocole de fonctionnalisation des billes de polystyrène avec les IgGs Lapin anti-chèvre FITC 151	
I.6. Préparation de la solution tampon PB/Tween 20 à 0,2% _{m/m}	152
I.7. Routine Image J de mesure et de comptage des gouttes d'émulsions	152
II. Étude de la phagocytose	153
II.1. Dispositif expérimental, Suivi de la phagocytose	153
II.2. Culture cellulaire	154
II.3. Protocole de fixation des cellules.....	154
II.4. Protocole d'immunolocalisation	154
II.5. Observation en microscopie confocale	155
II.6. Statistiques	155
II.7. Données sur la lignée cellulaire RAW 264.7 Lifeact-mCherry	156

I. Émulsions

I.1. Protocole de fabrication des gouttes d'émulsions fonctionnalisables

1. Dissoudre un volume V de phospholipides biotinylés DSPE-PEG₂₀₀₀-Biotin (Avanti Lipids, Ref : 880129C) à 10 mg.mL^{-1} dans du chloroforme dans 20 mL d'huile de soja (Sigma-Aldrich, Ref : S7381) pour avoir la concentration désirée :

Volume (μL)	Concentration dans l'huile (mg.mL^{-1})
300	0,15
100	0,05
60	0,03
30	0,015

2. Evaporer le chloroforme pour obtenir l'huile avec les phospholipides
3. Prélever 15 mL de l'huile ainsi préparée
4. Mélanger 2,5 mL d'alginate (Sigma-Aldrich Ref : 180947) à 2% et 2,5 mL de PE/F68 (Sigma-Aldrich Ref : 15759) à 30%_{m/m} (phase aqueuse)
5. Ajouter goutte à goutte l'huile de soja et émulsifier à la main jusqu'à obtenir une crème d'émulsion
6. Homogénéiser la distribution de taille par passage en cellule de couette (200 rpm, $e = 100 \mu\text{m}$)
7. Diluer l'émulsion en sortie (75%) de façon à avoir une fraction en huile de 5% et une fraction en tensioactifs de 1%
8. Introduire l'émulsion diluée dans une ampoule à décanter et laisser 24 h à l'abri de la lumière.
9. Eliminer le sous-nageant
10. Recommencer l'étape de dilution (7) jusqu'à ce que le sous-nageant devienne limpide
11. Récupérer l'émulsion dans un récipient en verre et la stocker à l'abri de la lumière et à 12°C .

I.2. Protocole de fonctionnalisation des gouttes d'émulsions avec 2.10^4 IgGs/goutte

1. Prélever 16 μL de l'émulsion stock à $0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$
2. Ajouter 184 μL de tampon phosphate/Tween20 à 0,2%_{m/m}
3. Centrifuger à 2000 G pendant 30 s
4. Prélever le sous-nageant

5. Répéter les étapes 2 à 4 deux fois et ramener le volume à 200 μL
6. Prélever 10 μL de l'émulsion lavée
7. Ajouter 5 μL d'IgGs (Alexa Fluor 488-conjugated IgG Fraction Monoclonal Mouse Anti-Biotin, Jackson ImmunoResearch Ref : 200-542-211) à 0,85 mg.mL^{-1} (tube fraîchement décongelé).
8. Ajouter 25 μL de tampon PB/Tween20 à 0,2%_{m/m}
9. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante sur l'agitateur rotatif et à l'abri de la lumière.
10. Ajouter 160 μL de tampon PB/Tween20 à 0,2%_{m/m}
11. Centrifuger à 2000 G pendant 30 s
12. Prélever le sous-nageant
13. Répéter les étapes 10 à 12 deux fois en prélevant au dernier lavage 190 μL de sous-nageant.
14. Ajouter 30 μL de DMEM (Gibco Ref: 31053, free phenol red) pour les études de phagocytose

I.3. Protocole de fonctionnalisation des gouttes d'émulsions avec des concentrations croissantes d'IgGs anti-biotines

1. Prélever 16 μL de l'émulsion biotinylée préparée
2. Ajouter 184 μL de tampon phosphate/Tween20 à 0,2%_{m/m}
3. Centrifuger à 2000 G pendant 30 s
4. Prélever le sous-nageant
5. Répéter les étapes 2 à 4 deux fois et ramener le volume à 200 μL
6. Prélever 10 μL de l'émulsion lavée
7. Ajouter entre 0.5 et 30 μL d'IgGs (volume adapté selon la densité finale recherchée), (Alexa Fluor 488-conjugated IgG Fraction Monoclonal Mouse Anti-Biotin, Jackson ImmunoResearch Ref : 200-542-211) à 0,85 mg.mL^{-1} (tube fraîchement décongelé)
8. Ajouter respectivement entre 29,5 μL et 0 μL de tampon PB/Tween20 à 0,2%_{m/m}
9. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante sur l'agitateur rotatif et à l'abri de la lumière
10. Ajouter 160 μL de tampon PB/Tween20 à 0,2%_{m/m}
11. Centrifuger à 2000 G pendant 30 s
12. Prélever le sous-nageant
13. Répéter les étapes 10 à 12 deux fois en prélevant au dernier lavage 190 μL de sous-nageant.
14. Ajouter 30 μL de tampon PB/Tween 20 à 0,2%_{m/m} ou de DMEM pour les études de phagocytose

I.4. Protocole de fonctionnalisation des billes PS en deux étapes

1. Prélever 10 μL de la suspension de billes (Polysciences, Polybead® Microspheres 6.00 μm) à $2 \cdot 10^8$

particule/mL

2. Ajouter 190 μL de tampon PBS (DPBS-1X, Sigma-Aldrich)
3. Centrifuger à 2000 G pendant 30 s
4. Prélever le sur-nageant
5. Répéter les étapes 2 à 4 deux fois et ramener à un volume final de 200 μL
6. Prélever 10 μL de la suspension de billes auxquels on ajoute 20 μL de BSA-biotine (Sigma Aldrich A8549-10MG) à une concentration de 10 mg.mL^{-1}
7. Ajouter 20 μL de tampon PBS
8. Laisser agir pendant une heure à température ambiante sur l'agitateur rotatif et à l'abri de la lumière
9. Ajouter 150 μL de tampon PBS
10. Centrifuger à 2000 G pendant 30 s
11. Prélever 150 μL de sur-nageant
12. Répéter les étapes 9 à 11 en prélevant au dernier lavage 190 μL de sur-nageant
13. Ajouter 30 μL de DMEM (Gibco 31053, free phenol red)

I.5. Protocole de fonctionnalisation des billes de polystyrène avec les IgGs Lapin anti-chèvre FITC

1. Prélever 10 μL de la suspension de billes à $2 \cdot 10^8$ particule/mL
2. Ajouter 190 μL de tampon PBS (DPBS-1X, Sigma-Aldrich)
3. Centrifuger à 2000 G pendant 30 s
4. Prélever le sur-nageant
5. Répéter les étapes 2 à 4 deux fois et ramener à un volume final de 200 μL
6. Prélever 5 μL de la suspension de billes auxquels on ajoute 30 μL d'IgGs (lapin anti-chèvre FITC, Sigma Aldrich F7367) à une concentration de 4 mg.mL^{-1}
7. Laisser agir pendant une heure à température ambiante sur l'agitateur rotatif et à l'abri de la lumière
8. Ajouter 150 μL de tampon PBS
9. Centrifuger à 2000 G pendant 30 s
10. Prélever 150 μL de sur-nageant
11. Répéter les étapes 9 à 11 en prélevant au dernier lavage 190 μL de sur-nageant
12. Selon la quantité de billes souhaitée on peut mélanger deux tubes (pour avoir 2 billes/cellule) et ajouter 30 μL de DMEM (Gibco 31053, free phenol red).

I.6. Préparation de la solution tampon PB/Tween 20 à 0,2%_{m/m}

Pour préparer 200 mL d'une solution tampon phosphate à pH égal à 7 et à force ionique égale à 20 mM il faut :

1. Dissoudre 0,284 g de NaH_2PO_4 (MW = 142 g.mol⁻¹) dans approximativement 180 mL d'eau distillée.
2. Titrer jusqu'à pH = 7,02
3. Ajouter de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 200 mL.

Pour avoir une solution tampon PB/Tween20 à 0,2%_{m/m} il faut :

1. Préparer une solution mère de Tween20 à 20%_{m/m}
2. Diluer 100 μL de la solution mère de Tween20 dans 10 mL de la solution. Cette solution est utilisée fraîche.

I.7. Routine Image J de mesure et de comptage des gouttes d'émulsions

```

text_number=0; //number of text data in the directory
image_number=0; //Nombre d'images ouvertes
chamber_height=100 //microns - Height of the measurement chamber

dir = getDirectory("Choose a Directory "); //Open the directory with
the images
list = getFileList(dir);
run("Set Measurements...", "area centroid center bounding fit shape
display redirect=None decimal=3");

object_number=newArray(list.length); //Variable du nombre d'objets

if (getVersion>="1.40e")
    setOption("display labels", true);
//setBatchMode(true);

// Mesure du nombre d'objets dans chaque image.
// Recuperation du nombre d'images en tout (directory = images +
texte)
for (i=0; i<list.length; i++) {
    path = dir+list[i];
    showProgress(i, list.length);
    if (endsWith(path, ".txt")) {
    }
    else {
        if (!endsWith(path, "/")) open(path);
        if (nImages>=1) {
            height=getHeight;
            width=getWidth;
            run("Make Binary");
            run("Fill Holes");
            run("Watershed");
            run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity
circularity=0.00-1.00 show=[Overlay Masks] clear in_situ");

```

```

        object_number[image_number]=nResults;
        image_number=image_number+1;
    }
}

//Calcul du nombre moyen d'objets dans le champ de la camera
object_number=Array.trim(object_number,image_number);
Array.getStatistics(object_number,min,max,mean_number,stdev_number);
error_number=stdev_number/sqrt(image_number);
print(mean_number,stdev_number, error_number);

//Calcul du volume d'observation et de la densite
volume=chamber_height*(height)*(width); // volume en
volume=volume*1e-12;
density=round(mean_number/volume);
error_density=round(error_number/volume);
print("Particle Density = "+density+" +/- "+error_density+" per
px^2*um*1e-12");
//Dialog.create("Particle Density");
//Dialog.addNumber("Density per mL", density);
//Dialog.addNumber("Std Error", error_density);
//Dialog.show();
close()

```

II. Étude de la phagocytose

II.1. Dispositif expérimental, Suivi de la phagocytose

Pour pouvoir suivre la phagocytose des gouttes fonctionnalisées par les macrophages, nous avons construit des chambres d'observation à partir desquelles il est possible de suivre l'internalisation au cours du temps par microscopie confocale et de fluorescence. Le choix des cellules s'est porté sur une lignée de macrophages de souris RAW 264.7 Lifeact_mcherry, transfectées avec un lentivirus contenant un vecteur Lifeact_mcherry, c'est un plasmide qui code pour un peptide fluorescent et qui se fixe sur l'actine sans modifier sa dynamique (souris leucémiques, lignée monocyttaire de cellules, macrophages). Le Lifeact_mCherry marque en fluorescence dans le rouge l'actine polymérisée. Son maximum d'excitation est à 587 nm et son maximum d'émission est à 610 nm.

II.2. Culture cellulaire

La lignée cellulaire de macrophages murins de souris RAW264.7 Lifeact_mCherry provient de l'équipe de recherche « Biologie cellulaire et physiologie osseuse » sous la direction de Pierre JURDIC, au sein du laboratoire IGFL, ENS Lyon.

Il s'agit de cellules adhérentes cultivées à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂ dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé (Life Technologies, Ref 10500056), 1 gL⁻¹ D-glucose, 1,1 gL⁻¹ de pyruvate de sodium et 1% de pénicilline-streptomycine (Life Technologies, Ref 15140122). L'expression de la protéine fluorescente Lifeact_mCherry a été maintenue grâce à l'ajout intermittent de 4 µg.mL⁻¹ de puromycine (Life Technologies) au milieu de culture.

Lors de chaque passage, les cellules décollées après un traitement avec de la trypsine sont remises en suspension dans des plaques de culture 6 puits. Les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre (20 x 20 mm, VWR) stérilisées (lavage à l'acétone puis éthanol et séchage) et introduites dans chaque puit de la plaque de culture 24 heures avant les études de phagocytose pour adhérer aux lamelles. Les expériences ont été réalisées avec des densités cellulaires proches de 10⁶ cellules par lamelle de verre qui correspondent à environ 60% de confluence.

II.3. Protocole de fixation des cellules

1. Aspirer le milieu où se trouvent les lamelles avec des cellules et laver trois fois avec le DPBS-1X
2. Fixer les lamelles dans une solution de PFA 4% dans le DPBS-1X, pH 7,2/7,4 pendant 20 minutes à température ambiante
3. Laver 3 à 5 fois dans du DPBS-1X
4. Traiter pendant 15 minutes dans une solution de DPBS-1X_Triton 0,1% (Laver 5 fois
5. Laver 3 à 5 fois dans du DPBS-1X
6. Ajouter la phalloïdine et le DAPI dans du DPBS-1X pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante
7. Laver 3 à 5 fois dans du DPBS-1X

II.4. Protocole d'immunolocalisation

a) Préparation des cellules

1. Aspirer le milieu où se trouvent les lamelles avec des cellules et laver trois fois avec le DPBS-1X
2. Fixer les lamelles dans une solution de PFA 4% dans le DPBS-1X, pH 7,2/7,4 pendant 20 minutes

3. Laver 3 à 5 fois dans du DPBS-1X
4. Traiter pendant 20 minutes dans une solution de DPBS-1X_NH₄Cl 50 mM (Cette étape permet de neutraliser le PFA résiduel, particulièrement quand des anticorps primaires utilisés dans les étapes suivantes peuvent donner des signaux non spécifiques)
5. Laver 5 fois dans DPBS-1X
 - b) Immunolocalisation
 1. Ajouter une solution de blocage : DPBS-1X_BSA à 1% pendant 30 minutes à température ambiante
 2. Ajouter l'anticorps primaire anti CD16/CD32 dans une solution DPBS-1X_BSA à 1% (Rat Anti-Mouse CD16/CD32 mAb 2.4G2, à une concentration de 1 µg.mL⁻¹, BD Pharmingen™ Biosciences, New Jersey, USA) et incuber toute la nuit à 4°C.
 3. Laver 3 à 5 fois dans du DPBS-1X
 4. Ajouter l'anticorps secondaire dans une solution DPBS-1X_BSA à 1% (Alexa Fluor® 647 Goat Anti-Rat IgG à concentration de 5 µg.mL⁻¹, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), le DAPI et la phalloïdine (Atto 555-phalloidin, Sigma Aldrich) pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière.
 5. Laver 5 fois dans DPBS-1X
 6. Monter les lamelles dans du Fluorshield (sigma Aldrich) ou autre agent de montage
 7. Seller les lamelles avec du vernis et laisser environ 10 minutes à température ambiante
 8. Imager au microscope.

II.5. Observation en microscopie confocale

Nous avons utilisé le microscope confocal Zeiss LSM 710. Pour exciter le DAPI, nous avons utilisé le laser diode à 405 nm. Pour Alexa Fluor® 488, nous avons utilisé le laser argon à 488 nm. Pour Alexa Fluor® 647 et Atto-555 nous avons utilisé le laser hélium à respectivement 633 nm et 543 nm. Les spectres d'émission sont détectés entre 430 et 540 nm pour le DAPI, 485-540 pour Alexa Fluor® 488, 550-580 nm pour Atto-555 et entre 640 et 790 nm pour Alexa Fluor® 647. L'acquisition est réalisée en mode « *channel-separated* » avec une moyenne sur 8 lignes d'images.

II.6. Statistiques

Les distributions des données ont été évaluées en utilisant le test de normalité d'Agostino & Pearson omnibus. Toutes les données suivent des distributions non gaussiennes. La signification statistique a été évaluée par le test de *Wilcoxon signé* qui est un test non paramétrique permettant

de comparer deux échantillons appariés et les tests *ANOVA* et *Dunn's* pour les comparaisons multiples non paramétriques en utilisant le logiciel Prism. Les résultats avec $P < 0,01$ sont considérés comme étant statistiquement significatifs : *** indique $p < 0,001$, ** indique $p < 0,01$ et NS indique les résultats non significatifs.

II.7. Données sur la lignée cellulaire RAW 264.7 Lifeact-mCherry

La lignée nous a été gracieusement fournie par P. Jurdic(IGFL, Lyon). Ci-dessous, vous trouvez la documentation qui était fournie avec les cellules.

RAW infecté avec un lentivirus contenant un vecteur LifeAct-mcherry

Infection: 20MOI - un nuit - lignée RAW 264,7 (mouse leukaemia monocyte macrophage cell line) Tumeur induite chez une souris male par une injection intrapéritonéale du virus Albeson leukemia.

Sélection: puromycine 4µg/mL

Population multi-clonale - garder la pression de l'antibiotique.

Les cellules sont actuellement au passage 10. Préparer un stock de cellules car la différenciation est moins efficace lorsque le nombre de passage est trop important (environ p25)

Milieu - références:

- Alpha-MEM, peni/strepto 1%, glutamine 1%, FBS 10% (pas décomplementé)
- alpha-MEM invitrogen ref 22561-021 -deso -ribo
- Cytokine: rm RANKL - ref:462-tec-010 (10µg)
- DMEM invitrogen



Ex: 587nm
Em: 610nm

Entretien des RAW-lifeAct-mcherry

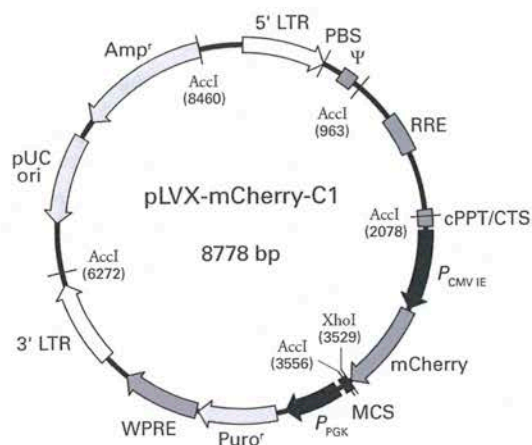
- Milieu **DMEM** - peni/strepto 1%, glutamine 1%, FBS 10% (pas décomplementé)
- Décollement:
 - Changer le milieu
 - Flush les cellules dans le nouveau milieu
 - Centrifugation: 1500g - 20° - 2 min
 - Resuspendre avec 1 ml de milieu + puromycine - comptage - Ensemencer 500 000 cellules pour une p100 dans du milieu + puromycine 4µg/mL
 - Repiquage une fois par semaine

Différenciation des RAW-lifeAct-mcherry

- Décollement et resuspendre avec Milieu **MEM-alpha** - peni/strepto 1%, glutamine 1%, FBS 10% + RANKL: 20 ng/ml
- Observation: Différenciation en 3 à 4 jours

pLVX-mCherry-C1 Vector Information

PT5091-5
Catalog No. 632561



	<u>End of mCherry</u>		<u>XhoI</u>		<u>EcoRI</u>
3506	CTG TAC AAG TCC GGA CTC AGA TCT CGA GCT CAA GCT TCG AAT TCT				
		<u>Apal</u>	<u>BamHI</u>		
		<u>SmaI/XmaI</u>		<u>Stop</u>	<u>Stop</u>
3551	GCA GTC GAC GGT ACC GCG GGC CCG GGA TCC ACC GGA TCT AGA TAA				
	<u>Stop</u>				
3596	CTG ATC				

pLVX-mCherry-C1 Vector Map and Multiple Cloning Site (MCS).

Description

pLVX-mCherry-C1 is an HIV-1-based, lentiviral expression vector that allows you to express your gene of interest fused to mCherry, a mutant fluorescent protein derived from the tetrameric *Discosoma sp.* red fluorescent protein, DsRed (1). The excitation and emission maxima of the native mCherry protein are 587 nm and 610 nm, respectively. Genes cloned into the multiple cloning site (MCS), located at the C-terminal end of the mCherry coding sequence, are expressed as C-terminal mCherry fusion proteins. Expression of the fusion protein is driven by the constitutively active human cytomegalovirus immediate early promoter ($P_{CMV IE}$), located just upstream of the mCherry coding sequence. Lentiviral particles derived from the vector allow the expression of mCherry fusion proteins in virtually any cell type, including primary cells. The unmodified vector expresses mCherry, and may be used to produce marker virus to optimize infection protocols.

pLVX-mCherry-C1 contains all of the viral processing elements necessary for the production of replication-incompetent lentivirus, as well as elements to improve viral titer, transgene expression, and overall vector function. The woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) promotes RNA processing events and enhances nuclear export of viral and transgene RNA (2), leading to increased viral titers from packaging cells, and enhanced expression of your gene of interest in target cells. In addition, the vector includes a Rev-response element (RRE), which further increases viral titers by enhancing the transport of unspliced viral RNA out of the nucleus (3). Finally, pLVX-mCherry-C1 also contains a central polypurine tract/central termination sequence element (cPPT/CTS). During target cell infection, this element creates a central DNA flap that increases nuclear import of the viral genome, resulting in improved vector integration and more efficient transduction (4).

(PR9X3368; published 30 October 2009)



Clontech

United States/Canada
800.662.2566

Asia Pacific
+1.650.919.7300

Europe
+33.(0)1.3904.6880

Japan
+81.(0)77.543.6116

Clontech Laboratories, Inc.
A Takara Bio Company
1290 Terra Bella Ave.
Mountain View, CA 94043
Technical Support (US)
E-mail: tech@clontech.com
www.clontech.com

pLVX-mCherry-C1

Vector Information

References

1. Shaner, N.C. *et al.* (2004) *Nat. Biotechnol.* **22**(12):1567–1572.
2. Zufferey, R. *et al.* (1999) *J. Virol.* **73**(4):2886–2892.
3. Cochrane, A. W. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**(3):1198–1202.
4. Zennou, V. *et al.* (2000) *Cell* **101**(2):173–185.
5. Wu, X. *et al.* (2000) *Mol. Ther.* **2**(1):47–55.

Notice to Purchaser

Clontech products are to be used for research purposes only. They may not be used for any other purpose, including, but not limited to, use in drugs, *in vitro* diagnostic purposes, therapeutics, or in humans. Clontech products may not be transferred to third parties, resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products or to provide a service to third parties without written approval of Clontech Laboratories, Inc.

DH5 α [™] is a trademark of Invitrogen Corporation.

cPPT/CTS Element:

This product and its use are the subject of U.S. Pat. No. 6,682,907

The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot disclose information, sell or otherwise transfer this product, its components or materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for any commercial purposes. If the buyer is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Clontech is willing to accept return of the product with a full refund. For information on purchasing a license to the DNA-Flap technology for purposes other than research, contact the Transfer of Technology Office, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75 724 Paris Cedex 15 (www.pasteur.fr).

DsRed-Monomer and Fruit Fluorescent Proteins:

The DsRed-Monomer and the Fruit Fluorescent Proteins are covered by one or more of the following U.S. patents : 7,005,511; 7,157,566; 7,393,923 and 7,250,298.

Living Colors[®] Fluorescent Protein Products:

Not-For-Profit Entities: Orders may be placed in the normal manner by contacting your local representative or Clontech Customer Service at 650.919.7300. At its discretion, Clontech grants Not-For-Profit Entities a non-exclusive, personal, limited license to use this product for non-commercial life science research use only. Such license specifically excludes the right to sell or otherwise transfer this product, its components or derivatives thereof to third parties. No modifications to the protein coding sequence may be made without express written permission from Clontech. Any other use of this product requires a license from Clontech. For license information, please contact a licensing representative by phone at 650.919.7320 or by e-mail at licensing@clontech.com.

For-Profit Entities wishing to use this product are required to obtain a license from Clontech. For license information, please contact a licensing representative by phone at 650.919.7320 or by e-mail at licensing@clontech.com or click here for more information.

WPRES Purchaser Notification:

Clontech has a license to sell products containing WPRES, under the terms described below. Any use of WPRES outside of Clontech's product or the product's intended use, requires a license as detailed below. Before using the product containing WPRES, please read the following license agreement. If you do not agree to be bound by its terms, contact Clontech within 10 days for authorization to return the unused product containing WPRES and to receive a full credit.

Patents: The WPRES technology is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 6,136,597 ; 6,284,469 ; 6,312,912 ; 6,287,814 , issued to The Salk Institute for Biological Studies

Individual License Agreement: Clontech grants you a non-exclusive license to use the enclosed product containing WPRES in its entirety for its intended use. The product is being transferred to you in furtherance of, and reliance on, such license. Any use of WPRES outside of Clontech's product or the product's intended use, requires a license from the Salk Institute for Biological Studies.

Termination of License: This license agreement is effective until terminated. You may terminate it at any time by destroying all products containing WPRES in your control. It will also terminate automatically if you fail to comply with the terms and conditions of the license agreement. You shall, upon termination of the license agreement, destroy all products containing WPRES in your control, and so notify Clontech in writing. This License shall be governed in its interpretation and enforcement by the laws of the State of California.

Contact for WPRES Licensing:

The Salk Institute for Biological Studies
10010 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037
Attn.: Office of Technology Management
Phone: 858.453.4100 ext. 1275
Fax: 858.546.8093

Clontech, the Clontech logo and all other trademarks are the property of Clontech Laboratories, Inc., unless noted otherwise. Clontech is a Takara Bio Company. ©2009 Clontech Laboratories, Inc

Bibliographie

- Abdekhodaie, M. J., Liu, Z., Erhan, S. Z. and Wu, X. Y.** (2012). Characterization of novel soybean-oil-based thermosensitive amphiphilic polymers for drug delivery applications. *Polym. Int.* **61**, 1477–1484.
- Abismaïl, B., Canselier, J., Wilhelm, A., Delmas, H. and Gourdon, C.** (1999). Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrason. Sonochem.* **6**, 75–83.
- Adams, D. O. and Hamilton, T. A.** (1984). The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* **2**, 283–318.
- Aderem, A. and Underhill, D. M.** (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593–623.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and And Walter, P.** (2008). *Molecular Biology of the Cell*.
- Allen, L. A.** (1996). Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* **184**, 627–637.
- Avci-Adali, M., Behring, A., Keller, T., Krajewski, S., Schlensak, C. and Wendel, H. P.** (2014). Optimized conditions for successful transfection of human endothelial cells with in vitro synthesized and modified mRNA for induction of protein expression. *J. Biol. Eng.* **8**, 8.
- Beningo, K. a and Wang, Y.** (2002). Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *J. Cell Sci.* **115**, 849–56.
- Berk, D. a and Hochmuth, R. M.** (1992). Lateral mobility of integral proteins in red blood cell tethers. *Biophys. J.* **61**, 9–18.
- Bianco, B. C., Griffin, F. M., Silverstein, S. C. and Bianco, C.** (1975). Studies of the macrophage complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. *J. Exp. Med.* **141**, 1278–1290.
- Bizal, C. and Butler, J.** (1991). Kinetics of phagocytosis and phagosome-lysosome fusion in hamster lung and peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **239**, 229–239.
- Bongrand, P.** (1999). Ligand-receptor interactions. *Reports Prog. Phys.* **62**, 921.
- Bottero, V., Withoff, S. and Verma, I. M.** (2006). NF-kappaB and the regulation of hematopoiesis. *Cell Death Differ.* **13**, 785–97.
- Boukellal, H., Campás, O., Joanny, J. F., Prost, J. and Sykes, C.** (2004). Soft Listeria: actin-based propulsion of liquid drops. *Phys. Rev. E* **69**, 061906.
- Bourouina, N., Husson, J., Waharte, F., Pansu, R. B. and Henry, N.** (2011). Formation of specific receptor–ligand bonds between liquid interfaces. *Soft Matter* **7**, 9130–9139.
- Bourouina, N., Husson, J., Hivroz, C. and Henry, N.** (2012). Biomimetic droplets for artificial engagement of living cell surface receptors: the specific case of the T-cell. *Langmuir* **28**, 6106–13.

- Boyd, J., Parkinson, C. and Sherman, P.** (1972). Factors affecting emulsion stability, and the HLB concept. *J. Colloid Interface Sci.* **41**,.
- Bremond, N. and Bibette, J.** (2012). Exploring emulsion science with microfluidics. *Soft Matter* **8**, 10549–10559.
- Brown, G. C. and Neher, J. J.** (2012). Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: “phagoptosis”. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 325–32.
- Campàs, O., Mammoto, T., Hasso, S., Sperling, R. a, O’Connell, D., Bischof, A. G., Maas, R., Weitz, D. a, Mahadevan, L. and Ingber, D. E.** (2013). Quantifying cell-generated mechanical forces within living embryonic tissues. *Nat. Methods* **11**, 183–9.
- Campbell, P. A. P., Canono, B. P. and Drevets, D. A.** (2001). Measurement of bacterial ingestion and killing by macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* 14–16.
- Canham, P. B.** (1970). The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell. *J. Theor. Biol.* **26**, 61–81.
- Cannon, G. and Swanson, J.** (1992). The macrophage capacity for phagocytosis. *J. Cell Sci.* **913**, 907–913.
- Caron, E.** (1998). Identification of Two Distinct Mechanisms of Phagocytosis Controlled by Different Rho GTPases. *Science (80-.)*. **282**, 1717–1721.
- Castellano, F., Montcourrier, P. and Chavrier, P.** (2000). Membrane recruitment of Rac1 triggers phagocytosis. **2961**, 2955–2961.
- Champion, J. A. and Mitragotri, S.** (2006). Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 4930–4934.
- Champion, J. A., Walker, A. and Mitragotri, S.** (2008). Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm. Res.* **25**, 1815–1821.
- Cherry, R. J.** (1979). Rotational and lateral diffusion of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 289–327.
- Chow, C.-W., Downey, G. P. and Grinstein, S.** (2001). Measurements of Phagocytosis and Phagosomal Maturation. In *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Chung, H., Kim, T. W., Kwon, M., Kwon, I. C. and Jeong, S. Y.** (2001). Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. *J. Control. Release* **71**, 339–50.
- Cooper, P., Mayer, P. and Baggiolini, M.** (1984). Stimulation of phagocytosis in bone marrow-derived mouse macrophages by bacterial lipopolysaccharide: correlation with biochemical and functional parameters. *J. Immunol.*
- Cossart, P. and Sansonetti, P.** (2004). Bacterial Invasion : The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. *Science (80-.)*. **304**, 242–249.
- Cougoule, C., Wiedemann, A., Lim, J. and Caron, E.** (2004). Phagocytosis, an alternative model system for the study of cell adhesion. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 679–89.

- Curro, M., Trovato-Salinaro, A., Gugliandolo, A., Koverech, G., Lodato, F., Caccamo, D., Calabrese, V. and Ientile, R.** (2015). Resveratrol protects against homocysteine-induced cell damage via cell stress response in neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* **93**, 149–56.
- Daëron, M.** (1997). Fc Receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.*
- Davies, J. T.** (1957). A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent. In *Proceedings of the 2nd International Congress of Surface Activity*, pp. 426–38.
- Davis, S. and Hansrani, P.** (1985). The influence of emulsifying agents on the phagocytosis of lipid emulsions by macrophages. *Int. J. Pharm.* **23**, 69–77.
- Deckers, H. M., Van Rooijen, G., Boothe, J., Goll, J., Moloney, M. M., Schryvers, A. B., Alcantara, J. and Hutchins, W. A.** (2004). Immunogenic formulations comprising oil bodies.
- DeLean, A., Munson, P. J. and Rodbard, D.** (1978). Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol.* **235**, E97–E102.
- Delmas, T., Piraux, H., Couffin, A.-C., Texier, I., Vinet, F., Poulin, P., Cates, M. E. and Bibette, J.** (2011). How to prepare and stabilize very small nanoemulsions. *Langmuir* **27**, 1683–92.
- Desjardins, M.** (1995). Biogenesis of phagolysosomes: the “kiss and run” hypothesis. *Trends Cell Biol.* **5**, 183–186.
- Desjardins, M. and Huber, L.** (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J. cell ...* **124**, 677–688.
- Devitt, a, Pierce, S., Oldreive, C., Shingler, W. H. and Gregory, C. D.** (2003). CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: the role of phosphatidylserine. *Cell Death Differ.* **10**, 371–82.
- Diakonova, M.** (2002). Dynamics of cytoskeletal proteins during Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *Mol. Biol. ...* **13**, 402–411.
- Doshi, N. and Mitragotri, S.** (2010). Macrophages recognize size and shape of their targets. *PLoS One* **5**, e10051.
- Downey, G. P., Botelho, R. J., Butler, J. R., Moltyaner, Y., Chien, P., Schreiber, a. D. and Grinstein, S.** (1999). Phagosomal Maturation, Acidification, and Inhibition of Bacterial Growth in Nonphagocytic Cells Transfected with Fc RIIA Receptors. *J. Biol. Chem.* **274**, 28436–28444.
- Du Pasquier, L.** (2004). Innate immunity in early chordates and the appearance of adaptive immunity. *C. R. Biol.* **327**, 591–601.
- Dykstra, T., Utermohlen, O. and Haas, A.** (2011). Defined particle ligands trigger specific defense mechanisms of macrophages. *Innate Immun.* **17**, 388–402.
- E. Dickinson and B. Bergenstahl** (1997). *Food Colloids. Proteins, Lipids and Polysaccharides*. WILEY-VCH Verlag GmbH.
- Edelman, G.** (1969). The covalent structure of an entire γG immunoglobulin molecule. *Proc. ...* 78–85.

- Edidin, M. and Zuniga, M.** (1984). Lateral diffusion of wild-type and mutant Ld antigens in L cells. *J. Cell Biol.* 4–6.
- Efremova, N. V, Bondurant, B., O'Brie, D. F. and Leckband, D. E.** (2000). Measurements of interbilayer forces and protein adsorption on uncharged lipid bilayers displaying poly (ethylene glycol) chains. *Biochemistry* **39**, 3441–3451.
- Emerard, J.** (2010). Utilisation de gouttelettes d'émulsion pour l'étude de l'adhésion spécifique entre deux surfaces fluides.
- ESPCI, C.** Tension de surface. 1–6.
- Evans, E. A.** (1973). A New Material Concept for the Red Cell Membrane. *Biophys. J.* **13**, 926–940.
- Evora, C., Soriano, I., Rogers, R. A., Shakesheff, K. M., Hanes, J. and Langer, R.** (1998). Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: The effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine. *J. Control. Release* **51**, 143–152.
- Fattaccioli, J.** (2006). Mouillage Spécifique d'Émulsions sur Substrats Biomimétiques. *tel.archives-ouvertes.fr*.
- Fattaccioli, J., Baudry, J., Henry, N., Brochard-Wyart, F. and Bibette, J.** (2008). Specific wetting probed with biomimetic emulsion droplets. *Soft Matter* **4**, 2434.
- Fattaccioli, J., Baudry, J., Émerard, J.-D., Bertrand, E., Goubault, C., Henry, N. and Bibette, J.** (2009). Size and fluorescence measurements of individual droplets by flow cytometry. *Soft Matter* **5**, 2232.
- Fischer-Friedrich, E., Hyman, A. a, Jülicher, F., Müller, D. J. and Helenius, J.** (2014). Quantification of surface tension and internal pressure generated by single mitotic cells. *Sci. Rep.* **4**, 6213.
- Flannagan, R. S., Harrison, R. E., Yip, C. M., Jaqaman, K. and Grinstein, S.** (2010). Dynamic macrophage “probing” is required for the efficient capture of phagocytic targets. *J. Cell Biol.* **191**, 1205–18.
- Forsgren, A., Schmeling, D. and Zettervall, O.** (1977). Quantitative phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. Use of radiolabelled emulsions to measure thae rate of phagocytosis. *Immunology* 0–1.
- Fuller, R. R. and Sweedler, J. V** (1996). Characterizing submicron vesicles with wavelength-resolved fluorescence in flow cytometry. *Cytometry* **25**, 144–55.
- Gallo, P., Gonçalves, R. and Mosser, D. M.** (2010). The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. *Immunol. Lett.* **133**, 70–7.
- Gandour, D. M. and Walker, W. S.** (1983). Macrophage cell cycling: influence on Fc receptors and antibody-dependent phagocytosis. *J. Immunol.* **130**, 1108–1112.
- Gaonkar, A. G.** (1989). Interfacial tensions of vegetable oil/water systems: effect of oil purification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**, 1090–1092.
- Gast, A. P. and Adamson, A. W.** (1997). *Physical chemistry of surfaces*. New York, A Wiley-Interscience Publication.

- Girard, P.** (2004). Membranes hors d'équilibre: échanges et transport actif.
- Goodridge, H. S., Reyes, C. N., Becker, C. a, Katsumoto, T. R., Ma, J., Wolf, A. J., Bose, N., Chan, A. S. H., Magee, A. S., Danielson, M. E., et al.** (2011). Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a "phagocytic synapse". *Nature* **472**, 471–5.
- Gordon, S. and Taylor, P. R.** (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953–64.
- Gratton, S. E. A., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E. and DeSimone, J. M.** (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 11613.
- Greenberg, M. E., Sun, M., Zhang, R., Febbraio, M., Silverstein, R. and Hazen, S. L.** (2006). Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **203**, 2613–25.
- Gregoriadis, G.** (1976). The Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine. *N. Engl. J. Med.* **295**, 704–710.
- Gregory, C. D. and Brown, S. B.** (2005). Apoptosis: eating sensibly. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1161–3.
- Gresham, H. and McGarr, J.** (1988). Studies on the molecular mechanisms of human Fc receptor-mediated phagocytosis. Amplification of ingestion is dependent on the generation of reactive oxygen. *J. Clin. ...* **82**, 1192–1201.
- Griffin, F., Griffin, J. and Silverstein, S.** (1976). Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes. *J. Exp. ...* **144**, 788–809.
- Grit, M. and Crommelin, D. J.** (1993). Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chem. Phys. Lipids* **64**, 3–18.
- Groves, E., Dart, A. E., Covarelli, V. and Caron, E.** (2008). Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell. Mol. life Sci.* **65**, 1957–76.
- Hai, M., Bernath, K., Tawfik, D. and Magdassi, S.** (2004). Flow cytometry: a new method to investigate the properties of water-in-oil-in-water emulsions. *Langmuir* **20**, 2081–5.
- Hamidi, M., Rafiei, P. and Azadi, A.** (2008). Designing PEGylated therapeutic molecules: advantages in ADMET properties. *Expert Opin. Drug Discov.* **3**, 1293–1307.
- Hampton, M.** (1994). A single assay for measuring the rates of phagocytosis and bacterial killing by neutrophils. *J. Leukoc. ...* **55**, 147–152.
- Harnisch, S. and Müller, R. H.** (2000). Adsorption kinetics of plasma proteins on oil-in-water emulsions for parenteral nutrition. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **49**, 41–6.
- Hartmann, G., Weiner, G. J. and Krieg, A. M.** (1999). CpG DNA: A potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 9305–9310.

- Hashida, M., Egawa, M., Muranishi, S. and Sezaki, H.** (1977). Role of intramuscular administration of water-in-oil emulsions as a method for increasing the delivery of anticancer to regional lymphatics. ... *Pharmacokinet.* ... **5**,.
- Hashida, M., Kawakami, S. and Yamashita, F.** (2005). Lipid carrier systems for targeted drug and gene delivery. *Chem. Pharm.* ... **53**,.
- Heidemann, S. and Kaech, S.** (1999). Direct observations of the mechanical behaviors of the cytoskeleton in living fibroblasts. *J. cell* ... **145**, 109–122.
- Herant, M., Heinrich, V. and Dembo, M.** (2005). Mechanics of neutrophil phagocytosis: behavior of the cortical tension. *J. Cell Sci.* **118**, 1789–97.
- Hermanson, G. T.** (2013). *Bioconjugate techniques*. Academic press.
- Hishikawa, T. and Cheung, J.** (1991). Calcium transients during Fc receptor-mediated and nonspecific phagocytosis by murine peritoneal macrophages. *J. cell* ... **115**, 59–66.
- Hsu, J.-P. and Nacu, A.** (2003). Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. *J. Colloid Interface Sci.* **259**, 374–81.
- Hsu, Y. C. and Peng, C. a** (2001). Diminution of phagocytosed perfluorocarbon emulsions using perfluoroalkylated polyethylene glycol surfactant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 776–81.
- Huppa, J. B. and Davis, M. M.** (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 973–83.
- Iber, D.** (2005). Formation of the B cell synapse: retention or recruitment? *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 206–13.
- Illum, L., Davis, S., Müller, R., Mak, E. and West, P.** (1987). The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a blockcopolymer-poloxamine 908. *Life Sci.* **40**, 367–374.
- Ito, T., Ueda, M. J., Okada, T. S. and Ohnishi, S.** (1981). Phagocytosis by macrophages. II. The dissociation of the attachment and ingestion steps. *J. Cell Sci.* **51**, 189–201.
- Ivanov, D., Lević, J. and Sredanović, S.** (2010). Fatty acid composition of various soybean products. *Food Feed Res.*
- Iwamoto, K., Kato, T., Kawahara, M., Koyama, N., Watanabe, S., Miyake, Y. and Sunamoto, J.** (1991). Polysaccharide-coated oil droplets in oil-in-water emulsions as targetable carriers for lipophilic drugs. *J. Pharm. Sci.* **80**, 219–24.
- Janeway, C. a and Medzhitov, R.** (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. J.** (2001). The structure of a typical antibody molecule.
- Jaumouillé, V., Farkash, Y., Jaqaman, K., Das, R., Lowell, C. A. and Grinstein, S.** (2014). Actin Cytoskeleton Reorganization by Syk Regulates Fcγ Receptor Responsiveness by Increasing Its Lateral Mobility and Clustering. *Dev. Cell* **29**, 534–546.

- Jeong, Y., Kang, H. J., Bae, K.-H., Kim, M.-G. and Chung, S. J.** (2010). Efficient selection of IgG Fc domain-binding peptides fused to fluorescent protein using E. coli expression system and dot-blotting assay. *Peptides* **31**, 202–6.
- Joanicot, M. and Ajdari, A.** (2005). Droplet control for microfluidics. *Science* (80-.). 4–6.
- Joscelyne, S. M. and Trägårdh, G.** (2000). Membrane emulsification — a literature review. *J. Memb. Sci.* **169**, 107–117.
- Jr, C. J.** (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today*.
- Jung, H., Yang, T., Lasagna, M. D., Shi, J., Reinhart, G. D. and Cremer, P. S.** (2008). Impact of hapten presentation on antibody binding at lipid membrane interfaces. *Biophys. J.* **94**, 3094–103.
- Kaplan, G.** (1977). Differences in the Mode of Phagocytosis with Fc and C3 Receptors in Macrophages. *Scand. J. Immunol.* **6**, 797–807.
- Kaufmann, S.** (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 20–30.
- Kawaguchi, H., Koiwai, N., Ohtsuka, Y., Miyamoto, M. and Sasakawa, S.** (1986). Phagocytosis of latex particles by leucocytes. I. Dependence of phagocytosis on the size and surface potential of particles. *Biomaterials* **7**, 61–66.
- Kawakami, S., Yamashita, F. and Hashida, M.** (2000). Disposition characteristics of emulsions and incorporated drugs after systemic or local injection. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **45**, 77–88.
- Kensil, C. and Dennis, E.** (1981). Alkaline hydrolysis of phospholipids in model membranes and the dependence on their state of aggregation. *Biochemistry* **60**, 6079–6085.
- Kielian, T. and Blecha, F.** (1995). CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide. *Immunopharmacology* **29**, 187–205.
- Koval, M., Preiter, K., Adles, C., Stahl, P. D. and Steinberg, T. H.** (1998). Size of IgG-opsonized particles determines macrophage response during internalization. *Exp. Cell Res.* **242**, 265–73.
- Kurihara, A., Shibayama, Y., Mizota, A., Yasuno, A., Ikeda, M. and Hisaoka, M.** (1996). Pharmacokinetics of highly lipophilic antitumor agent palmitoyl rhizoxin incorporated in lipid emulsions in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 252–258.
- Lauber, K., Bohn, E., Kröber, S. M., Xiao, Y., Blumenthal, S. G., Lindemann, R. K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., et al.** (2003). Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. *Cell* **113**, 717–730.
- Lauber, K., Blumenthal, S., Waibel, M. and Wesselborg, S.** (2004). Clearance of Apoptotic Cells : Getting Rid of the Corpses. *Mol. Cell* **14**, 277–287.
- Lawrence, M. J. and Rees, G. D.** (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **45**, 89–121.

- Leal-Calderon, F. and Cansell, M.** (2012). The design of emulsions and their fate in the body following enteral and parenteral routes. *Soft Matter* **8**, 10213.
- Leal-Calderon, F., Schmitt, V. and Bibette, J.** (2007). *Emulsion science: basic principles*. Springer.
- Lee, J., Martic, P. . and Tan, J. .** (1989). Protein adsorption on pluronic copolymer-coated polystyrene particles. *J. Colloid Interface Sci.* **131**, 252–266.
- Lee, K., Dinner, A., Tu, C. and Campi, G.** (2003). The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* (80-.).
- Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E. and Ashokkumar, M.** (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrason. Sonochem.* **16**, 721–727.
- Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V. and Peppas, N. A.** (2010). Polymers for Drug Delivery Systems. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **1**, 149–173.
- Liu, F. and Liu, D.** (1995). Long-circulating emulsions (oil-in-water) as carriers for lipophilic drugs. *Pharm. Res.* **12**, 1060–1064.
- Loichot, C. and Grima, M.** (2006). Mécanismes d'action des médicaments. 1–17.
- Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T. and Dawson, K. A.** (2008). Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 14265–70.
- Mabille, C., Schmitt, V. and Gorria, P.** (2000). Rheological and shearing conditions for the preparation of monodisperse emulsions. *Langmuir* 422–429.
- Machesky, L. M. and Gould, K. L.** (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 117–121.
- Magnusson, K., Stendahl, O., Stjernström, I. and Edebo, L.** (1979). Reduction of phagocytosis, surface hydrophobicity and charge of *Salmonella typhimurium* 395 MR10 by reaction with secretory IgA (SIgA). *Immunology*.
- Maranhao, R. C., Tercyak, A. M. and Redgrave, T. G.** (1986). Effects of cholesterol content on the metabolism of protein-free emulsion models of lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **875**, 247–255.
- Maskarinec, S. a, Hannig, J., Lee, R. C. and Lee, K. Y. C.** (2002). Direct observation of poloxamer 188 insertion into lipid monolayers. *Biophys. J.* **82**, 1453–9.
- Mason, T. G. and Bibette, J.** (1997). Shear Rupturing of Droplets in Complex Fluids. *Langmuir* **13**, 4600–4613.
- Mason, T., Bibette, J. and Weitz, D.** (1995). Elasticity of Compressed Emulsions. *Phys. Rev. Lett.* **75**, 2051–2054.
- Matsui, H., Ito, T. and Ohnishi, S.** (1983). Phagocytosis by macrophages. III. Effects of heat-labile opsonin and poly (L-lysine). *J. Cell Sci.* **143**, 133–143.

- May, R. C. and Machesky, L. M.** (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **114**, 1061–77.
- May, R., Caron, E., Hall, A. and Machesky, L.** (2000). Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by Fc γ R or CR3. *Nat. Cell Biol.* **2**, 246–248.
- Miyata, R. and van Eeden, S. F.** (2011). The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **257**, 209–26.
- Mizushima, Y.** (1996). Lipid microspheres (lipid emulsions) as a drug carrier — An overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **20**, 113–115.
- Mossman, K., Campi, G., Groves, J. and Dustin, M.** (2005). Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synapses. *Science* (80-.). **10349**,.
- Murphy, J., Summer, R., Wilson, A. a, Kotton, D. N. and Fine, A.** (2008). The prolonged life-span of alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **38**, 380–5.
- Nace, V.** (1996). *Nonionic surfactants: polyoxyalkylene block copolymers*. CRC Press.
- Nagura, H., Asai, J. and Kojima, K.** (1977). Studies on the Mechanism of Phagocytosis. I. Effect of Electric Surface Charge on Phagocytic Activity of Macrophages for Fixed Red Cells. *Cell Struct. Funct.* **2**, 21–28.
- Nicolete, R., dos Santos, D. F. and Faccioli, L. H.** (2011). The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 1557–63.
- Nürnberg, A., Kitzing, T. and Grosse, R.** (2011). Nucleating actin for invasion. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 177–87.
- Obey, T. M. and Vincent, B.** (1994). Novel Monodisperse “Silicone Oil”/Water Emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **163**, 454–463.
- Olsson, M. and Oldenburg, P.-A.** (2008). CD47 on experimentally senescent murine RBCs inhibits phagocytosis following Fc γ receptor-mediated but not scavenger receptor-mediated recognition by macrophages. *Blood* **112**, 4259–67.
- Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A. and Jones, P. P.** (2013). *Kuby immunology*. WH Freeman New York.
- Pacheco, P., White, D. and Sulchek, T.** (2013). Effects of microparticle size and Fc density on macrophage phagocytosis. *PLoS One* **8**, e60989.
- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., de Boer, R. J., Borghans, J. a M., Tesselaar, K. and Koenderman, L.** (2010). In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* **116**, 625–7.
- Pollard, J. W.** (2009). Trophic macrophages in development and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 259–70.
- Pommier, C. G., Inada, S., Fries, L. F., Takahashi, T., Frank, M. M. and Brown, E. J.** (1983). Plasma fibronectin enhances phagocytosis of opsonized particles by human peripheral blood monocytes. *J. Exp. Med.* **157**, 1844–1854.

- Pontani, L.-L., Jorjadze, I., Viasnoff, V. and Brujic, J.** (2012). Biomimetic emulsions reveal the effect of mechanical forces on cell-cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 9839–44.
- Poux, M. and Canselier, J.-P.** (2004). Procédés d'émulsification. Techniques et appareillage. *Tech. l'ingénieur. Génie des procédés*.
- Qi, S. Y., Groves, J. T. and Chakraborty, a K.** (2001). Synaptic pattern formation during cellular recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6548–53.
- Rahman, M.** (2006). Introduction to flow cytometry. *AbD SEROTECH*.
- Ravaine, V., Bibette, J. and Henry, N.** (2002). Wetting of Liquid Droplets on Living Cells. *J. Colloid Interface Sci.* **255**, 270–273.
- Ravetch, J. V** (1997). Fc receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 121–125.
- Ravetch, J. and Bolland, S.** (2001). IgG fc receptor. *Annu. Rev. Immunol.*
- Ravetch, J. and Clynes, R.** (1998). Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu. Rev. Immunol.*
- Ravichandran, K.** (2011). Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* **35**, 445–455.
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B. and Bershadsky, A. D.** (2001). Focal contacts as mechanosensors externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mdia1-dependent and rock-independent mechanism. *J. Cell Biol.* **153**, 1175–1186.
- Robbins, S. L., Kumar, V., Abbas, A. K. and Aster, J. C.** (2012). *Robbins basic pathology*. Elsevier Health Sciences.
- Rosales, C.** (2005). *Molecular mechanisms of phagocytosis*. Springer.
- Rosselin, M., Abed, N., Virlogeux-Payant, I., Bottreau, E., Sizaret, P.-Y., Velge, P. and Wiedemann, A.** (2011). Heterogeneity of type III secretion system (T3SS)-1-independent entry mechanisms used by Salmonella Enteritidis to invade different cell types. *Microbiology* **157**, 839–47.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Owen, S. C. and Association, A. P.** (2006). *Handbook of pharmaceutical excipients*. Pharmaceutical press London.
- Rudt, S. and Müller, R.** (1993). In vitro phagocytosis assay of nano-and microparticles by chemiluminescence. III. Uptake of differently sized surface-modified particles, and its correlation to particle. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1**, 31–39.
- Russell, D. G., Vandervan, B. C., Glennie, S., Mwandumba, H. and Heyderman, R. S.** (2009). The macrophage marches on its phagosome: dynamic assays of phagosome function. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 594–600.
- Salim, M., Minamikawa, H., Sugimura, A. and Hashim, R.** (2014). Amphiphilic designer nano-carriers for controlled release: from drug delivery to diagnostics. *Med. Chem. Commun.* **5**, 1602–1618.

- Samad, A., Sultana, Y. and Aqil, M.** (2007). Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review. *Curr. Drug Deliv.* **4**, 297–305.
- Schick, M. J.** (1987). *Nonionic Surfactants: Physical Chemistry*. CRC Press.
- Shapiro, H. M.** (2005). *Practical flow cytometry*. John Wiley & Sons.
- Sharma, G., Valenta, D. T., Altman, Y., Harvey, S., Xie, H., Mitragotri, S. and Smith, J. W.** (2010). Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J. Control. Release* **147**, 408–12.
- Simon, S. I. and Schmid-Schönbein, G. W.** (1988). Biophysical aspects of microsphere engulfment by human neutrophils. *Biophys. J.* **53**, 163–73.
- Sobota, a., Strzelecka-Kiliszek, a., G adkowska, E., Yoshida, K., Mrozinska, K. and Kwiatkowska, K.** (2005). Binding of IgG-Opsonized Particles to Fc R Is an Active Stage of Phagocytosis That Involves Receptor Clustering and Phosphorylation. *J. Immunol.* **175**, 4450–4457.
- Song, Y. K., Liu, D., Maruyama, K. and Takizawa, T.** (1996). Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **50** , 372–377.
- Stache, H. W.** (1995). *Anionic surfactants: organic chemistry*. CRC Press.
- Stahl, P. and Ezekowitz, R.** (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 9–11.
- Stockinger, W. and Zhang, S.** (2006). Differential requirements for actin polymerization, calmodulin, and Ca²⁺ define distinct stages of lysosome/phagosome targeting. *Mol. Biol. ...* **17**, 1697–1710.
- Stolnik, S., Dunn, S. and Garnett, M.** (1994). Surface modification of poly (lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly (lactide)-poly (ethylene glycol) copolymers. *Pharm. ...* **11**,.
- Stossel, T. P., Mason, R. J., Hartwig, J. and Vaughan, M.** (1972). Quantitative studies of phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes: use of emulsions to measure the initial rate of phagocytosis. *J. Clin. Invest.* **51**, 615–24.
- Subramanian, S., Tsai, R., Sen, S., Dahl, K. N. and Discher, D. E.** (2006a). Membrane mobility and clustering of Integrin Associated Protein (IAP, CD47)--major differences between mouse and man and implications for signaling. *Blood Cells. Mol. Dis.* **36**, 364–72.
- Subramanian, S., Tsai, R. and Discher, D. E.** (2006b). The “metabolon,” CD47, and the “phagocytic synapse”: molecular co-localization and species divergence. *Transfus. Clin. Biol.* **13**, 31–8.
- Sung, S., Nelson, R. and Silverstein, S.** (1983). Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages. *J. Cell Biol.* **96**,.
- Svitova, T. F. and Radke, C. J.** (2005). AOT and Pluronic F68 Coadsorption at Fluid / Fluid Interfaces : A Continuous-Flow Tensiometry Study. 1129–1138.
- Swanson, J. a** (2008a). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 639–49.

- Swanson, J. A.** (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 639–49.
- Swanson, J. and Baer, S.** (1995). Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* **5**, 89–93.
- Swanson, J. a, Johnson, M. T., Beningo, K., Post, P., Mooseker, M. and Araki, N.** (1999). A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J. Cell Sci.* **112** (Pt 3), 307–16.
- Tabata, Y. and Ikada, Y.** (1988). Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials* **9**, 356–62.
- Tamilvanan, S.** (2004). Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems. *Prog. Lipid Res.* **43**, 489–533.
- Tamilvanan, S., Schmidt, S., Müller, R. H. and Benita, S.** (2005). In vitro adsorption of plasma proteins onto the surface (charges) modified-submicron emulsions for intravenous administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **59**, 1–7.
- Tan, S. and Dee, M.** (2009). Elie Metchnikoff (1845-1916): discoverer of phagocytosis. *Singapore Med. J.* **50**, 456–457.
- Tauber, A. and Chernyak, L.** (1989). The birth of immunology: II. Metchnikoff and his critics. *Cell. Immunol.* **473**, 447–473.
- Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.-H., Brown, G. D. and Gordon, S.** (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 901–44.
- Tenzer, S., Docter, D., Kuharev, J., Musyanovych, A., Fetz, V., Hecht, R., Schlenk, F., Fischer, D., Kiouptsi, K., Reinhardt, C., et al.** (2013). Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat. Nanotechnol.* **8**, 772–81.
- Tobias, P. S. and Ulevitch, R. J.** (1993). Lipopolysaccharide binding protein and CD14 in LPS dependent macrophage activation. *Immunobiology* **187**, 227–32.
- Trichet, L., Campàs, O., Sykes, C. and Plastino, J.** (2007). VASP governs actin dynamics by modulating filament anchoring. *Biophys. J.* **92**, 1081–9.
- Turtle, C. and Riddell, S.** (2010). Artificial antigen presenting cells for use in adoptive immunotherapy. *Cancer J.* **16**, 374–381.
- Underhill, D. M. and Ozinsky, A.** (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 825–52.
- Unkeless, J.** (1989). Function and heterogeneity of human Fc receptors for immunoglobulin G. *J. Clin. Invest.* **83**, 355–361.
- Unkeless, J. and Eisen, H.** (1975). Binding of monomeric immunoglobulins to fc receptors of mouse macrophages. *J. Exp. Med.* **142**,.
- Van der Merwe, P. A.** (2002). Formation and function of the immunological synapse. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 293–298.

- Veiga, E. and Cossart, P.** (2006). The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization. *Trends Cell Biol.* **16**, 499–504.
- Verbrugghe, M., Sabatino, P., Cocquyt, E., Saveyn, P., Sinnaeve, D., Van der Meeren, P. and Martins, J. C.** (2010). Solubilization of flurbiprofen with non-ionic Tween20 surfactant micelles: A diffusion 1H NMR study. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **372**, 28–34.
- Voss, E. W.** (1993). Kinetic measurements of molecular interactions by spectrofluorometry. *J. Mol. Recognit.* **6**, 51–58.
- Weiss, J.** (1997). The hil equation revisited : uses and misuses. *FASEB J.* 835–841.
- Werner, T. C., Bunting, J. R. and Cathou, R. E.** (1972). The shape of immunoglobulin G molecules in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 795–9.
- Winter, P. M., Caruthers, S. D., Kassner, A., Harris, T. D., Chinen, L. K., Allen, J. S., Lacy, E. K., Zhang, H., Robertson, J. D., Wickline, S. A., et al.** (2003). Molecular Imaging of Angiogenesis in Nascent Vx-2 Rabbit Tumors Using a Novel ^{64}Cu 3 -targeted Nanoparticle and 1 . 5 Tesla Magnetic Resonance Imaging 1. 5838–5843.
- Wright, S. D., Craigmyle, L. S. and Silverstein, S. C.** (1983). Fibronectin and serum amyloid P component stimulate C3b- and C3bi-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J. Exp. Med.* **158**, 1338–1343.
- Xia, Y. and Larock, R. C.** (2010). Vegetable oil-based polymeric materials: synthesis, properties, and applications. *Green Chem.* **12**, 1893.
- Yates, R. M., Hermetter, A. and Russell, D. G.** (2005). The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. *Traffic* **6**, 413–20.
- Yeung, A., Dabros, T., Masliyah, J. and Czarnecki, J.** (2000). Micropipette: a new technique in emulsion research. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **174**, 169–181.
- Zhang, Y., Hoppe, A. D. and Swanson, J. A.** (2010). Coordination of Fc receptor signaling regulates cellular commitment to phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 19332–19337.
- Zhao, D., Huo, Q., Feng, J., Chmelka, B. F. and Stucky, G. D.** (1998). Tri-, Tetra-, and Octablock Copolymer and Nonionic Surfactant Syntheses of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6024–6036.
- Zuidam, N. J. and Crommelin, D. J. a.** (1995). Chemical hydrolysis of phospholipids. *J. Pharm. Sci.* **84**, 1113–1119.

Résumé

La phagocytose par les macrophages est un processus biologique essentiel au système immunitaire et joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Les cibles à éliminer varient en terme de tailles, des bactéries (μm) aux cellules cancéreuses ou senescentes ($10 - 20 \mu\text{m}$). La plupart des études quantitatives sur la phagocytose reposent sur l'utilisation de microparticules de polymère rigides en tant que cibles modèles pour la compréhension des paramètres qui régissent ce processus. Cependant, ces particules ne rendent pas compte de la mobilité latérale des ligands à leur surface malgré la pertinence de ce paramètre dans le contexte immunologique. Cette étude a pour but de synthétiser un matériau biomimétique qui constitue un nouveau système modèle pour l'étude de la phagocytose. Il s'agit de gouttes d'émulsions monodisperses fonctionnalisées avec des IgGs libres de diffuser sur toute la surface. Dans le cadre de cette thèse, nous avons obtenu différentes densités contrôlées de fonctionnalisation, caractérisées de façon quantitative. Ainsi, il nous a été possible de déterminer une densité minimale d'IgGs nécessaire à induire une internalisation efficace des gouttes. Pour des densités supérieures d'IgGs, ces gouttes sont efficacement et spécifiquement internalisées par phagocytose induite par les récepteurs Fc γ R *in vitro*. Nous avons plus précisément cherché à approfondir la compréhension de certains aspects mécaniques. Nous montrons que, contrairement à des billes de polymères solides, l'internalisation des gouttes est efficace même pour de faibles densités d'IgGs. La phagocytose s'accompagne, pendant la phase d'adhésion à la surface du macrophage, d'une mobilité latérale des ligands en zone de contact. Il apparaît donc que la mobilité latérale des protéines à l'interface d'une cible améliore considérablement sa phagocytose par les macrophages. Ainsi, ces gouttes permettent d'aborder de nouvelles questions biologiques pour approfondir certains mécanismes moléculaires et/ou mécaniques.

Mots-clés : phagocytose, internalisation, gouttes d'émulsion, adhésion, mobilité latérale, fonctionnalisation, taille des cibles, densité minimale, contrôle de densité.

Abstract

Phagocytosis by macrophages represents a fundamental process essential for both immunity and tissue homeostasis. The size of targets to be eliminated ranges from small particles as bacteria to large objects as cancerous or senescent cells. Most of our current quantitative knowledge on phagocytosis is based on the use of solid polymer microparticles as model targets that are well adapted to the study of phagocytosis mechanisms that do not involve any lateral mobility of the ligands, despite the relevance of this parameter in the immunological context. The aim of this study is to synthesize a biomimetic material that constitutes a new model system for the study of phagocytosis. We designed monodisperse, laterally mobile IgG-coated emulsion droplets, with different controlled densities of IgGs, that are efficiently and specifically internalized by macrophages through *in-vitro* Fc γ R-mediated phagocytosis. The excellent control of the opsonization density allowed us to measure the minimal IgGs density required to induce an efficient internalization. We also attempted to deepen the understanding of certain mechanical aspects. We show that, contrary to solid polymeric beads, droplet uptake is high even for low IgG densities and is accompanied by the clustering of the opsonins in the zone of contact with the macrophage during the adhesion step. Beyond the sole interest in the design of the material, our results suggest that lateral mobility of proteins at the interface of a target greatly enhances the phagocytic uptake. Thus, emulsion droplets constitute a new interesting target to investigate different biological issues and understand molecular and/or mechanical mechanisms.

Keywords : phagocytosis, internalization, emulsion droplets, adhesion, lateral mobility, functionalization, targets size, minimal density, density control.