

N° d'ordre 42509



Université des Sciences et Technologies de Lille
Ecole Doctorale des Sciences de la Matière, du Rayonnement et de
l'Environnement – SMRE
Unité Matériaux et Transformations

THÈSE

Présentée en vue d'obtenir du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE
Spécialité Molécules et Matière Condensée
Mention Sciences des Matériaux

présentée par Tatiana STARCIUC

Apport de la spectroscopie Raman à l'étude des mécanismes de stabilisation des protéines par les disaccharides et cyclodextrines

Thèse encadrée par Alain HEDOUX
Soutenue le 20 décembre 2017
devant le jury composé de :

Rapporteurs

Prof. Thomas DE BEER
Prof. François PUEL

Professeur à l'Université de Gand
Professeur à Centrale Supélec, Paris

Examineurs

Dr. Viviana CRISTIGLIO
Dr. Pascal VACUS
Prof. Ludovic DUPONCHEL
Prof. Bernard MARTEL
Prof. Alain HEDOUX

Chercheur à l'Institut Laue Langevin, Grenoble
Directeur « Technology Innovation », Sanofi-Pasteur
Professeur à l'Université de Lille, LASIR
Professeur à l'Université de Lille, UMET
Professeur à l'Université de Lille, UMET

Même si cette thèse a un seul auteur, de nombreuses personnes y ont contribué et je ne serai pas arrivée là où j'en suis sans eux.

Tout d'abord, je veux remercier Pr Alain HEDOUX, qui a eu l'idée de proposer cette étude et d'accepter ma candidature parmi des nombreuses autres, qui m'a accueillie au sein de l'UMET et qui a guidé de l'ombre l'avancement de mon travail, qui a su être toujours disponible et toujours à l'écoute, qui a su focaliser mon énergie et orienter mes idées pour qu'elle prennent une forme et un sens, qui a su valoriser mon travail et m'a aidé à le partager avec la communauté scientifique. Une page ne me suffira jamais pour exprimer toute la gratitude et le respect que je vous porte, mais pour résumer, je peux dire que vous m'avez aidé à bâtir la fondation de ma vie professionnelle en tant que chercheur.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe MMT, en commençant par Yannick GUINET pour ses conseils et les discussions enrichissantes qui ne finissaient jamais, pour son accueil et son aide tout au long de mon parcours à l'IUT ; Laurent PACCOU pour sa disponibilité et son aide, Natalia CORREIA qui a été là pour m'expliquer tous les détails techniques et scientifiques de la spectroscopie de relaxation diélectrique et tous les autres membres de l'équipe qui ont fait de ces trois ans passés dans ce laboratoire un agréable séjour.

Les résultats expliqués dans cette thèse n'auraient pas été si originaux sans des collaborations qu'on a pu établir. Tout d'abord je tiens à remercier Juergen Siepmann, directeur de l'unité INSERM U1008 aux Faculté de Pharmacie, Médecine et Chirurgie Dentaire de Lille qui m'a permis d'utiliser le lyophilisateur qui se trouve dans leurs locaux et Hugues FLORIN qui m'a appris à utiliser ce lyophilisateur. Ensuite je remercie Ludovic DUPONCHEL, professeur au LASIR, président du Groupe Français de Chimométrie, qui m'a donné l'idée d'utiliser la chimométrie comme une méthode d'analyse de mes résultats et qui m'a accompagné dans la découverte de ces nouvelles méthodes d'analyse. Bien sûr, je n'oublie pas de remercier Nicolas TABARY et Bernard MARTEL pour les cyclodextrines qu'on a utilisé comme excipient et aussi pour leurs conseils scientifiques qui sont venus à la suite de cette étude. Ensemble, on a réussi à mettre en place un paquet d'outils qui permettra par la suite d'étudier les mécanismes d'interactions des cyclodextrines et des protéines.

J'exprime toute ma gratitude aux deux rapporteurs de ma thèse Pr. Thomas DE BEER et Pr. François PUEL, aussi bien qu'aux quatre examinateurs Dr. Viviana CRISTIGLIO, Dr. Pascal VACUS, encore une fois Pr. Ludovic DUPONCHEL et Pr. Bernard MARTEL, pour avoir accepté évaluer mon travail. Tous vos commentaires et questions ont été très utiles et très pertinents.

Je n'oublie pas de remercier Ben, Sarah, Sché, Luisa, Fred, Joseph, Elena, Paulo, qui sont devenus de mes collègues mes amis et qui ont été toujours là pour m'aider à me détacher du travail. Bien sûr, merci à vous tous pour les discussions scientifiques qu'on avait souvent et qui ont été tant utiles pour moi.

Bien évidemment je tiens à remercier mes amis « du troisième » Ioana, Lucia, Florin, Stefan et Laura, c'est avec vous que j'ai pu parler chaque jour ma langue maternelle, vous avez su remplacer ma famille qui me manquait tant.

Et si on parle de la famille, je remercie Papa, Maman pour le caractère que j'ai pu me construire à côté de vous, pour la liberté que vous m'avez donnée dès petit enfant et pour l'idée que vous avez mis dans ma tête depuis mes cinq ans « t'es la meilleure », la phrase qui m'a aidé à tout surpasser pour ne pas vous décevoir. Un autre membre de la famille que je tiens à remercier dans cette thèse c'est ma sœur, j'ai eu la chance d'avoir la meilleure sœur du monde qui a su être là dans toutes les circonstances, qui a su m'écouter et m'aider coute que coute, qui a su m'encourager quand j'étais à terre et qui a su me donner des conseils indispensables. Merci ma sœur, une énorme partie de ma réussite t'appartient. Un grand merci à mes frères, votre « je ne comprends pas ce que tu fais » m'a appris à vulgariser la recherche ce qui est indispensable pour un bon chercheur. Merci aussi pour votre soutien, même si vous étiez loin vous avez su m'encourager et me motiver à continuer.

APPORT DE LA SPECTROSCOPIE RAMAN A L'ETUDE DES MECANISMES DE STABILISATION DES PROTEINES PAR LES DISACCHARIDES ET CYCLODEXTRINES

L'utilisation fréquente de biomédicaments, composés principalement de protéines recombinantes, nécessite de développer les outils qui permettent de stabiliser les protéines. La lyophilisation est une technique couramment utilisée, dans domaine pharmaceutique, afin de convertir une formulation de protéine de l'état liquide à l'état sec, assurant ainsi une meilleure stabilité à la protéine. Une première partie de cette thèse a consisté à détailler, à l'échelle moléculaire, les mécanismes de bio-préservation des disaccharides pendant une procédure de lyophilisation, et comment une faible quantité de glycérol pouvait exacerber les propriétés bioprotectrices des disaccharides. L'analyse *in-situ* par imagerie Raman des trois étapes d'un cycle de lyophilisation a révélé que l'efficacité bioprotectrice résultait de la combinaison de propriétés physiques liées à la capacité du disaccharide de former un verre (valeur de T_g) et à celle de former un réseau de liaisons hydrogène rigide, caractérisé par des temps de vie des liaisons plus longs. Une seconde partie a été consacrée à l'étude d'un certain type de dérivé de β -cyclodextrines, qui sont des molécules permettant à la fois la libération contrôlée de molécules et d'inhiber des phénomènes d'agrégation. Les analyses Raman de la dénaturation chaude du lysozyme en présence de la HP β CD ont révélé des phénomènes originaux, en particulier un effet déstabilisateur ou stabilisateur suivant une vitesse de chauffe plus ou moins rapide de la solution. Cet effet cinétique a été relié à la capacité de la cyclodextrine à complexer les résidus de la protéine plus ou moins favorisée suivant la vitesse de chauffage.

MOTS CLES : lyophilisation, dénaturation des protéines, bioprotection, spectroscopie Raman, disaccharides, β -cyclodextrines, glycérol, analyse en composantes principales

CONTRIBUTION OF RAMAN SPECTROSCOPY TO THE STUDY OF PROTEIN STABILIZATION MECHANISMS BY DISSACHARIDES AND CYCLODEXTRINS

The frequent use of biopharmaceuticals, mainly composed of recombinant proteins, requires the development of tools for stabilizing proteins. Freeze-drying is a commonly used technique in the pharmaceutical field to convert a liquid protein formulation into the dry state, thus providing better protein stability. A first part of this thesis focused in deciphering, on the molecular scale, the mechanisms of bio-preservation of disaccharides during a freeze-drying cycle, and in understanding how a small amount of glycerol could enhance the bio-protective properties of disaccharides. In situ Raman imaging analyzes, performed during the three steps of freeze-drying cycle revealed that the bio-protective efficiency resulted from the combination of physical properties related to the capacity of the disaccharide to be vitrified (T_g value) with that to form a rigid hydrogen-bond network, characterized by longer lifetime of the H-bonds. A second part has been devoted to the study of β -cyclodextrin derivatives, which can be used, both as drug delivery system and as inhibitor of protein aggregation. Raman analyzes performed during lysozyme thermal denaturation in presence of HP β CD, have revealed original results such as a destabilizing or stabilizing effect depending on the heating rate of the solution. This kinetic effect was related to the capability of cyclodextrins to include the protein residues inside their cage, probably favored by a slow heating.

KEYWORDS : freeze-drying, protein denaturation, Raman spectroscopy, disaccharides, disaccharides, β -cyclodextrins, glycerol, principal components analysis

TABLE DES MATIÈRES

Liste des Abréviations.....	9
Liste des Figures	11
Liste des Tableaux	19
Introduction	21
CHAPITRE 1. Synthèse Bibliographique et Rappels Théoriques.....	25
1.1. Protéines.....	25
1.1.1. Structure des protéines.....	25
1.1.2. Repliement des protéines	28
1.1.3. Stabilité thermodynamique des protéines	30
1.2. Lyophilisation des protéines.....	32
1.2.1. Congélation.....	34
1.2.2. Séchage primaire.....	36
1.2.3. Séchage secondaire	37
1.3. Bioprotection	38
1.3.1. Les carbohydrates	39
1.3.2. Mécanismes de bioprotection	39
Références	45
CHAPITRE 2. Spectroscopie Raman des Systèmes Biomoléculaires	47
2.1. L'effet Raman.....	48
2.2. Le spectromètre Raman	51
2.3. Spectres Raman des systèmes biomoléculaires.....	53
2.3.1. Spectre Raman basse fréquence (0-500 cm ⁻¹)	54
2.3.2. Spectre Raman moyennes fréquences (500-1800 cm ⁻¹)	55
2.3.3. Spectres Raman fréquences (2000-3800 cm ⁻¹)	61
2.4. Analyses multivariées des données spectrales.....	61
2.4.1. Analyse en Composantes Principales.....	62
2.4.2. La résolution multivariée des courbes (MCR-ALS)	66
2.5. Synthèse des études récentes développées dans l'équipe sur la stabilité des protéines lors d'une procédure de lyophilisation.....	69
2.5.1. Lyophilisation de formulations protéine/eau.	69
2.5.2. Lyophilisation de formulations protéine/eau/tréhalose.	72
Références	74
CHAPITRE 3. Etude de la Stabilité des Protéines à l'Etat Solide.....	77

3.1. Etude des produits à la fin du processus de lyophilisation : influence de la quantité du glycérol sur l'action bioprotectrice des disaccharides pendant la lyophilisation.....	79
3.1.1. Résultats obtenus sur les formulations Lysozyme-Tréhalose-Glycérol...	82
3.1.2. Analyse de l'influence du glycérol sur les propriétés bioprotectrices du saccharose.	89
3.1.3. Synthèse des analyses des lyophilisats par imagerie Raman.	92
3.2. Mécanismes de dénaturation et bioprotection du lysozyme, analysées <i>in-situ</i> , pendant un cycle de lyophilisation, par μ -spectroscopie Raman.....	93
3.2.1. Distributions des espèces chimiques dans les matrices solides	96
3.2.2. Analyse de la zone spectrale de la bande AI	103
3.2.3. Analyse de la bande AIII-f.....	109
3.2.4. Analyses thermogravimétrique	110
3.2.5. Synthèse des résultats.....	111
Références	114
CHAPITRE 4. Etude de la Stabilité des Protéines en Solution en Présence des Dérivés de β -cyclodextrines	117
4.1. Caractérisation de la dénaturation chaude du lysozyme par analyse calorimétrique.....	120
4.2. Analyse de l'influence de HP β CD sur la dénaturation chaude du lysozyme par spectroscopie Raman.....	122
4.2.1. Analyse de la bande AI	123
4.2.2. Analyse de la région spectrale 800 – 1400 cm ⁻¹	125
4.3. Lyophilisation des mélanges lysozyme et lysozyme-HP β CD	130
4.4. Discussion des résultats obtenus sur le lysozyme	136
4.5. Analyse de l'influence de HP β CD sur la dénaturation chaude de la β -lactoglobuline.	138
Références	143
Conclusion générale.....	147

LISTE DES ABREVIATIONS

Chapitre 1

LHs	liaison hydrogène
MG	« molten globule »
N	natif
U	« unfolded »
D	dénaturé
PVP	poly-vinyl-pirrolidone

Chapitre 2

Ar	argon
CCD	« charge coupled device »
H ₂ O	eau
D ₂ O	eau déutéré
λ	longueur d'onde
$\langle u^2 \rangle$	déplacement quadratique moyen
AI	bande Raman amide I
IR	infrarouge
AIII	bande Raman amide III
ACP	analyse en composantes principales
CP	composante principale
MCR-ALS	la résolution multivariée des courbes
EFA	analyse factorielle évolutive
β LG	β -lactoglobuline

Chapitre 3

C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	tréhalose (saccharose)
PLS	« partial Least Squares »
LTG_0	échantillon lysozyme – tréhalose, sans glycérol
LTG_2	échantillon lysozyme – tréhalose – glycérol, 2,5 % en masse par rapport au tréhalose
LTG_5	échantillon lysozyme – tréhalose – glycérol, 5 % en masse par rapport au tréhalose
LTG_8	échantillon lysozyme – tréhalose – glycérol, 8 % en masse par rapport au tréhalose
CP1	première composante principale
CP2	deuxième composante principale
CP3	troisième composante principale
CP4	quatrième composante principale
AIII-h	bande Raman amide III attribuée aux hélices α
AIII-f	bande Raman amide III attribuée aux feuillets β
LSG_0	échantillon lysozyme – saccharose, sans glycérol

LSG_5	échantillon lysozyme – saccharose – glycérol, 5 % en masse par rapport au saccharose
Tre	tréhalose
Lys	lysozyme
I _T /I _L	rapport des intensités intégrées des bandes du tréhalose et de lysozyme, respectivement
I _{glace} /I _{tot}	rapport des intensités intégrées des bandes de la glace et celle du spectre entier des vibrations d'étirements O-D
L	formulation lysozyme – eau lyophilisée
LT	formulation lysozyme – eau – tréhalose lyophilisée
LTG	formulation lysozyme – eau – tréhalose – glycérol (5 %) lyophilisée
H	hydrogène

Chapitre 4

CD (CDs)	cyclodextrines
Trp	tryptophane
Tyr	tyrosine
Phe	phenylalanine
β-CDs	β-cyclodextrines
α-CDs	α -cyclodextrines
γ-CDs	γ -cyclodextrines
HP	hydroxy propyl
HPβCD	hydroxy propyl β – cyclodextrines
L	lysozyme
βLG	β-lactoglobuline
LW _h	solution lysozyme – H ₂ O
LW _h HPβCD10	solution lysozyme – H ₂ O – HPβCD 10 %
LW _h HPβCD20	solution lysozyme – H ₂ O – HPβCD 20 %
LW _d	solution lysozyme - D ₂ O
LW _d βCD10	solution lysozyme – D ₂ O – HPβCD 10 %
LW _d βCD20	solution lysozyme – D ₂ O – HPβCD 20 %
CaF ₂	fluorure de calcium
LDH	lactate déshydrogénase
BSA	albumine de sérum bovin
LW _d -HPβCD_FD1(2)	solution lysozyme – H ₂ O – HPβCD 10 % lyophilisée
LW _d -T	solution lysozyme – H ₂ O – tréhalose lyophilisée
βLGW _h	solution lysozyme – H ₂ O – βLG
βLGW _h CD10	solution lysozyme – H ₂ O – βLG – HPβCD 10 %

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

- FIGURE 1.1 : *Représentation de la formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés. R_i représente les résidus des acides aminés.* 26
- FIGURE 1.2 : *Organisation hiérarchique de la structure d'une protéine* 27
- FIGURE 1.3 : *Paysage énergétique de repliement d'une protéine selon la ref.1.* 29
- FIGURE 1.4 : *Courbe de stabilité d'une protéine. L'intervalle de stabilité est déterminé par la température de dénaturation froide T_{Dc} et la température de dénaturation chaude T_{Dh} . Cette courbe passe par un maximum à la température de stabilité maximale T_{ms}* 31
- FIGURE 1.5 : *Diagramme d'état de l'eau pure montrant le chemin suivi lors des transformations de phases subies par l'eau lors d'un cycle de lyophilisation : congélation (1), sublimation (2) et désorption (3).....* 32
- FIGURE 1.6 : *Diagramme de phase d'une solution tréhalose-eau contenant 10% de tréhalose au départ à température ambiante. La courbe des valeurs de T_g est obtenue à partir de quelques mesures de T_g et de leur ajustement par la relation de Gordon-Taylor.....* 34
- FIGURE 1.7 : *Images de microscope électronique à balayage de (a) l'Echiniscus granulatus et (b) Selaginella lepidophylla à l'état deshydratée et actif. .* 38
- FIGURE 1.8 : *Représentations schématiques de l'interaction préférentielle (à gauche) et de l'exclusion préférentielle (à droite) de solutés à la surface d'une protéine en solution aqueuse. Les disques bleus représentent les molécules d'eau, ceux en rouge les molécules de solutés. Le grand cercle en orange symbolise une protéine globulaire et le cercle en tirets autour de la membrane d'équilibre de dialyse (ref 33)* 40
- FIGURE 1.9 : *Schéma indiquant l'effet de solutés (disques verts) en concentration 1 :4 sur le processus de nucléation de l'eau. Les flèches représentent la direction de diffusion des molécules d'eau et leur longueur indique la vitesse de diffusion. Etant donné que des solutés tels que les dissaccharides diffusent beaucoup moins rapidement que l'eau, ils sont considérés immobiles sur ce schéma. Les cercles représentent le rayon critique de nucléation. (ref. 16).....* 41
- FIGURE 1.10 : *Représentation schématique de la dessiccation d'une membrane lipidique avec et sans tréhalose (ref. 33).....* 43
- FIGURE 1.11 : *Modèle d'interaction du tréhalose (à ~ 18% en masse, représenté en bleu) avec le lysozyme (représenté de manière schématique en orange)*

proposé par Lins et al.³⁰ à partir de résultats de simulation numérique de dynamique moléculaire. Le tréhalose initialement réparti de manière homogène s'agrége à proximité de la surface de la protéine et piège son eau d'hydratation (ref. 33). 44

Chapitre 2

FIGURE 2.1 : Représentation schématique des différentes transitions entre niveaux d'énergie d'une molécule donnée. Les états fondamental, virtuel et excité sont désignés respectivement par E_F , E_V , E_E . (a) Absorption infrarouge, (b) diffusion Rayleigh, (c) diffusion Stokes, (d) diffusion anti-Stokes, (e) fluorescence. 49

FIGURE 2.2 : Représentation schématique des éléments d'un spectromètre (à gauche) et le spectromètre Raman InVia Renishaw utilisé dans le cadre de cette thèse. 51

FIGURE 2.3 : Détermination du volume analysé en fonction des caractéristiques de l'objectif. 52

FIGURE 2.4 : Spectre Raman d'une solution binaire lysozyme- D_2O (10 % massique), enregistré à la température ambiante. 53

FIGURE 2.5 : Principaux mouvements impliqués dans les bandes amides I et III. ... 55

FIGURE 2.6 : Spectres Raman d'une solution 10% de lysozyme et de β -lactoglobuline dans l'eau (bleu) et dans l'eau lourde (rouge), enregistrés à température ambiante. 55

FIGURE 2.7 : Représentation de la région de la bande AI d'une solution de lysozyme dissout dans D_2O à l'état natif (20°C) et à l'état dénaturé (90°C). (b) La procédure d'ajustement permettant de déterminer la fréquence du maximum d'intensité de la bande AI. 56

FIGURE 2.8 : Dénaturation thermique du lysozyme dissout dans l'eau lourde. (a) représentation de la région de la bande AI, du lysozyme, à l'état natif (trait rouge), à l'état « molten globule » (trait bleu) et à l'état dénaturé (100°C). (b) L'évolution de la position de la bande AI en fonction de la température, (1), (2) et (3) correspond à trois étapes de dénaturation chaude de la protéine en solution. 57

FIGURE 2.9 : Comparaison des courbes de dénaturation obtenues par spectroscopie Raman (cerclés vides) et analyse enthalpique différentielle (trait plein vert foncé). 59

FIGURE 2.10 : Méthode calcul du coefficient de similarité entre les spectres enregistrés dans l'échantillon L pendant la lyophilisation. (a) Comparaison des spectres collectés après congélation (état natif) et après séchage primaire (état dénaturé). La zone rouge correspond à la superposition des deux spectres (I_0). (b) Le spectre différence des deux spectres présentés sur la

figure (a). La zone bleue correspond à I_{diff} utilisé pour le calcul de coefficient r .	60
FIGURE 2.11 : Représentation géométrique des spectre Raman à trois longueur d'onde, comme un nuage de point dans un espace λ .	63
FIGURE 2.12 : Représentation schématique du principe de l'analyse en composante principale. (a) représentation du nuage de point dans un nouvel espace ; (b) décomposition de la matrice initiale à l'aide de l'analyse en composantes principales.	64
FIGURE 2.13 : Exemple d'analyse ACP sur une cartographie correspondant à une région 60X60 μm , balayée point par point, chaque point correspondant à un spectre numéroté en (a) ; les 100 spectres collectés durant cette cartographie sont tracés en (b). L'image des « scores » suivant la première composante principale résultant de l'ACP est présentée en c) et en d) est tracé le « loading » de la CP1, comme une combinaison linéaire des variables d'origine assimilable à une sorte de spectre.	65
FIGURE 2.14 : Représentation schématique de l'algorithme de calcul de la MCR-ALS.	67
FIGURE 2.15 : Cycles de lyophilisation d'une solution de protéine en absence de tréhalose (a) et en présence de tréhalose(b). (1) correspond à la congélation de la solution, (2) au séchage primaire (sublimation de la glace) et (3) au séchage secondaire (ref.17).	70
FIGURE 2.16 : Evolution du spectre de la région des bandes AI et AIII au cours des étapes de la lyophilisation de la solution $\beta LG/D_2O$. Les spectres collectés pendant la procédure de lyophilisation sont comparés à celui de la solution $\beta LG/D_2O$.	71
FIGURE 2.17 : (a) Comparaison des différences de spectres entre l'état natif de βLG et les états dénaturés par lyophilisation et par chauffage de la même solution. (b) Spectres Raman collectés simultanément dans les régions de la bande AI et celle des vibrations d'étirement des liaisons O-D, durant la cinétique de sublimation à $-45^\circ C$ du produit congelé ($\beta LG/D_2O$). Les pourcentages reportés sur cette figure correspondent à la proportion de glace déterminée par intégration de la bande située dans la zone colorée. L'insert supérieur gauche montre les spectres de la bande AI pour une proportion de 100 % et 0.4 % de glace dans le volume analysé. (c) Evolution de la fréquence de la bande AI en fonction de la proportion de glace durant la cinétique de sublimation, comparée au glissement déterminée après le second séchage de la solution $\beta LG/D_2O$.	72

Chapitre 3

FIGURE 3.1 : Cycle typique de lyophilisation des formulations lyophilisées avec le lyophilisateur Martin-Christ type Epsilon 2-4D (1), (2) et (3) correspondent

- aux 3 étapes de lyophilisation : congélation, séchage primaire et secondaire, respectivement. 80
- FIGURE 3.2 : Spectres Raman collectés dans trois échantillons différents (lysozyme, tréhalose amorphe et lysozyme/tréhalose lyophilisé) dans les zones spectrales analysées. (a) représente la zone spectrale 1200-1500 cm^{-1} , principalement composée des bandes distinctives du tréhalose (1360 et 1380 cm^{-1}) permettant de sonder la présence du tréhalose, et des bandes AIII du lysozyme ; (b) représente la zone spectrale de la bande AI qui permet à la fois de sonder la présence de la protéine dans la matrice solide et d'étudier les changements de la structure secondaire observée à la fin de la lyophilisation. Aucune contribution du tréhalose n'est observée dans cette zone..... 81
- FIGURE 3.3 : (a) Les scores de la CP1, CP2, CP3 et CP4 obtenus après une ACP réalisée simultanément sur des cartographies enregistrées à la fin de la lyophilisation des mélanges lysozyme-tréhalose-eau et lysozyme-tréhalose-glycérol-eau à différentes fraction massique de tréhalose-glycérol (0, 2.5, 5 et 8 %). (b) Les composantes principales correspondantes aux images des scores. 83
- FIGURE 3.4 : (a) Images représentant la distribution des contributions pures 1, 2 et 3 dans chaque spectre de quatre cartographies collectées dans quatre échantillons (lysozyme-tréhalose, lysozyme-tréhalose-glycérol 2.5 %, lysozyme-tréhalose-glycérol 5 % et lysozyme-tréhalose-glycérol 8 %). (b) Les spectres des trois contributions 1 (trait rouge), 2 (trait bleu) et 3 (trait noir) extraits par MCR-ALS. 86
- FIGURE 3.5 : (a) Les spectres des contributions pures avec (b) leurs cartes de concentrations associées obtenues à la fin d'une MCR-ALS réalisée sur deux échantillons (lysozyme-saccharose et lysozyme-saccharose-glycérol 5%). 90
- FIGURE 3.6 : Position de la bande AI déterminée à la fin du cycle de lyophilisation dans les mélanges (a) lysozyme/sucrose ($\blacktriangle$), lysozyme/sucrose/glycérol (Δ) et (b) lysozyme/tréhalose ($\bullet$) et lysozyme/tréhalose/glycérol ($\circ$). Les traits pleins représentent la position moyenne de la bande AI dans l'échantillons LSG_0 et LSG_5, tandis que les lignes en pointillé représente la position moyenne de la bande AI dans les échantillons LTG_0 et LTG_5. Les flèches représentent l'effet du glycérol sur l'action bioprotectrice du tréhalose ($\Delta\omega T$) et saccharose ($\Delta\omega S$). 91
- FIGURE 3.7 : Cycle typique de lyophilisation d'une formulation analysé. (1), (2) et (3) correspondent aux étapes de lyophilisation ; congélation, séchage primaire et secondaire, respectivement. Map 1, 2 et 3 correspondent aux temps d'acquisition d'une cartographie Raman après chaque étape de lyophilisation..... 94
- FIGURE 3.8 : Spectres Raman dans les zones spectrales analysées. (a) Spectres des formulations lysozyme/eau (trait plein) et lysozyme/eau/tréhalose (trait en

pointillée) enregistré après la congélation dans la zone spectrale de l'empreinte moléculaire de la protéine. Tre et Lys représente les signatures Raman du tréhalose et lysozyme et ont été utilisées pour analyser la présence de ces espèces sur les images Raman. (b) Spectres enregistrés après congélation (trait plein) et sublimation de la glace (trait en pointillé) dans la zone des vibrations d'étirement des liaisons O-D. L'aire colorée I_{glace} correspond à la signature Raman de la glace, utilisée pour détecter la présence de la glace dans les zones analysées. 95

FIGURE 3.9 : Panel d'images obtenues après l'étape de congélation de la solution Lys+D₂O+Treh. (a) La distribution de la glace dans la zone analysée. (b) La distribution du tréhalose par rapport au lysozyme. (c) et (d) spectres distinctives des zones riches en glace (trait noir) et riche en sucre (trait rouge). 97

FIGURE 3.10 : Panel d'images obtenues après l'étape de congélation de la solution Lys+D₂O+Treh+Gly (LTG). (a) La distribution de la glace dans la zone analysée. (b) La distribution du tréhalose par rapport au lysozyme. (c) et (d) spectres distinctives des zones riches en glace (trait noir) et riche en sucre (trait rouge). 99

Figure 3.11 : Panel d'images Raman obtenues par calcul I_T/I_L sur des cartographies enregistrées après le séchage primaire (a, b) et secondaire (c, d), qui reflète la distribution relative du tréhalose par rapport au lysozyme dans la formulations LT (a, c) et LTG (b, d). 100

FIGURE 3.12 : Histogrammes représentant les distribution des valeurs du rapport I_T/I_L obtenues pour les échantillons LT (a, b, c) et LTG (d, e, f) après la congélation (a, b), séchage primaire (c, d) et séchage secondaire (e, f). Les traits rouges représentent l'ajustement des histogrammes de distributions des valeurs à une loi statistique en utilisation la méthode Parzen-Rosenblatt (estimation par noyau). 102

FIGURE 3.13 : Etude des changements de la bande AI après la congélation des formulations L, LT et LTG. (a) La position de la bande AI déterminée par fit dans toutes les formulations congelées comparée avec la position de la bande AI dans la solution de lysozyme seule non congelée. (b) Comparaison de la forme de la bande AI d'un spectre enregistré après congélation de L, LT et LTG et la solution de lysozyme seule avant la congélation. 103

FIGURE 3.14 : La fréquence de la bande AI déterminée après le séchage primaire (a) et secondaire (b) dans les échantillons L (●), LT (◆) et LTG (■). Le trait rouge indique la position de la bande après la congélation, considérée comme l'état natif de la protéine, vue qu'aucune dénaturation à basse température n'a pas été observée. Les traits bleue et verte sur la figure (b) représentent la position de la bande AI après le séchage primaire dans LT et LTG, respectivement. 105

FIGURE 3.15 : *Panel d'images Raman correspondant à la répartition des valeurs de r calculées selon l'Eq.1 pour L (a, d), LT (b, e) et LTG (c, f) qui reflète la distribution du degré de dénaturation de la protéine après le séchage primaire (a, b, c) et secondaire (d, e, f) de ces trois formulations.....* 107

FIGURE 3.16 : *Moyennes des spectres collectés lors des cartographies réalisées après la congélation (a) et à la fin de la lyophilisation (b), dans les formulations lysozyme-D₂O (L, trait rouge), lysozyme -tréhalose-D₂O (LT, trait bleue) et lysozyme-tréhalose-glycérol-D₂O (LTG, trait vert). La zone sélectionnée par le cadre noir correspond à la région des bandes AIII dans les structures en feuillets β (AIII-f).* 110

FIGURE 3.17 : *Courbe d'ATG mesurant les pertes de masses de trois échantillons ; L (trait rouge), LT (trait bleue) et LTG (trait noire) au cours d'un chauffage à 5 K/min, à la fin d'une procédure de lyophilisation.* 111

Chapitre 4

FIGURE 4.1 : (a) *La structure des cyclodextrines et leurs dimensions géométriques. (b) Représentation schématique du mécanisme de complexation des entités hydrophobes par les cyclodextrines, proposé par Matsubara et al.⁵¹ et Davis et al.⁵².* 118

FIGURE 4.2 : *Analyse de la stabilité du lysozyme en absence et en présence de 10 et 20 % en masse de HP β CD. (a) Thermogrammes des formulations à base de lysozyme dissout dans H₂O en absence (LW_h) et en présence de 10 % (LW_hHP β CD10) et 20 % (LW_hHP β CD20) de HP β CD. (b) Courbes de stabilité du lysozyme tracées à partir de la relation (4.1) pour les formulations dans lesquelles le lysozyme est dissout dans H₂O. La comparaison entre ces courbes obtenues à partir des analyses des endothermes de dénaturation du lysozyme dissout dans H₂O et D₂O est présentée dans l'insert. (c) Courbes de stabilité du lysozyme tracées pour les formulations dans lesquelles le lysozyme est dissout dans D₂O. ..* 121

FIGURE 4.3 : *Spectres dans la région correspondant à l'empreinte moléculaire des composés des formulations de lysozyme dissout dans D₂O en absence de cyclodextrine (LW_d) et en présence de 10 % de cyclodextrine (LW_dHP β CD10) de la cyclodextrine dissout dans D₂O avec une concentration massique de 10 %.* 123

FIGURE 4.4 : *Dépendance en température de la position de la bande AI, dans les échantillons pour lesquels le lysozyme est dissout dans l'eau lourde en absence de cyclodextrine (LW_d) et en présence de 10 % (LW_dHP β CD10) et 20 % (LW_dHP β CD20) de cyclodextrine. Ces positions ont été déterminées par une procédure d'ajustement décrite dans le chapitre 2 en utilisant le logiciel de traitement des données Wire, l'écart type moyen sur la détermination des positions de la bande AI est représenté par la barre d'erreur sur le symbole de l'échantillon LW_d dans la légende de la figure.* 124

- FIGURE 4.5 : Spectres collectés lors de la procédure de chauffe des formulations de lysozyme. (a) Les spectres de lysozyme dissout dans D₂O collectés dans l'état natif (N) à 25 °C, dans l'état « molten globule » (MG) à 75 °C et dans l'état dénaturé (D) à 100 °C, comparés au spectre du lysozyme dissout dans H₂O collecté à 25 °C dans l'état natif (N). Les flèches verticales grises en trait épais orientées vers le bas de la figure montre la décroissance de l'intensité des bandes AIII, alors que celles orientées vers le haut montrent la croissance concomitante de l'intensité dans la région AIII. Ces variations corrélées ont été associées aux échanges isotopiques NH/ND. (b) Les spectres du lysozyme dissout dans D₂O en absence de cyclodextrine (LW_d) dans l'état natif (N) et en présence de 10 % de HPβCD (LW_dHPβCD10) collectés dans les états (N), (MG) et (D). (c) Spectres du lysozyme dissout dans H₂O en absence de cyclodextrine (décalés vers le bas) et en présence de 10 % de HPβCD (décalés vers le haut) dans les états (N) et (D). 126
- FIGURE 4.6 : Dépendances en température des intensités intégrées déterminées pour les formulations de lysozyme dissouts dans H₂O en absence (LW_h) et en présence de 10 % de HPβCD (LW_hHPβCD10), (a) dans la zone spectrale 915 - 950 cm⁻¹ et (b) dans la zone spectrale 950 - 980 cm⁻¹. 127
- FIGURE 4.7 : Représentation des résidus (a) tryptophan et (b) leucine 128
- FIGURE 4.8 : Dépendances en température des intensités intégrées déterminées pour les formulations de lysozyme dissouts dans H₂O en absence de cyclodextrine (LW_h) et en présence de 10 % de HPβCD (LW_hHPβCD10). (a) dans la zone spectrale 860-890 cm⁻¹, où est détectée la bande W17. (b) dans la zone spectrale 1220-1260 cm⁻¹, où est détectée la bande AIII dans les structures en feuillets β. Les flèches verticales permettent de visualiser l'amplitude de la variation d'intensité. Les traits horizontaux hachés sont des guides pour l'œil afin de visualiser la température à partir de laquelle est détectée une variation significative de l'intensité..... 129
- FIGURE 4.9 : La fréquence de la bande AI déterminée après une procédure de lyophilisation dans plusieurs formulations contenant du lysozyme lyophilisé en absence d'excipients (LW_d), en présence de 10 % de HPβCD (LW_d-HPβCD_FD1 et LW_d-HPβCD_FD2) et en présence de 10 % de tréhalose (LW_d-T). 131
- FIGURE 4.10 : Dépendance en température de la position de la bande AI, déterminée sur des spectres collectés lors d'une chauffe d'une solution à base de lysozyme, cyclodextrine et D₂O non lyophilisée (LW_d-HPβCD) et deux solutions lyophilisées et réhydratées dans D₂O (LW_d-HPβCD_FD1 et LW_d-HPβCD_FD2). Ces positions ont été déterminées par une procédure d'ajustement décrite dans le chapitre 2 en utilisant le logiciel de traitement des données Peakfit, l'écart type moyen sur la détermination des positions de la bande AI est représenté par la barre d'erreur sur les symboles. 132
- FIGURE 4.11 : (a) Les spectres moyens de 200 spectres Raman collectés à la température ambiante dans une solution lysozyme-D₂O-HPβCD, non-

lyophilisée (avant lyophilisation) et une solution similaire lyophilisée et réhydratée dans D₂O (après lyophilisation). (b) Le spectre différence entre les deux spectres représentés sur la figure 4.11a. 135

FIGURE 4.12 : (a) Courbes de stabilité du β LG tracées à partir de la relation (4.1) pour les formulations dans lesquelles β LG est dissout dans H₂O, en absence (β LG- W_h) et en présence de 10 % en masse de HP β CD (β LG- W_h -HP β CD). (b) Les spectres de ces deux formulations collectés dans l'état natif (N) à 25 °C et dans l'état dénaturé (D) à 100 °C. 139

FIGURE 4.13 : Dépendance en température de la position de la bande AI, dans β LG dissout dans H₂O (a) et dans D₂O, en absence (β LG- $W_{h/d}$) et présence de 10 % de HP β CD (β LG- $W_{h/d}$ -HP β CD). Ces positions ont été déterminées par une procédure d'ajustement décrite dans le chapitre 2 en utilisant le logiciel de traitement des données Wire..... 139

FIGURE 4.14 : Dépendances en température des intensités intégrées déterminées pour les formulations de β LG dissouts dans H₂O en absence de cyclodextrine (β LG- W_h) et en présence de 10 % de HP β CD (β LG- W_h -HP β CD10) dans la zone spectrale 1220-1260 cm⁻¹, où est détectée la bande AIII dans les structures en feuillets β . Les flèches verticales permettent de visualiser l'amplitude de la variation d'intensité. Les traits horizontaux hachés sont des guides pour l'œil afin de visualiser la température à partir de laquelle est détectée une variation significative de l'intensité. 141

LISTE DES TABLEAUX

TABEAU 3.1: Paramètres d'ajustement des bandes dans la zone spectrale de la bande AI	87
TABEAU 3.2 : Les valeurs moyennes de la position et de glissement de la fréquence de la bande AI après chaque étape de la lyophilisation dans les formulations L, LT et LTG	106
TABEAU 4.1 : Paramètres thermodynamiques caractéristiques de la dénaturation chaude du lysozyme dissout dans H ₂ O en absence de cyclodextrine (LW _h) et en présence de 10% (LW _h HPβCD10), et de 20% (LW _h HPβCD20) de HPβCD	120
TABEAU 4.2 : Paramètres thermodynamiques caractéristiques de la dénaturation chaude du lysozyme dissout dans D ₂ O en absence de cyclodextrine (LW _d) et en présence de 10% (LW _d HPβCD10), et de 20% (LW _d HPβCD20) de HPβCD	121
TABEAU 4.3 : Températures distinctives des deux transformations identifiées par spectroscopie Raman. $T_m^{MG}^{\circ}C$: température à demi-transformation de (N)→(MG) identifiée via les échanges isotopiques. $T_m^U^{\circ}C$: température à demi-transformation de (MG)→(D) où « U » symbolise l'état déplié de la structure secondaire (Unfolded state).....	125
TABEAU 4.4 : Températures distinctives des deux transformations identifiées par spectroscopie Raman. $T_m^{MG}^{\circ}C$: température à demi-transformation de (N)→(MG) identifiée via les échanges isotopiques. $T_m^U^{\circ}C$: température à demi-transformation de (MG)→(D) où « U » symbolise l'état déplié de la structure secondaire (Unfolded state).....	133
TABEAU 4.5 : Les bandes Raman correspondant aux modes des vibrations internes des résidus hydrophobes Trp, Tyr et Phe qui peuvent former des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines	134
TABEAU 4.6 : Paramètres thermodynamiques caractéristiques de la dénaturation chaude de βLG dissout dans H ₂ O en absence de cyclodextrine (βLG-W _h) et en présence de 10% (βLG-W _h -HPβCD10), de HPβCD	138
TABEAU 4.7 : Températures distinctives des deux transformations identifiées par spectroscopie Raman. $T_m^{MG}^{\circ}C$: température à demi-transformation de (N)→(MG) identifiée via les échanges isotopiques. $T_m^U^{\circ}C$: température à demi-transformation de (MG)→(D) où « U » symbolise l'état déplié de la structure secondaire (Unfolded state).....	140

INTRODUCTION

L'utilisation des produits biologiques (produits par biotechnologies) n'est pas récente puisque les premiers vaccins datent de la fin du XVIII^{ème} siècle. C'est l'apparition des produits recombinants, issus du génie génétique dans les années 1980 qui engendra l'essor des biomédicaments, en grande majorité composés de protéines recombinantes. L'utilisation de ces produits biotechnologiques s'est étendue aux traitements de pathologies pour lesquels il n'y avait pas de soin, tels que cancers, maladies rares, etc.

La formulation du biomédicament, sa vectorisation (qui consiste à associer un vecteur à la protéine pour amener le principe actif à sa cible) et son conditionnement (afin d'assurer sa conservation) sont des étapes incontournables pendant lesquelles la protéine doit conserver ses fonctions biologiques. Le succès pour développer un (bio)médicament à partir d'une nouvelle (bio)molécule, est étroitement lié à la stabilité de l'état physique du produit qui conditionne à la fois celle de la (bio)molécule, mais aussi la libération de celle-ci. De nombreuses protéines à fort potentiel thérapeutique, ne peuvent être utilisées parce qu'elles sont très labiles en solution. Pour contourner ce problème, la protéine peut être conservée à l'état sec.

Une méthode couramment utilisée pour convertir une formulation de protéine de l'état liquide à l'état sec est la *lyophilisation*, celle-ci étant considérée comme relativement douce pour la protéine. Pourtant, la protéine est exposée à plusieurs sources de stress (formation de cristaux de glace, basse température, variation brusque de pH, concentration élevée, déshydratation) à chaque étape de ce processus. De ce fait, on utilise une quantité importante d'excipients (souvent de manière empirique) dont plusieurs pour leurs propriétés bioprotectrices spécifiques à un type de stress (cryoprotecteur, lyoprotecteur). Pourtant, une perte d'activité est décelée dans de nombreux cas en fin de cycle. Une quantité de protéine doit parfois être ajoutée dans la formulation pour pallier la perte d'activité due à la dégradation de la protéine, et respecter les dosages nécessaires au traitement. La lyophilisation est un procédé très onéreux, consommateur en énergie (lié au refroidissement, chauffage, mise sous vide de chambres qui peuvent être de volume important) et en temps (la durée d'un cycle pouvant atteindre une semaine). Augmenter la quantité de protéines

pour pallier les pertes d'activité représente un surcoût supplémentaire pour la production du biomédicament. La recherche d'agents bioprotecteurs efficaces est donc très importante d'un point de vue économique pour permettre d'améliorer certains traitements et aussi à rendre ces traitements accessibles à une large population. Dans certains cas, les produits « biotechs », tels que certains vaccins, sont conservés à l'état liquide mais sous certaines conditions de température (généralement assez basse, vers 4 °C), ce qui rend difficile leur transport dans des zones géographiques lointaines de l'endroit de fabrication. La stabilisation de ces produits biotechs permettrait donc d'assouplir les conditions de transport et de rendre moins coûteux ces produits.

Notre démarche, relativement fondamentale, consiste à comprendre (dans une première étape) les mécanismes par lesquels la protéine se dénature. Cette étude est traitée avec les méthodes d'analyse de transformation de phases avec les outils utilisés dans le domaine de la physique de la matière condensée. Dans une seconde étape, les mécanismes physiques de stabilisation d'agents bioprotecteurs sont décryptés en étudiant comment ces agents modifient les transformations de phases. Les formulations de protéines analysées sont toujours très simples, composées d'une protéine modèle, du solvant de base (H_2O et/ou D_2O), de l'agent bioprotecteur. Nous avons étudié principalement l'effet bioprotecteur des disaccharides (et plus particulièrement du tréhalose), largement utilisés dans les procédures de lyophilisation, car ils sont à la fois cryoprotecteurs et lyoprotecteurs.

Ces problèmes sont traités dans l'équipe Matériaux Moléculaires et Thérapeutiques depuis une dizaine d'années. Les techniques d'analyse de ces formulations ont été développées dans le cadre de l'ANR BIOSTAB (2008-2012). Des premières informations ont été obtenues en combinant des analyses Raman, des analyses calorimétriques et des simulations de dynamique moléculaire. Ces informations ont été le point de départ des investigations menées dans cette thèse et seront décrites dans le **Chapitre 2**. Ces études sont réalisées systématiquement sur des protéines modèles (en particulier : lysozyme et β -lactoglobuline) qui présentent l'intérêt d'avoir des structures déterminées, et des bandes de vibrations associées à ces structures qui ont été préalablement identifiées dans les spectres Raman.

Dans le cadre de cette thèse nos études se sont focalisées sur deux aspects de la bioprotection. Le premier concerne la stabilité des protéines lors d'une procédure

de lyophilisation. La micro (μ) – spectroscopie Raman a été utilisée pour mieux comprendre les mécanismes de stabilisation de protéines par des disaccharides pendant un cycle de lyophilisation, et d'analyser comment une très faible quantité de glycérol, ajoutée au disaccharide, pouvait améliorer de manière significative l'efficacité bioprotectrice de ces matériaux. Le traitement des données expérimentales obtenues par cartographie (balayage de zones d'échantillon) a été réalisé à partir de méthodes classiques telles que l'intégration de certains domaines spectraux et les méthodes d'ajustement de spectres, et à partir de méthodes d'analyses multivariées telles que l'analyse par composantes principales et la résolution multivariées des courbes. Les deux types de méthodes ont permis de mettre en évidence des modifications structurales très fines de la protéine et de fournir des descriptions détaillées de mécanismes de stabilisation de la protéine. Cette partie fait l'objet du **Chapitre 3**.

Le second objectif consistait à analyser les propriétés bioprotectrices des cyclodextrines (CD), considérées comme des molécules très prometteuses dans le domaine pharmaceutique, car elles peuvent être utilisées comme système à libération contrôlée (avec leur capacité d'encager une molécule ou partie de molécule) et comme inhibiteur d'agrégation de protéines. Cependant des études préalables ont montré une tendance de ces molécules à déstabiliser les protéines. Une étude de dénaturation chaude des protéines a été réalisée pour différentes concentrations de CD, afin de comprendre l'influence de ces molécules sur la stabilité des protéines. Ces études ont été initiées en choisissant un type de CD (HP β CD). Les résultats obtenus pourront guider le choix d'autres CDs pour orienter de futures analyses sur ce type de molécules. Ces investigations font l'objet du **Chapitre 4**.

CHAPITRE 1.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ET RAPPELS THEORIQUES

1.1. Protéines

Les protéines sont des biomolécules qui de manière naturelle sont synthétisées à l'état déplié, conformation dans la quelle leurs fonctions ne sont pas actives. Elles présentent alors une séquence linéaire d'acides aminés. Elles se replient ensuite de manière instantanée prenant une conformation dans laquelle leurs fonctions deviennent actives. Elles s'organisent alors en plusieurs niveaux de structure hiérarchisés, présentés ci-dessous.

1.1.1. Structure des protéines

Un acide aminé c'est un acide carboxylique ($-\text{COOH}$) qui possède un groupement amide ($-\text{NH}_2$), de formule générale HOOC-R-NH_2 . Il existe 21 acides aminés naturels, qui selon la nature de leur chaîne latérale, possèdent des propriétés physico-chimiques différentes. On distingue, alors, des acides aminés :

- chargés négativement (l'acide aspartique et l'acide glutamique) qui possèdent des chaînes latérales déprotonables (peuvent facilement céder un proton)
- chargés positivement (l'arginine, la lysine et l'histidine) qui possèdent des chaînes latérales protonables, (qui peuvent accepter un proton)
- polaires non-chargés (sérine, thréonine, cystéine, asparagine, tyrosine, tryptophane et glutamine) qui possèdent des chaînes latérales capables de former des liaisons hydrogène
- non-polaires (glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine et proline) qui possèdent des chaînes latérales composés des groupements qui ne peuvent pas former des liaisons hydrogène.

Par réaction chimique décrite sur la figure 1.1, les acides aminés forment des polymères, appelés peptides (composés au moins de 50 acides aminés) ou protéines (s'ils en contiennent plus) via la création d'une liaison appelée *liaison peptidique*. La figure 1.1 montre la formation de cette liaison entre un groupement acide terminal ($-\text{COOH}$) d'un acide aminé et un groupement amine d'un autre ($-\text{NH}_2$). Cette réaction entraîne alors la libération d'une molécule d'eau. Les liaisons peptidiques sont assez fortes et ne sont pas facilement rompues par les changements de l'environnement de la protéine.

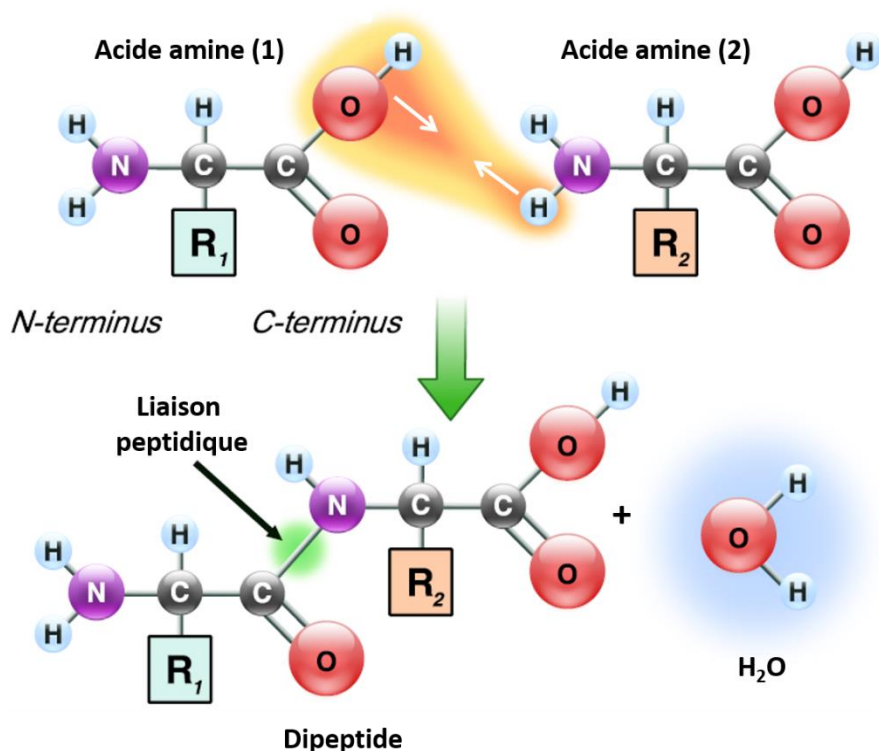


FIGURE 1.1 : Représentation de la formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés. R_i représente les résidus des acides aminés.

La structure de la protéine présente différents niveaux d'organisation, représentés sur la figure 1.2. La structure *primaire* (figure 1.2a) est constituée d'une séquence d'acides aminés reliés les uns aux autres par des liaisons peptidiques. La structure *secondaire* (figure 1.2b) décrit des motifs dans lesquels les groupes $-\text{NH}$ et $-\text{CO}$ de la chaîne principale forment des liaisons hydrogène (LHs) entre eux. On distingue deux structures en hélices α et en feuillets β . Dans les hélices α , la chaîne polypeptidique principale adopte une configuration hélicoïdale à l'extérieur de laquelle se situent les résidus des acides aminés, capables de former des LHs. A l'intérieur, se situent les chaînes qui sont de nature hydrophobe. Un équilibre très fragile est alors

constitué par cette configuration entre résidus hydrophiles et hydrophobes. La forme est dictée par une interaction entre le groupement carbonyle (-CO) d'un acide aminé et un groupement amide d'un autre acide aminé, de la même chaîne peptidique situé 4 résidus plus loin. Les feuillets β résultent de la superposition de deux chaînes protéiques antiparallèles voisines, ou parallèles mais très éloignées, plissées de manière à constituer un angle entre les plans des groupes peptidiques.

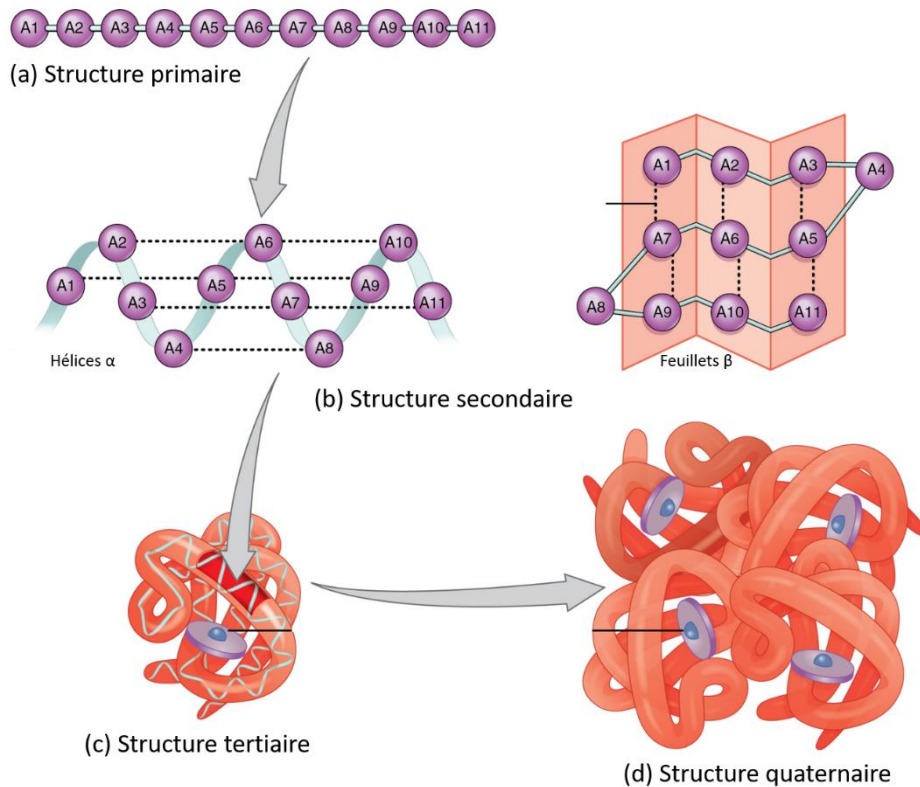


FIGURE 1.2 : Organisation hiérarchique de la structure d'une protéine

Il est possible de décrire la plupart des structures secondaires des protéines en termes d'hélices α et de feuillets β , connectés entre eux par des *boucles* de longueur et de forme variables. Les boucles se trouvent généralement en contact avec le solvant et sont souvent constituées de résidus polaires et chargés qui ne parviennent pas à former des LHs avec d'autres résidus de la protéine. Les interactions entre les éléments de la structure secondaire induisent un arrangement de ces éléments qui engendre un niveau supérieur d'organisation tridimensionnelle appelée *structure tertiaire* (figure 1.2c). Ces forces de cohésion, de différents types, représentées de manière plus ou moins importante suivant les protéines, sont décrites ci-dessous :

- Interactions covalentes (ponts disulfure)
- Interactions électrostatiques (liaisons ioniques)

- Interactions van der Waals
- Liaisons hydrogène
- Interactions avec l'environnement de la protéine

Les énergies d'interaction sont très faibles ($\sim k_B T$), mais le nombre important de LHs au sein de la structure secondaire stabilise celle-ci. De ce fait, lorsque ces liaisons cassent (sous l'effet d'une augmentation de température par exemple), la structure secondaire se déplie.

Dans certains cas, des interactions entre chaînes polypeptidiques peuvent engendrer des associations entre monomères caractérisés par leur propre structure tertiaire, créant un niveau d'organisation supplémentaire appelée structure *quaternaire* représentée sur la figure 1.2d. Chaque monomère est appelé sous-unité et l'agencement tridimensionnel des sous-unités est stabilisé le plus souvent par le biais d'interactions non covalentes. Quand une protéine présente ce type de structure, le nombre de sous-unités peut varier en fonction de certaines conditions (pH, température, etc.) comme c'est le cas pour la protéine α -chymotrypsine.

Chaque protéine a une structure unique qui lui confère une fonction biologique propre. Il existe une relation étroite entre chaque niveau de structure, la modification d'un niveau de structure se répercutant sur le niveau inférieur, (modifiant ou supprimant) ainsi la fonction biologique de la protéine. Ceci montre un degré d'organisation complexe des protéines qui peut être comparé à un « château de cartes », un léger stress sur le niveau structural supérieur engendrant le déséquilibre progressif des niveaux inférieurs et de l'édifice structural entier. La sensibilité des protéines à différents types de stress auxquelles elles peuvent être soumises de manière naturelle ou non, imposent des conditions drastiques d'utilisation et de stockage.

1.1.2. Repliement des protéines

Une protéine est synthétisée à l'état déplié, sous forme de longues chaînes linéaires d'acides aminés. Elle se replie instantanément dans un état appelé *natif*, pour former une structure fonctionnelle biologiquement active. Il est généralement admis que la structure native de la protéine est thermodynamiquement la plus stable. La prédiction de cet état à partir de la séquence des acides aminés, ainsi que la manière dont les protéines se replient, sont sources d'un problème très intrigant soulevé par

Levinthal et initialement connu sous le nom de paradoxe de Levinthal. Cyrus Levinthal fait remarquer en 1969, qu'en raison du très grand nombre de degrés de liberté dans la chaîne polypeptidique, une protéine possède une quasi infinité de conformations possibles. Si la protéine doit explorer de manière séquentielle toutes les conformations possibles pour atteindre l'état natif, cela nécessiterait un temps plus grand que l'âge de l'univers, alors que les transitions entre les conformations se font en un temps très court (ns ou ps). D'un point de vue statistique l'état natif d'une protéine est donc fort improbable. Dans ce contexte, un paysage énergétique en forme d'entonnoir a été envisagé semblable à un terrain de golf pour représenter l'exploration séquentielle. Une surface rugueuse de l'entonnoir a été considérée pour accélérer l'exploration du paysage énergétique faisant apparaître des états intermédiaires (figure 1 .3).

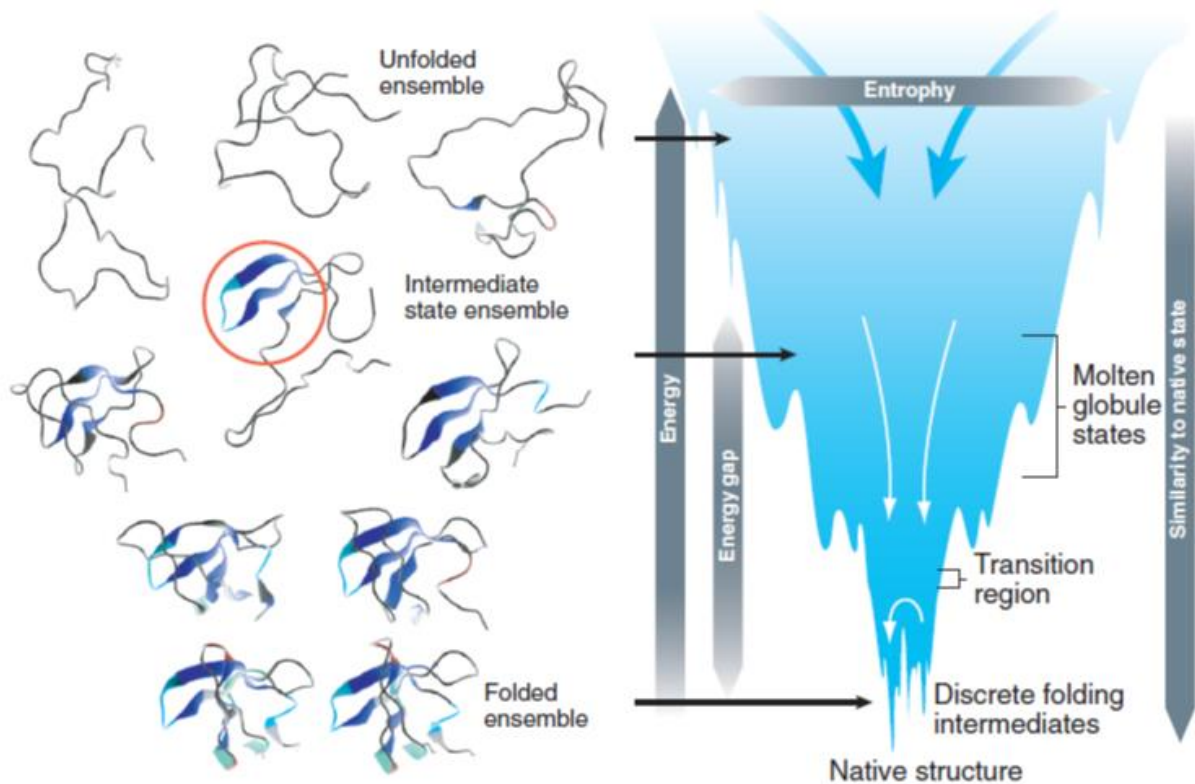


FIGURE 1.3 : Paysage énergétique de repliement d'une protéine selon la ref. 1.

De nos jours, il est couramment admis que l'exploration séquentielle de toutes les conformations possibles est un faux paradoxe, et que les différents types d'interactions entre résidus pilotent le repliement. Plus précisément, c'est principalement l'effet hydrophobe qui est le moteur du repliement, et à un degré moindre les interactions électrostatiques et LHs. Dans la mesure où d'abord les résidus

hydrophobes ont instantanément tendance à être protégés de l'exposition à l'eau, leur repliement élimine un nombre considérable de conformations, les autres interactions (électrostatiques, LHs) augmentant ensuite le nombre de conformations à exclure.

Une solution à ce paradoxe a été apportée par la construction d'un paysage énergétique semblable au précédent. Ce paysage trace un chemin d'énergie privilégiée au repliement des protéines pour passer de l'état déplié à l'état natif via des états intermédiaires, et notamment un état partiellement replié également appelé « molten globule » (MG). D'un point de vue thermodynamique, l'espace des conformations accessibles a bien la forme d'un entonnoir schématisant l'effondrement hydrophobe des chaînes linéaires¹. La rugosité de la surface est liée aux autres types d'interactions (électrostatiques, LHs) qui induisent des états intermédiaires et qui sont des pièges cinétiques ralentissant le repliement, alors que la rugosité était un facteur accélérant le repliement en considérant une exploration séquentielle des conformations possibles. La forme du paysage énergétique, montre l'existence d'un nombre important d'états dépliés (de haute énergie), non dégénérés en énergie. Plus les conformations sont compactes avec un cœur hydrophobe structuré, plus l'énergie est faible, et le nombre de conformations réduit jusqu'à l'état natif de la protéine.

1.1.3. Stabilité thermodynamique des protéines

Les protéines sont marginalement stables en solution, car l'état natif (N) n'est que d'environ 5-15 kcal/mol plus stable que l'état déplié U (pour Unfolded), ce qui est dû aux faibles forces de cohésion. Au niveau moléculaire, une protéine peut adopter différentes conformations. L'état dénaturé D désigne l'ensemble des conformations adoptées par la protéine dans des conditions expérimentales de dénaturation (variation de la température, pression ou pH, ajout des agents chimiques dénaturants, etc). Le paramètre thermodynamique qui décrit la transition entre les deux conformations N et D de la protéine est la différence d'énergie libre de Gibbs (ΔG_{ND}) entre ces deux états. L'équation 1.1 exprime la variation de l'énergie de Gibbs en fonction de l'enthalpie de transition (ΔH) et l'entropie de transition (ΔS):

$$\Delta G_{ND} = G_D - G_N = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (1.1)$$

G_D et G_N sont les énergies libres de Gibbs de la protéine à l'état dénaturé et natif, respectivement et T la température de transition.

La courbe de ΔG_{ND} en fonction de la température est appelé *courbe de stabilité* de la protéine. Un exemple d'une telle courbe, représentée sur la figure 1.4, montre que la protéine est instable à la fois à haute (dénaturation chaude) et basse (dénaturation froide) température. Les températures de dénaturation T_{Dh} et T_{Dc} , associés aux dénaturations chaude et froide, respectivement, correspondent à une valeur nulle de ΔG . La dénaturation chaude est facilement observée, en augmentant la température, alors qu'il est délicat d'observer la dénaturation froide car elle intervient à une température inférieure à 0°C, c'est-à-dire dans un domaine de température où l'eau de la solution cristallise. La dénaturation froide peut être mise en évidence, dans certains cas, par l'ajout d'agents chimiques dénaturants qui ont pour effet de déstabiliser des protéines et donc d'augmenter la température de dénaturation froide, et d'abaisser la température de cristallisation de l'eau. L'application d'une très forte pression hydrostatique permet également d'éviter la formation de cristaux de glace, sans modifier l'état natif de la protéine.

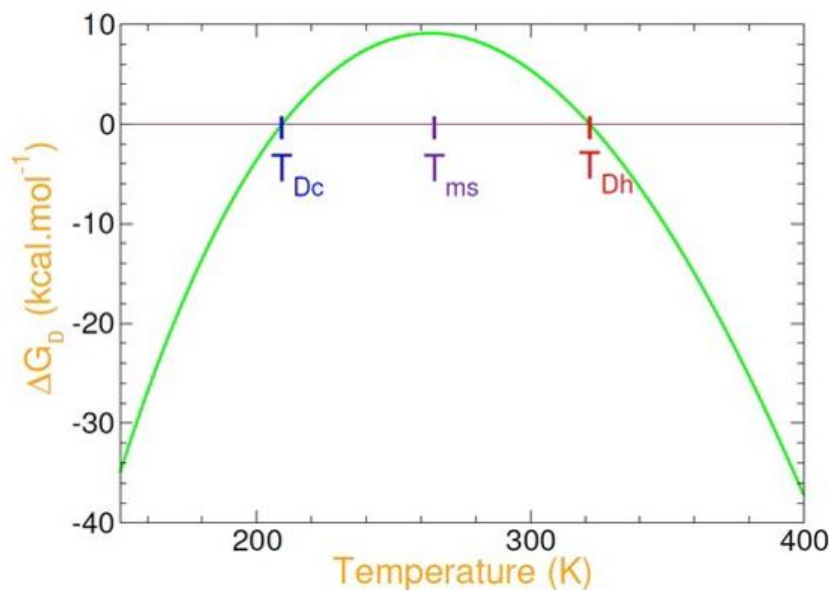


FIGURE 1.4 : Courbe de stabilité d'une protéine. L'intervalle de stabilité est déterminé par la température de dénaturation froide T_{Dc} et la température de dénaturation chaude T_{Dh} . Cette courbe passe par un maximum à la température de stabilité maximale T_{ms} .

La stabilité marginale des protéines en solutions sur un intervalle de température restreint, mise en évidence sur la figure 1.4., montre la nécessité de convertir la solution de protéine à l'état sec, plus stable. Les processus les plus utilisés par les industries pharmaceutiques, afin de stabiliser et stocker les protéines à usage thérapeutique sont la lyophilisation, le séchage, la congélation, l'atomisation, etc.

1.2. Lyophilisation des protéines

La lyophilisation est considérée comme une méthode « douce » de transformation d'une solution en poudre par déshydratation à basse température. Les avantages de l'utilisation de ce processus par rapport aux autres cités ci-dessus, sont la déshydratation à basse température, la durée plus longue de conservation du produit sec, une réhydratation rapide grâce à la structure poreuse du lyophilisat et des conditions de stockage et transport un produit lyophilisé beaucoup moins rigoureuses que pour une solution par exemple, ou une formulation congelée. Toutefois, la lyophilisation est un processus très onéreux car il peut durer plusieurs jours (jusqu'à une semaine), voir plus longtemps si les paramètres des cycles de lyophilisation ne sont pas optimisés. De ce fait, il est utilisé pour les produits à forte valeur ajoutée (les protéines thérapeutiques, les vaccins)².

Le processus de lyophilisation est généralement décrit comme un processus à trois étapes, basées sur les transformations de l'eau représentées sur le diagramme d'état de l'eau pure (figure 1.5). La première étape nommée congélation (1), pendant laquelle une grande partie du solvant (l'eau) cristallise sous forme de cristaux de glace, séparément du reste de la formulation. L'eau non congelée est liée à la protéine, mais en plus grande partie à des co-solvants, utilisés principalement pour stabiliser l'état natif, pour respecter des caractéristiques propres au lyophilisat et aussi aux conditions

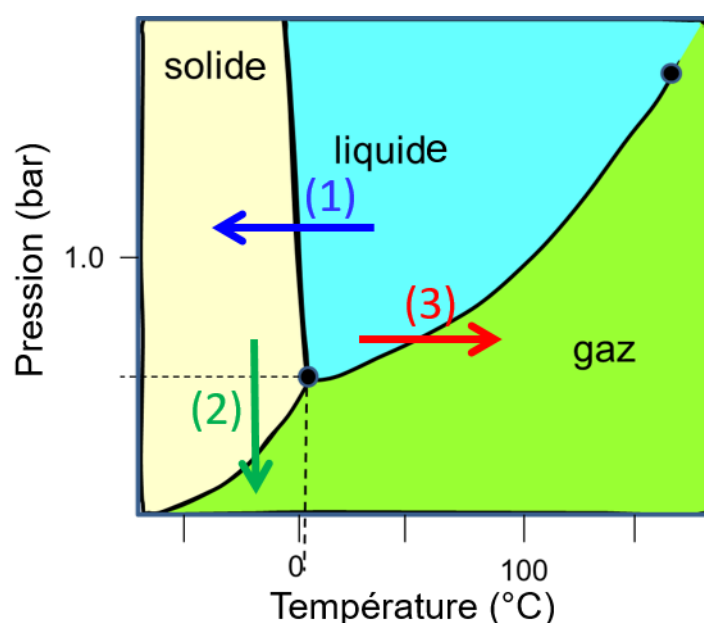


FIGURE 1.5 : Diagramme d'état de l'eau pure montrant le chemin suivi lors des transformations de phases subies par l'eau lors d'un cycle de lyophilisation : congélation (1), sublimation (2) et désorption (3).

d'administration. La congélation de la glace peut être réalisée dans différentes conditions (rampe de température, introduction de la solution dans une chambre pré-refroidie, etc) et peut être suivie de vieillissement pour faire croître la taille des cristaux, et/ou obtenir une plus grande homogénéité de leur répartition. La deuxième étape, séchage primaire (2), correspond à la cinétique de sublimation de la glace formée pendant la congélation de la formulation. C'est l'étape la plus longue et onéreuse du cycle de lyophilisation. Pendant cette étape, la pression de la chambre de séchage est bien inférieure à la pression de vapeur de l'eau la majeure partie de l'eau est éliminée par transformation de la glace en vapeur d'eau qui se condense en un point froid du lyophilisateur, appelé condenseur. La troisième étape, séchage secondaire (3), correspond à la désorption de l'eau résiduelle, qui n'a pas été congelée pendant la première étape. Cette étape peut être très longue si les conditions ne sont pas optimisées (en particulier, température de séchage trop basse). Trois paramètres opératoires pilotent le cycle de lyophilisation : la température d'étagères ou sont placés les flacons contenant la formulation, la pression dans la chambre de séchage et le temps. Ce dernier couvre à la fois la durée de l'étape de congélation, et celle des deux étapes de séchage. C'est l'expérimentateur qui décide de mettre fin à une étape, soit sur des considérations empiriques, soient à partir de mesures adaptées. Des méthodes de suivi du cycle de lyophilisation ont été développées^{3,4,2} de manière à déterminer la distribution des cristaux de glace, et à détecter l'élimination totale de la glace, qui est un point crucial du cycle, car cette étape est la plus coûteuse en énergie (basse température, basse pression) et en temps.

La présence de la protéine en faible concentration dans l'eau a pour effet de décaler légèrement les lignes de transitions tracées sur le diagramme d'état de l'eau pure représentée sur la figure 1.5. La présence d'agents bioprotecteurs, principalement des sucres, a un effet plus important sur certains paramètres opératoires, en particulier la température d'étagères pendant la congélation. La figure 1.6 représente le diagramme d'état d'une solution tréhalose-eau, contenant 10% pds de tréhalose. En partant de la température ambiante (point P sur le diagramme d'état tracée sur la figure 1.6), les flèches montrent le chemin suivi dans le diagramme d'état lors de la congélation. Lorsque la température atteint la température eutectique (T_e), le tréhalose ne précipite pas dans une phase cristalline, mais forme une solution sursaturée avec l'eau non congelée. Cette fraction de la formulation congelée est

caractérisée par une concentration massique de l'eau d'environ 15-20 % (C_g') et une température de transition vitreuse du mélange eau-sucre-protéine T_g' . On remarque que ce point (T_g' , C_g') correspond à l'intersection d'une courbe d'instabilité (courbe des T_g) et d'une courbe de métastabilité thermodynamique (liquidus), ce qui lui donne un caractère très spécifique du diagramme où vont coexister des différents états solides (cristal et amorphe) de manière instables. Cette température doit être prise en considération pour déterminer à quelle température doivent être effectuées les étapes de congélation et surtout de séchage primaire.

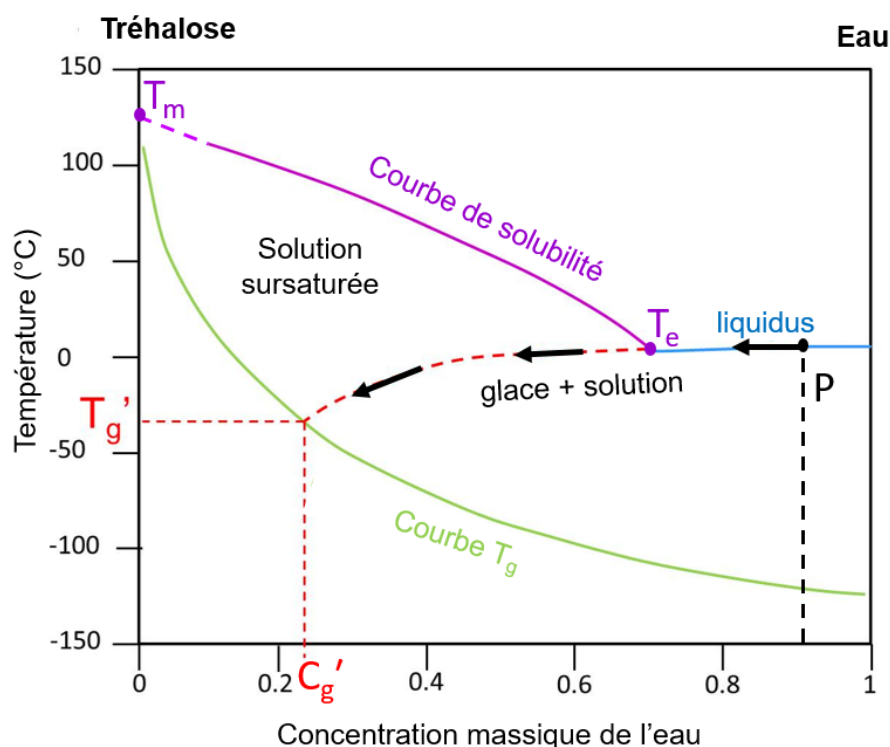


FIGURE 1.6 : Diagramme de phase d'une solution tréhalose-eau contenant 10% de tréhalose au départ à température ambiante. La courbe des valeurs de T_g est obtenue à partir de quelques mesures de T_g et de leur ajustement par la relation de Gordon-Taylor.

1.2.1. Congélation

Lors de cette étape, la plus grande partie de l'eau est séparée du reste de la formulation et transformée en cristaux de glace, afin de les éliminer par sublimation. Lors de la cristallisation, le soluté résiduel devient une solution très concentrée principalement en protéine, ce qui peut favoriser l'agrégation des protéines. En même temps, la cristallisation de l'eau en glace peut engendrer la cristallisation de certains sels qui sont ajoutés dans la formulation liquide avant la lyophilisation. Leur

cristallisation est suivie par des modifications de pH du soluté résiduel, ce qui peut induire des problèmes d'instabilité des protéines. La congélation d'une solution implique formation des cristaux de glace de différentes tailles et la séparation d'une grande partie d'eau du soluté résiduel ce qui induit la formation des interfaces glace-eau qui peuvent déstabiliser l'équilibre hydrophobe-hydrophile de la protéine et engendrer des changements locaux de sa structure.

La congélation est une étape qui influence directement la durée de sublimation de la glace, dans la mesure où la taille et la forme des cristaux de glace reflèteront la structure poreuse de la couche du produit sec à travers laquelle la vapeur s'évacuera. De ce fait, la nature aléatoire du phénomène de nucléation est un handicap majeur dans le contrôle de la première étape de la lyophilisation, qui conditionne le cycle entier. Il existe différentes méthodes permettant de contrôler la nucléation des cristaux de glace et de manipuler l'état congelé, dans le but d'obtenir une distribution homogène de cristaux de taille importante, favorisant une évacuation rapide de la vapeur d'eau. Ces méthodes, consistent à maîtriser la vitesse, la température et le temps congélation²⁻⁴. Un refroidissement lent de la solution pendant la congélation augmente l'instabilité de la protéine due à la séparation de phase (excipients/protéine)^{5,6}. Ce phénomène peut être évité par l'augmentation de la vitesse de congélation. Par contre, un refroidissement rapide de la solution pendant la congélation induit des hétérogénéités de tailles de cristaux de glace, phénomène qui a une influence considérable sur les étapes de séchage et sur certaines caractéristiques physiques du lyophilisat⁷. La vitesse de refroidissement influence le degré de sous-refroidissement de la solution pendant la congélation qui par la suite détermine le nombre et la taille des cristaux de glace dans la formulation congelée qui eux déterminent l'aire de l'interface cristal-liquide et la taille des pores dans le produit lyophilisé⁴.

Durant l'étape de congélation, la formulation passe de l'état liquide à l'état solide, par cristallisation d'une grande partie du volume d'eau, et par solidification (vitrification) de la solution eau-sucre sursaturée. Cette dernière transformation n'a lieu que si la température est abaissée au-dessous de la température T_g' . La vitrification est une transformation réalisée dans un double objectif. Elle permet de constituer une matrice hôte très rigide dans laquelle la protéine est imbriquée presque figée de manière à limiter sa mobilité moléculaire et sa flexibilité, qui sont sources de

dénaturation. Maintenir la température de la formulation sous T_g' , permet également d'éviter le phénomène d'effondrement (collapse) du produit solide « gonflé » car très poreux en fin de cycle, en un amas coalescent (liquide très visqueux), qui ne présente généralement les conditions requises pour être commercialisé. De ce fait, la température du produit ne doit pas être supérieure à une température T_c , appelé température de « collapse », légèrement plus basse que T_g' . La valeur de T_g' est principalement liée à la nature de l'agent bioprotecteur utilisé.

1.2.2. Séchage primaire

Le séchage primaire est en général l'étape la plus longue du cycle de lyophilisation. Il est donc nécessaire de réduire la durée de la sublimation de la glace tout en maintenant une bonne qualité du produit fini. L'optimisation de cette étape repose sur l'équilibre entre les transferts de chaleur et de matière (vapeur d'eau) donnée par l'équation (1.2) des flux²⁻⁴ :

$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H_s \frac{dm}{dt} \quad (1.2)$$

entre le flux de chaleur $\frac{dQ}{dt}$ pénétrant dans le produit et la variation de chaleur accompagnant la sublimation, $\Delta H_s \frac{dm}{dt}$, où ΔH_s représente l'enthalpie de sublimation et $\frac{dm}{dt}$ la vitesse de sublimation, qui est donné par la relation suivante⁴ :

$$\frac{dm}{dt} = \frac{P_0 - P_c}{R_p - R_b} \quad (1.3)$$

Où $P_0 - P_c$ est la différence entre la pression de la glace et la pression de la chambre de séchage, appelé force motrice de la sublimation. L'énergie absorbée durant la sublimation doit être compensée par un apport d'énergie, à la bonne vitesse, provenant du transfert de chaleur entre l'étagère chauffée et le produit. Le diagramme d'états de l'eau (figure 1.5) montre clairement qu'augmenter la température favorise la sublimation. Cependant, une température d'étagères excessive risque d'élever la température du produit au-dessus de la température de « collapse ». Le transfert de masse pendant la sublimation de la glace, peut être réduit à cause de la résistance du produit R_p et la résistance du bouchon R_b . La résistance du produit dépend de la nature du produit, est inversement proportionnelle à la section transverse du produit congelé et augmente avec l'épaisseur du produit dans les flacons.

Le flux de chaleur des étagères au produit est donné par l'équation :

$$\frac{dQ}{dT} = A_{fl} K_{fl} (T_{\text{étag}} - T_p) \quad (1.4)$$

Où A_{fl} et K_{fl} représentent respectivement la section transverse et le coefficient de transfert thermique du flacon. La combinaison des équation 1.1, 1.2 et 1.3 donne :

$$\Delta H_s \left(\frac{P_0 - P_c}{R_p - R_s} \right) = A_{fl} K_{fl} (T_{\text{étag}} - T_p) \quad (1.5)$$

Cette relation montre que la température de l'étagère et la pression de la chambre ont un effet corrélé sur la température du produit. La programmation de la température d'étagères devra donc être effectuée en assurant une marge de sécurité, de manière à ce que la température du produit ne s'élève pas au-dessus de T_c .

Le séchage primaire est une étape de déshydratation. Ce type de contrainte, exercée sur des systèmes cristallins, induit de manière générale une désorganisation structurale du réseau⁸. Par conséquent, la sublimation de la glace peut être considérée comme une source possible de désorganisation structurale de la protéine⁹. La sublimation de la glace se réalisant couche par couche, la protéine située en fond de fiole se trouve toujours dans un environnement contenant des cristaux de glace. Elle est exposée de ce fait aux différents stress cités lors de la congélation de la glace, du début de la congélation jusqu'à la fin de la sublimation.

1.2.3. Séchage secondaire

La troisième étape du cycle de lyophilisation est la désorption de l'eau non congelé au sein du produit solide. L'évaporation de l'eau est en générale trop lente à basses températures du produit, donc pendant cette étape, la température des étagères est augmentée après la sublimation de la glace. Bien évidemment, afin d'éviter le phénomène du « collapse », la température des étagères est augmentée qu'après une sublimation complète. La température finale du produit est comprise généralement entre 25-35°C. Pendant le chauffage du produit obtenu en fin de séchage primaire, il y a risque d'effondrement si la vitesse de réchauffage du produit n'est pas appropriée à la vitesse d'évaporation de l'eau résiduelle. La valeur de T_g augmente au fur et à mesure que le taux d'eau résiduelle diminue, ce qui influe sur la température d'effondrement T_c . Des rampes de température de 0,1 ou 0,15 °C/min

pour des produits amorphes sont régulièrement utilisées pour atteindre la température du séchage secondaire en toute sécurité pour le produit.

Le degré d'hydratation résiduelle conditionne généralement la stabilité de la protéine pendant le séchage secondaire, mais aussi après la lyophilisation, pendant le stockage. Compte tenu de son effet plastifiant, l'eau résiduelle favorise la mobilité moléculaire et donc le risque de dénaturation pendant le stockage. A l'inverse une déshydratation intensive favorise aussi le risque de dénaturation pour certaines molécules.

1.3. Bioprotection

Bien qu'il existe des nombreuses applications potentielles pour les protéines thérapeutiques, leur instabilité associée aux facteurs de stress engendrés par les conditions de mis en forme, de stockage ou de transport, limite leurs applications. Comme il a été décrit précédemment, les différentes étapes de la lyophilisation peuvent induire la dénaturation de la protéine. La nature a trouvé des moyens pour

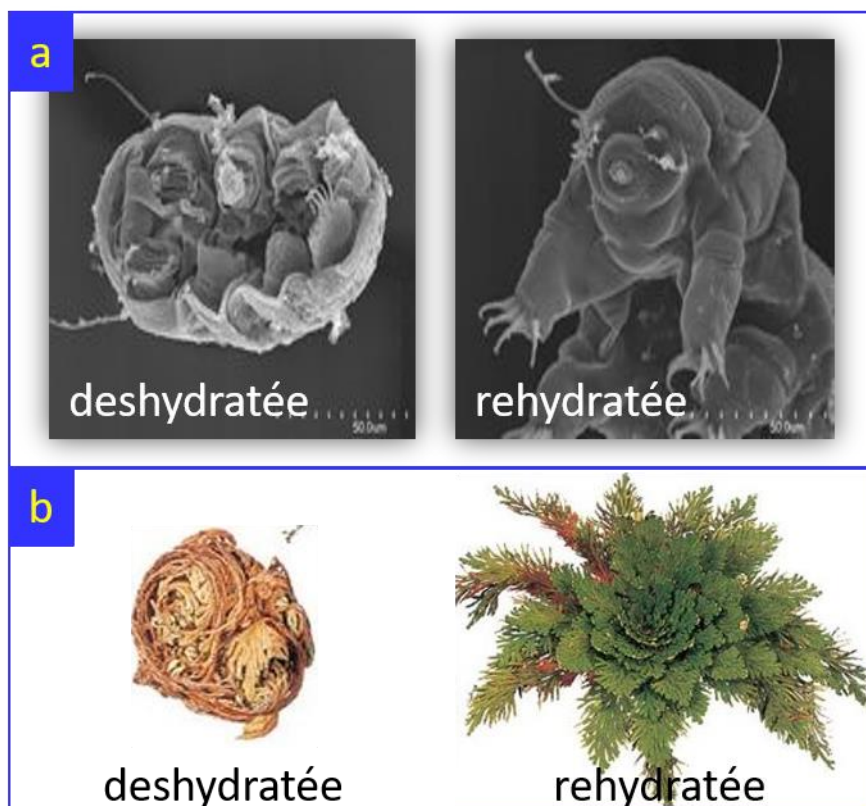


FIGURE 1.7 : Images de microscope électronique à balayage de (a) l'*Echiniscus granulatus* et (b) *Selaginella lepidophylla* à l'état deshydratée et actif.

diminuer les contraintes similaires à ceux rencontrés pendant la préparation des produits pharmaceutiques sur la stabilité. Certains organismes (figure 1.7) peuvent survivre à des contraintes environnementales très sévères, en suspendant l'activité inhérente à leur métabolisme de manière réversible¹⁰. Ce mode de vie a été appelé par Keilin *cryptobioses*¹⁰. L'anhydrobiose est induite par dessiccation et représente la forme la plus répandue de cryptobiose¹¹. En réponse aux contraintes environnementales responsables de la déshydratation, ces organismes accumulent une grande quantité des composés dits solutés compatibles, parmi lesquels figurent les disaccharides, les oligosaccharides, les polyols, certains acides aminés, etc.

1.3.1. Les carbohydrates

Les carbohydrates sont les composés organiques les plus abondants dans les organismes vivants, car ils résultent de la photosynthèse. Les formes les plus simples ne comportent qu'un seul cycle et sont appelés monosaccharides (fructose, glucose, etc). Les disaccharides sont des carbohydrates comportant deux cycles liés par une liaison covalente appelée liaison glycosidique. Le tréhalose est un disaccharide du glucose ($C_{12}H_{22}O_{11}$). Il est composé de deux cycles pyranose à six atomes dans la même conformation α liés par une liaison glycosidique entre les atomes de carbone anomères de chaque cycle. Sa masse molaire est de 342,29 g/mol. Du point de vue chimique, la présence de résidus glucosidiques symétriquement liés et l'absence de groupes réducteurs en font une molécule très particulière. Le tréhalose est synthétisé en grande quantité dans des organismes anhydrobiotiques. Le saccharose, un disaccharide de même formule chimique que le tréhalose mais de conformation moléculaire différente, est composé d'un cycle glucose et d'un cycle fructose. Similairement au tréhalose, il est synthétisé par de nombreuses plantes anhydrobiotiques et présente les mêmes caractéristiques de stabilité chimique en solution en raison de l'absence de formes anomériques. Cependant, il a été émis l'hypothèse que le tréhalose est le principal bioprotecteur pour stabiliser les protéines, les acides nucléiques et les lipides membranaires pendant l'anhydrobiose¹².

1.3.2. Mécanismes de bioprotection

Afin d'éviter la dénaturation de la protéine pendant un cycle complet de lyophilisation, des excipients, tel que les disaccharides (tréhalose, saccharose,

maltose, etc), polyols (glycérol, sorbitol, mannitol) etc., sont ajoutés dans la formulation initiale. Toutefois, les excipients sont ajoutés de manière empirique, sans connaître les mécanismes par lesquels ils stabilisent la structure de la protéine. Suite à des nombreuses études expérimentales et théoriques, différentes hypothèses de bioprotection ont été proposées. Elles sont décrites succinctement ci-dessous.

1) Hydratation préférentielle

Depuis des dizaines d'années, les protéines sont conservées en solution avec des additifs tels que le saccharose, glycérol, etc. en grande quantité par rapport à la protéine. Le besoin d'utiliser de grandes quantités de co-solvants suggère que ceux-ci n'interagissent pas directement avec la protéine. Timasheff *et al.* ont utilisé une méthode d'équilibre de dialyse afin de déterminer les affinités relatives d'une protéine vis-à-vis d'un ligand ou de l'eau¹³. Ils ont trouvé que deux modèles opposés sont possibles pour interpréter l'interaction entre les co-solvants et la protéine (figure 1.8). Dans un premier cas, la concentration des molécules de co-solvant dans l'eau est plus élevée au voisinage de la surface de la protéine (à l'intérieur de la couche symbolisée par les traits pointillés sur la figure 1.8), que dans l'eau en grand volume. Ce modèle est souvent appelé *interaction préférentielle* (entre protéine et co-solvant) et s'adapte principalement aux dénaturants. Dans le second cas, les molécules d'eau sont en excès au voisinage de la protéine. Le modèle est appelé *hydratation préférentielle* ou *exclusion préférentielle* du co-solvant de la surface de la protéine. Selon les résultats

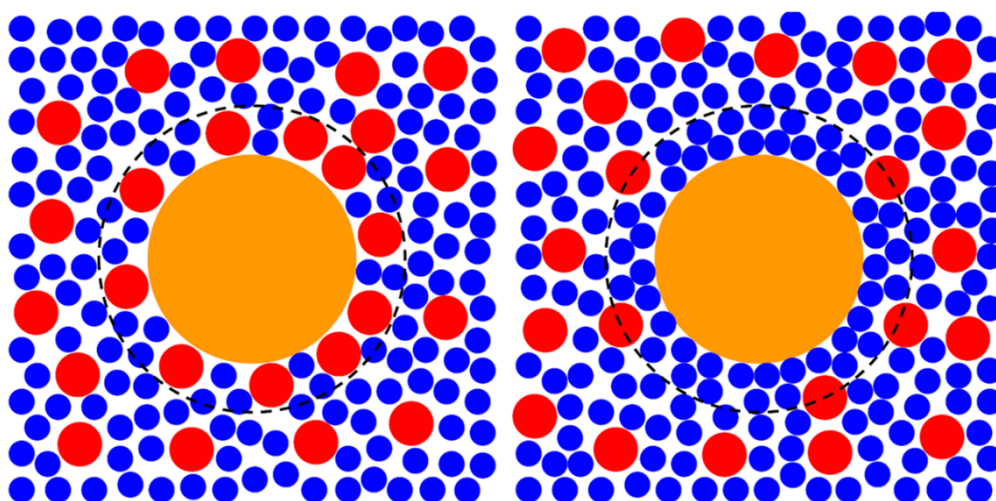


FIGURE 1.8 : Représentations schématiques de l'interaction préférentielle (à gauche) et de l'exclusion préférentielle (à droite) de solutés à la surface d'une protéine en solution aqueuse. Les disques bleus représentent les molécules d'eau, ceux en rouge les molécules de solutés. Le grand cercle en orange symbolise une protéine globulaire et le cercle en tirets autour de la membrane d'équilibre de dialyse (ref 33)

obtenus par Timasheff *et al.*¹³ le tréhalose et le saccharose seraient plus efficaces que les autres sucres, grâce à leur capacité à former de nombreuses liaisons hydrogène avec l'eau. Il faut souligner que le mécanisme d'hydratation préférentielle ne peut intervenir que si l'hydratation des protéines est totale, et de manière générale s'applique aux systèmes où la protéine est fort diluée.

2) Effet destructurant

De nombreuses études ont été dédiées à la perturbation de la structure de l'eau par le cosolvant (figure 1.9). Les sucres sont considérés comme des agents formant de nombreuses LHs avec l'eau, déformant ainsi l'ordre local tétraédrique, par opposition à certains dénaturants qui sont des agents destructeurs de liaisons LHs¹⁴⁻¹⁶. Les deux effets « destructeur » et « destructurant » du réseau de LHs de l'eau ont pour conséquence de modifier l'ordre local de l'eau précurseur à longue portée de la glace cristalline hexagonale, inhibant la formation de cristaux de glace lorsque la température est abaissée. Cependant, il a été montré¹⁷ que l'ajout du sucre dans l'eau, rigidifiait le réseau des liaisons H de l'eau¹⁸ et augmentait la durée de vie des liaisons H entre molécules d'eau provoquant le ralentissement de la dynamique de l'eau. Les groupes hydroxyles des sucres adoptent des positions et orientations incompatibles avec la structure de la glace. Le tréhalose serait un bon cryoprotecteur (pendant la lyophilisation des vaccins par exemple) car il détruit davantage le réseau LHs de

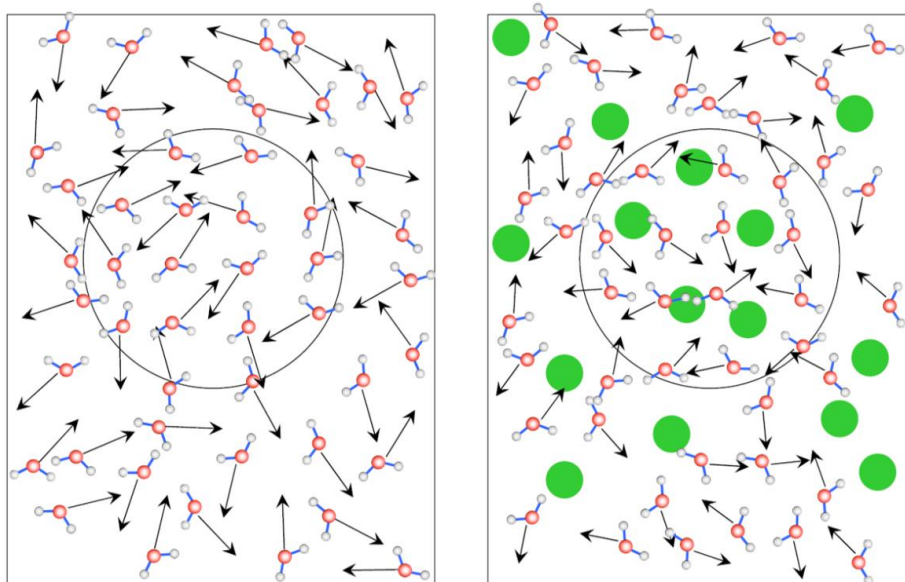


FIGURE 1.9 : Schéma indiquant l'effet de solutés (disques verts) en concentration 1 :4 sur le processus de nucléation de l'eau. Les flèches représentent la direction de diffusion des molécules d'eau et leur longueur indique la vitesse de diffusion. Etant donné que des solutés tels que les dissaccharides diffusent beaucoup moins rapidement que l'eau, ils sont considérés immobiles sur ce schéma. Les cercles représentent le rayon critique de nucléation. (ref. 16).

l'eau et limite la cristallisation de l'eau intracellulaire¹⁹. Pour conclure il faut signaler que l'effet déstructurant concerne les solutions relativement diluées. Il permet donc d'expliquer certains aspects de la cryoprotection inhérents au sous-refroidissement des solutions comportant les osmolytes. Cependant il ne décrit pas l'anhydrobiose ou la lyoprotection où le degré de déshydratation est important.

3) Vitrification

Green et Angell²⁰ ont relié les propriétés bioprotectrices aux valeurs de la température de transition vitreuse des agents bioprotecteurs, sous entendant une relation entre l'effet anti-plastifiant des bioprotecteurs sur l'eau et leur efficacité bioprotectrice. Cependant, il a été démontré pour maltodextrine²¹, glycérol²², mélanges glycérol/tréhalose²³, dextran²⁴ et PVP²⁵, que l'efficacité bioprotectrice n'est pas nécessairement proportionnelle à la valeur de T_g du bioprotectant. Cependant l'effet anti-plastifiant des bioprotecteurs a pour conséquence de limiter la contribution des mouvements anharmoniques rapides, prises en compte dans le paramètre $\langle u^2 \rangle$ déterminé par diffusion neutronique ou par spectroscopie Raman basse fréquences. Il est généralement reconnu que ce type de mouvement est précurseur du dépliement des protéines²⁶, indiquant que l'effet anti-plastifiant du bioprotecteur a probablement une relation avec ses propriétés bioprotectrices.

4) Substitution de l'eau d'hydratation

L'hypothèse d'hydratation préférentielle n'est valable que pour des protéines en solution. Crowe *et al.*²⁷ ont proposé l'hypothèse de substitution de l'eau d'hydratation après avoir observé l'interaction des sucres avec les têtes polaires des lipides constituant une membrane. Ils ont suggéré que le tréhalose forme des LHs avec les têtes polaires des molécules biologiques, par l'intermédiaire des groupements hydroxyles, substituant ainsi les molécules d'eau d'hydratation (figure 1.10). Par conséquent, les membranes et les protéines sont maintenues à l'état d'hydratation complète par les liaisons formées avec le tréhalose. La même hypothèse a été utilisée par Carpenter et Crowe²⁸ pour expliquer leurs résultats obtenus par spectroscopie infrarouge sur des lyophilisats de protéines en présence et en absence d'excipients. Ils ont montré que seul le modèle de vitrification ne pouvait pas expliquer la stabilisation des protéines par les disaccharides, lors d'une procédure de lyophilisation. Par la suite, ils ont proposé le modèle de *remplacement de l'eau*, qui

suggère que le sucre forme des LHs avec les protéines en substituant les LHs eau-protéine, lors de la congélation ou désorption de l'eau, ce qui stabiliserait la structure des protéines.

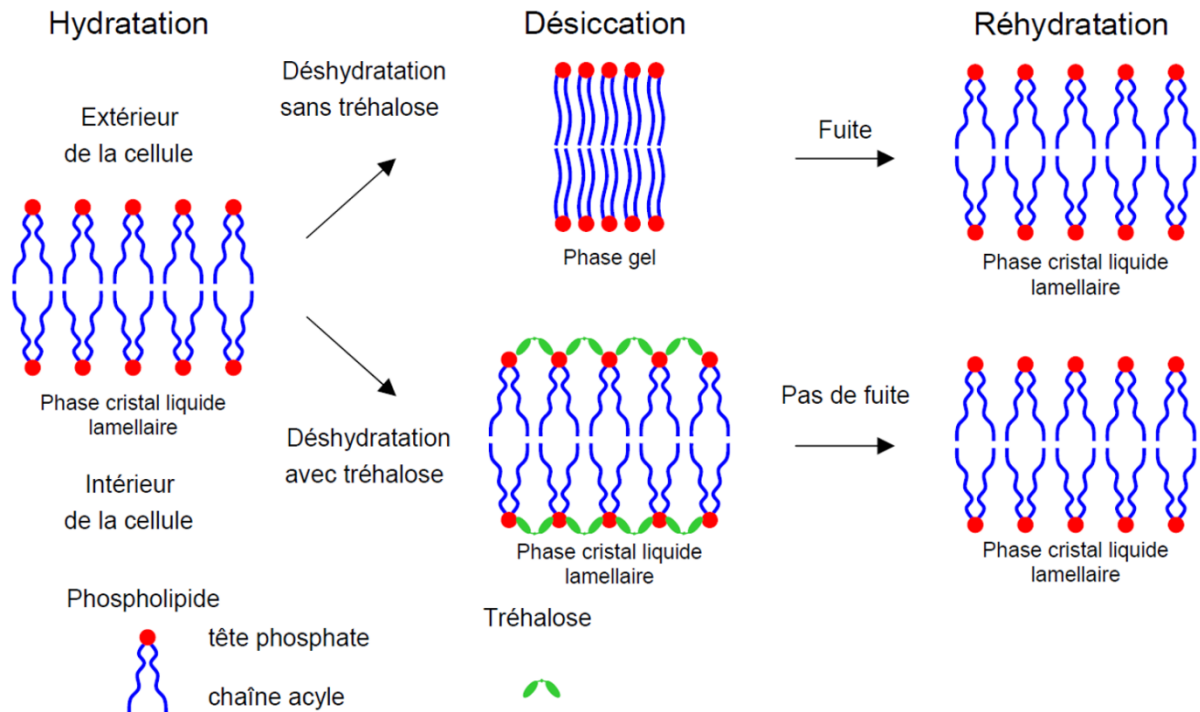


FIGURE 1.10 : Représentation schématique de la dessiccation d'une membrane lipidique avec et sans tréhalose (ref. 33).

5) Confinement de l'eau d'hydratation

Belton and Gill²⁹ ont étudié des mélanges tréhalose/lysozyme à différents rapport massique par spectroscopie Raman et infrarouge. Pour interpréter leurs résultats ils ont émis l'hypothèse de *confinement de l'eau d'hydratation* (figure 1.11), qui suggère que lors du séchage d'un mélange lysozyme-tréhalose-eau, l'eau se concentrerait à l'interface protéine/sucre et deviendrait confinée par la vitrification du tréhalose. Selon leurs résultats, les lyophilisats tréhalose/lysozyme ne seraient en réalité pas complètement secs et selon l'hypothèse de Timasheff *et al.*¹³, les sucres seraient exclus de la surface de la protéine en solution. Bien que controversée par les travaux de Carpenter et Crowe²⁸, l'hypothèse de confinement d'eau d'hydratation semble être confortée par des calculs de simulation numérique de dynamique moléculaire réalisés par Lins *et al.*³⁰ sur des mélanges lysozyme/tréhalose/eau à la température ambiante. A partir des résultats obtenus, ils ont proposé qu'à l'échelle de

la nanoseconde, les molécules de tréhalose s'agrègent entre elles à la surface de la protéine, confinant ainsi une fine couche d'hydratation.

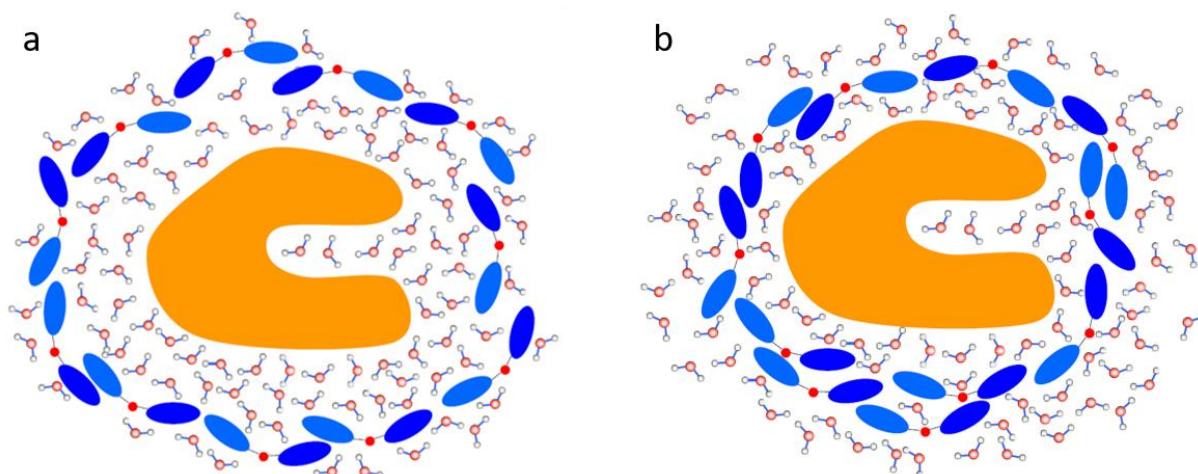


FIGURE 1.11 : Modèle d'interaction du tréhalose (à ~ 18% en masse, représenté en bleu) avec le lysozyme (représenté de manière schématique en orange) proposé par Lins et al.³⁰ à partir de résultats de simulation numérique de dynamique moléculaire. Le tréhalose initialement réparti de manière homogène s'agrége à proximité de la surface de la protéine et piège son eau d'hydratation (ref. 33).

RÉFÉRENCES

1. Brooks III, C. L., Onuchic, J. N. & Wales, D. J. STATISTICAL THERMODYNAMICS: Taking a Walk on a Landscape. *Science* (80-.). **293**, 612–613 (2001).
2. Hansen, L. J. J., Daoussi, R., Vervaet, C., Remon, J. P. & De Beer, T. R. M. Freeze-drying of live virus vaccines: A review. *Vaccine* **33**, 5507–5519 (2015).
3. Tang, X. & Pikal, M. J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm. Res.* **21**, 191–200 (2004).
4. Franks, F. Freeze-drying of bioproducts: Putting principles into practice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45**, 221–229 (1998).
5. Hedoux, A. & Universités, P. Lyophilisation de produits pharmaceutiques et biopharmaceutiques. **33**, (2013).
6. Pikal, M. J. in *Formulation and Delivery of Proteins and Peptides* (eds. Cleland, J. & Langer, R.) 120–133 (American Chemical Society, 1994). doi:10.1021/bk-1994-0567.ch008
7. Heller, M. C., Carpenter, J. F. & Randolph, T. W. Protein formulation and lyophilization cycle design: Prevention of damage due to freeze-concentration induced phase separation. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 166–174 (1999).
8. Heller, M. C., Carpenter, J. F. & Randolph, T. W. Effects of phase separating systems on lyophilized hemoglobin. *J. Pharm. Sci.* **85**, 1358–1362 (1996).
9. Hedoux, A. & Universités, P. Lyophilisation de produits pharmaceutiques et biopharmaceutiques. **33**, 1–6 (2014).
10. Hédoux, A., Paccou, L., Derollez, P. & Guinet, Y. Dehydration mechanism of caffeine hydrate and structural description of driven metastable anhydrates analyzed by micro Raman spectroscopy. *Int. J. Pharm.* **486**, 331–338 (2015).
11. Prestrelski, S. J., Tedeschi, N., Arakawa, T. & Carpenter, J. F. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.* **65**, 661–71 (1993).
12. Keilin, D. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* **150**, 149–91 (1959).
13. Bianchi, G., Gamba, A., Murelli, C., Salamini, F. & Bertels, D. Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Carex stigmatica*. *The Plant Journal* **1**, 355–359 (1991).
14. Crowe, L. M., Reid, D. S. & Crowe, J. H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* **71**, 2087–93 (1996).
15. Timasheff, S. N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9721–6 (2002).
16. Patist, A. & Zoerb, H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **40**, 107–113 (2005).
17. Miller, D. P. & de Pablo, J. J. Calorimetric solution properties of simple saccharides and their significance for the stabilization of biological structure and function. *J. Phys. Chem. B* **104**, 8876–8883 (2000).
18. Wolfe, J. & Bryant, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane- solute-water systems.

- Cryobiology* **39**, 103–29 (1999).
19. Hédoux, A. *et al.* Evidence of a two-stage thermal denaturation process in lysozyme: A Raman scattering and differential scanning calorimetry investigation. *J. Chem. Phys.* **124**, (2006).
 20. Lerbret, A. *et al.* How strongly does trehalose interact with lysozyme in the solid state? Insights from molecular dynamics simulation and inelastic neutron scattering. *J. Phys. Chem. B* **116**, 11103–11116 (2012).
 21. Branca, C. *et al.* Tetrahedral order in homologous disaccharide-water mixtures. *J. Chem. Phys.* **122**, (2005).
 22. Green, J. L. & Angell, C. A. Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *J. Phys. Chem.* **93**, 2880–2882 (1989).
 23. Sun, W. Q. & Davidson, P. Protein inactivation in amorphous sucrose and trehalose matrices: Effects of phase separation and crystallization. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1425**, 235–244 (1998).
 24. Caliskan, G. *et al.* Protein and solvent dynamics: How strongly are they coupled? *J. Chem. Phys.* **121**, 1978–1983 (2004).
 25. Cicerone, M. T. & Soles, C. L. Fast dynamics and stabilization of proteins: binary glasses of trehalose and glycerol. *Biophys. J.* **86**, 3836–3845 (2004).
 26. Wang, W. *Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. International Journal of Pharmaceutics* **185**, (1999).
 27. Allison, S. D., Chang, B., Randolph, T. W. & Carpenter, J. F. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 289–298 (1999).
 28. Levine, H. & Slade, L. in *Physical Chemistry of Foods* (eds. Schwartzberg, G. H. & Hartel, W. R.) 83–222 (1992).
 29. Crowe, J. H., Hoekstra, F. A. & Crowe, L. M. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 579–599 (1992).
 30. Carpenter, J. F. & Crowe, J. H. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* **28**, 3916–3922 (1989).
 31. Belton, P. & Gil, A. M. IR and Raman spectroscopic studies of the interaction of trehalose with hen egg white lysozyme. *Biopolymers* **34**, 957–61 (1994).
 32. Lins, R. D., Pereira, C. S. & Hünenberger, P. H. Trehalose-protein interaction in aqueous solution. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **55**, 177–186 (2004).
 33. Lerbret, A. Etude de l'action bioprotectrice des sucres : une investigation par dynamique moléculaire et par spectroscopie Raman. (Université des Sciences et Technologies de Lille, 2005).

CHAPITRE 2.

SPECTROSCOPIE RAMAN DES SYSTEMES BIOMOLECULAIRES

La spectroscopie Raman et la micro-spectroscopie Raman sont des méthodes d'analyse non-destructives d'observation et de caractérisation de la matière. Lorsqu'un rayonnement traverse un milieu transparent, les molécules diffusent une partie du faisceau incident dans toutes les directions. En 1928, le physicien C.V. Raman, a observé que la longueur d'onde d'une petite fraction du rayonnement diffusé par certaines molécules était différente de celle du rayonnement incident et, de plus, les déplacements de longueur d'onde dépendaient de la structure chimique des molécules responsables de la diffusion. Cette puissante méthode d'investigation des états de la matière a longtemps été utilisée dans le cadre de recherches fondamentales académiques. Durant ces quinze dernières années la miniaturisation des sources lasers, le développement des détecteurs et des filtres ont permis l'essor de cette technique utilisée, qui maintenant couplée à un microscope rend possible une utilisation routinière au niveau industriel. Plus récemment, les spectromètres portables sont maintenant très répandus dans les laboratoires industriels avec toutefois des applications spécifiques pour caractériser de manière instantanée des matériaux, telles que le suivi d'un produit dans une chaîne de fabrication ou tester la contrefaçon de différents types de produits chimiques (médicaments, aliments, etc).

Dans le domaine de la physique de l'état solide, et en particulier dans les matériaux moléculaires, la spectroscopie Raman permet de sonder la conformation des molécules dans une gamme de fréquences (région de l'emprunte moléculaire entre 500 et 1800 cm^{-1}) accessible sur tout type de spectromètres ainsi que d'identifier de manière indirecte une phase cristalline lorsque le système étudié présente un polymorphisme cristallin. Cette identification est possible car les modes de vibration internes d'une molécule sont sensibles à l'environnement local d'une molécule. Cette technique permet de révéler et d'étudier des situations de désordre de différents types

liés aux mouvements (désordre dynamique) à la conformation de la molécule (désordre de conformation) ou à des situations d'instabilité – métastabilité engendrées par des perturbations extérieures (variations de température, pression, humidité, etc.). La spectroscopie Raman est de ce fait un outil très bien adapté à l'étude des transitions de phase, permettant également de décrypter les mécanismes physiques à l'origine de ces transformations. La spectroscopie Raman peut également apporter des informations structurales dans le domaine des basses fréquences couvrant une région de quelques cm^{-1} à 150 cm^{-1} . Il s'agit d'un domaine où sont détectés les modes de vibration de réseau, distinctifs de l'identité cristallographique d'une phase cristalline, car dépendant du groupe spatial de symétrie. L'activité Raman de ces modes de vibration externe est généralement très intense dans cette gamme de fréquence et fortement sensible à la périodicité permettant de discriminer des états nanocristallins par rapport à des états amorphes, et de révéler des états de désordre difficilement détectable par diffraction X. Cette région spectrale est longtemps restée accessible uniquement sur des spectromètres équipés de triple monochromateur et de focale 800 mm. Le développement d'une nouvelle génération de filtres rend cette région accessible sur des micro-spectromètres de routine équipés d'un seul réseau et plus petite focale (250 mm). La spectrométrie Raman présente l'avantage de pouvoir analyser un échantillon sans préparation spécifique préalable, par rapport à la spectroscopie infrarouge, mais les spectres peuvent être pollués dans certains cas par le phénomène de fluorescence qui masque le signal Raman. Ce phénomène est le principal inconvénient qui peut restreindre l'utilisation de la spectroscopie Raman.

2.1. L'effet Raman

Du point de vu de la mécanique quantique, l'énergie vibrationnelle E d'une molécule est discrétisée en niveaux d'énergie et satisfait la relation :

$$E = hv\left(n + \frac{1}{2}\right) \quad (2.1)$$

où h est la constante de Plank, n le nombre quantique de vibration de la molécule. L'interaction lumière – matière peut engendrer un phénomène d'absorption ou de diffusion représentée sur la figure 2.1. L'absorption nécessite que l'énergie du photon incident corresponde à la différence d'énergie entre le niveau fondamental et un niveau d'énergie supérieur de la molécule. Le phénomène de diffusion ne nécessite pas que

l'énergie du photon correspond à une différence d'énergie entre deux niveaux. On distingue deux types de diffusion, élastique et inélastique, dans lesquels l'énergie du photon transférée à la molécule place celle-ci dans un état virtuel de très courte durée de vie. Dans le cas de la diffusion élastique l'énergie du photon est spontanément réémise sans changement d'énergie. Le phénomène est appelé diffusion Rayleigh. Dans le cas du processus de diffusion inélastique l'énergie du photon peut être réémise avec une énergie plus basse ou plus élevée que l'énergie de la radiation incidente, correspondant au phénomène de diffusion anti-Stokes ou Stokes. Dans certains cas la molécule peut être placée dans un état excité de durée de vie plus long (10^{-8} s) induisant le phénomène de fluorescence. Ce processus peut être contourné en choisissant une longueur d'onde incidente (source laser) qui permette de placer la molécule dans un état virtuel de plus basse ou plus haute énergie que l'état excité. Cependant il existe d'autres origines au phénomène de fluorescence qui restent inexpliquées.

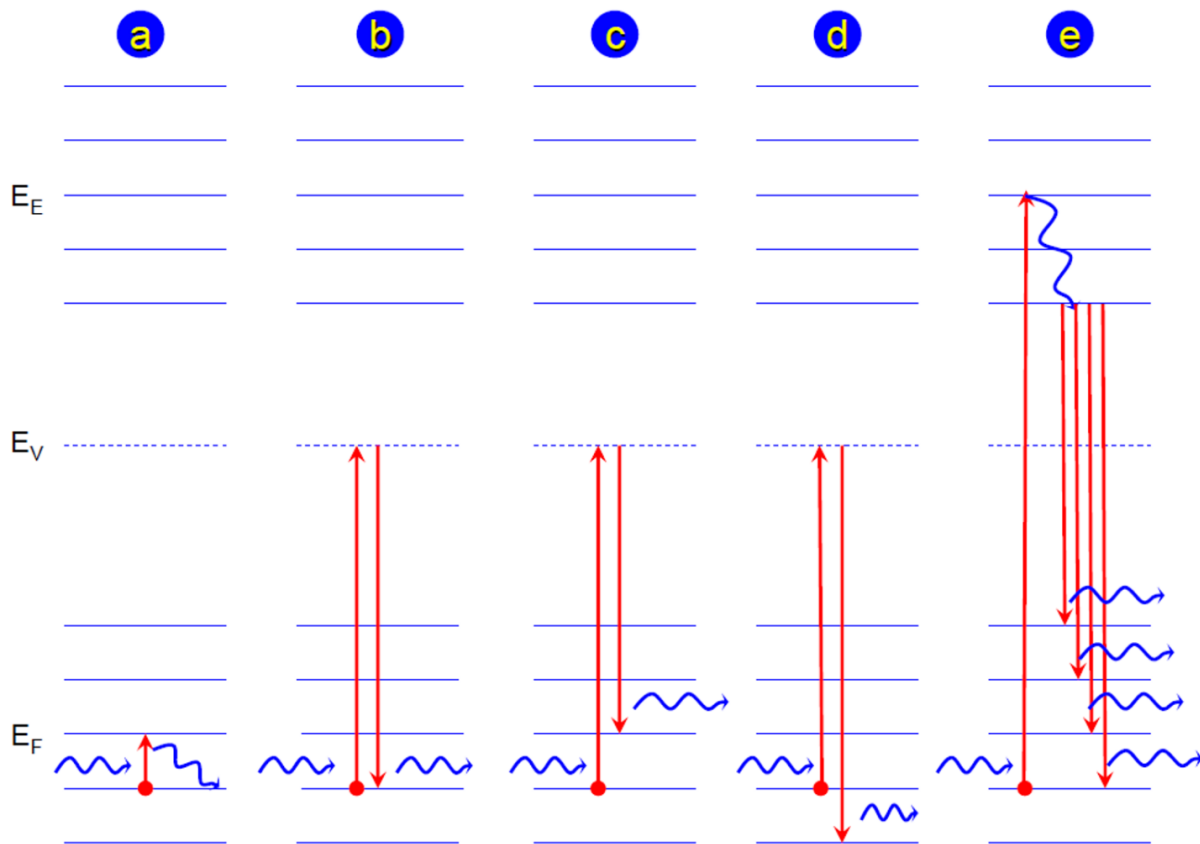


FIGURE 2.1 : Représentation schématique des différentes transitions entre niveaux d'énergie d'une molécule donnée. Les états fondamental, virtuel et excité sont désignés respectivement par E_F , E_V , E_E . (a) Absorption infrarouge, (b) diffusion Rayleigh, (c) diffusion Stokes, (d) diffusion anti-Stokes, (e) fluorescence.

La plus grande partie de la lumière incidente est diffusée de manière élastique. Elle correspond à la déformation du nuage électronique alors que le processus de diffusion inélastique correspond aux mouvements des noyaux atomiques. L'intensité de la diffusion Rayleigh est environ 10^6 fois plus importante que la diffusion inélastique et nécessite d'être masquée pour ne pas détruire le détecteur qui doit être très sensible pour analyser la lumière transmise inélastiquement. L'intensité diffusée inélastiquement est proportionnelle à la population du niveau initial, indiquant que la diffusion Stokes est systématiquement plus intense que la diffusion anti-Stokes et est donc préférentiellement analysée. Le rapport des intensités des raies Stokes et anti-Stokes est donné par l'équation suivante :

$$\frac{I_{AS}}{I_S} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_n}{\nu_0 - \nu_n} \right)^4 \exp \left(\frac{-h\nu_0}{k_B T} \right) \quad (2.2)$$

où k_B et T désignent respectivement la constante de Boltzman et la température de l'échantillon.

La diffusion Raman nécessite d'utiliser une source monochromatique qui est souvent produite par une source laser. La radiation électromagnétique déforme momentanément, sous l'effet du champ électrique $\mathbf{E}$, le nuage électronique autour d'une liaison chimique au sein d'une molécule, créant un moment dipolaire électrique oscillant induit $\mathbf{P}$. On définit ainsi la polarisabilité comme un paramètre lié à la facilité de déformer un nuage électronique. Le champ électrique externe $\mathbf{E}$, auquel la molécule est soumise, induit un moment dipolaire donné par la relation :

$$\mathbf{P} = \bar{\alpha} \mathbf{E}, \bar{\alpha} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{xy} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{xz} & \alpha_{yz} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \quad (2.3)$$

où $\bar{\alpha}$ représente le tenseur de polarisabilité de la molécule, qui dépend des coordonnées des atomes de la molécule. Une condition nécessaire pour qu'un mode de vibration soit actif en Raman est qu'au moins un élément du tenseur de polarisabilité varie, c'est-à-dire que :

$$\left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q_k} \right)_0 \neq 0 \quad (2.4)$$

pour une vibration moléculaire de coordonnée normale :

$$q_k = q_k^0 \cos(2\pi\nu_k t) \quad (2.5)$$

L'intensité Raman dans le processus de diffusion Stokes est proportionnelle aux paramètres donnés dans l'équation (2.6) :

$$I_{Raman}(\nu_0 - \nu_k) \propto NI_0[n(\nu) + 1](\nu_0 - \nu_k)^4 \left[\vec{e}_f \left(\frac{\partial \bar{\alpha}}{\partial q_k} \right) \vec{e}_j \right]^2 \quad (2.6)$$

où N représente le nombre de molécules, $[n(\nu) + 1] = [1 - \exp(h\nu/kT)]^{-1}$ le facteur de Bose Einstein, $\bar{\alpha}$ le tenseur de polarisation correspondant à la vibration (q_k, ν_k) , et $\vec{e}_j, \vec{e}_f$ les vecteurs unitaires définissant les orientations du champ électrique incident et diffusé. Outre les paramètres figurant dans l'équation (2.6) l'activité Raman dépendra des paramètres qui influencent la polarisabilité. Les vibrations de type élongations symétriques sont sources de fortes modifications de polarisabilité par rapport aux mêmes vibrations asymétriques et ont une intensité Raman importante. De même la polarisabilité est proportionnelle au nombre d'électrons, à la taille atomique ou moléculaire, à la longueur de la liaison et inversement proportionnelle à la force de la liaison. Elle dépend également du type de liaisons, en étant très sensible aux liaisons π par rapport à celles de type σ . De ce fait la spectroscopie Raman est généralement bien adaptée à l'analyse des principes actifs, comparativement aux excipients plus riches en liaisons σ .

2.2. Le spectromètre Raman

Le spectromètre Raman utilisé dans ce travail est le modèle *InVia* de *Renishaw* représenté sur la figure 2.2 (*Renishaw plc, Wottonunder-Edge, Gloucestershire, UK*),

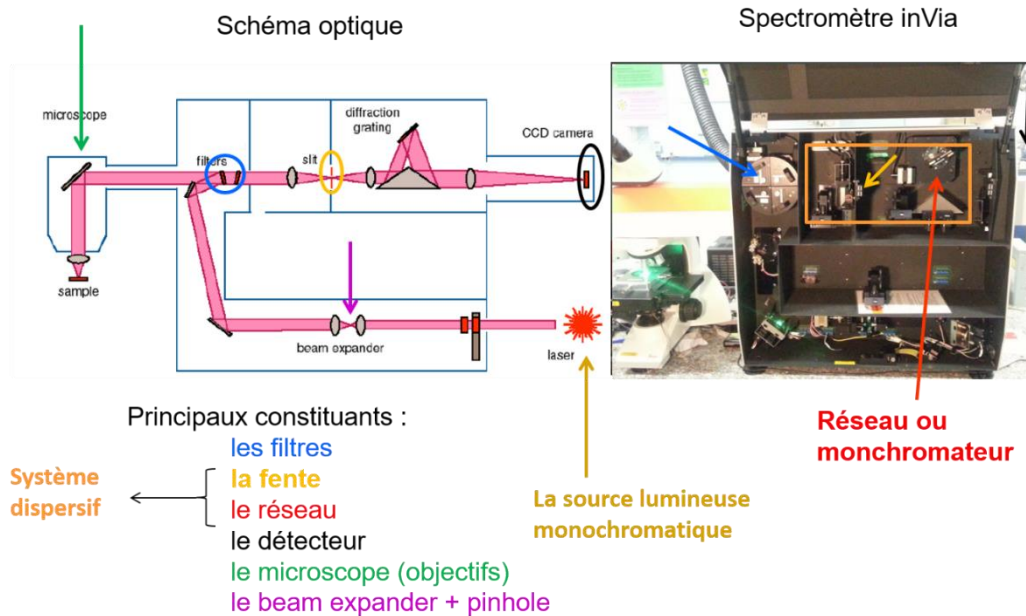


FIGURE 2.2 : Représentation schématique des éléments d'un spectromètre (à gauche) et le spectromètre Raman *InVia* Renishaw utilisé dans le cadre de cette thèse.

équipé de deux sources de lumière incidente : un laser à gaz Ar (*Modu-Laser, Centerville, UK*) et une diode, de longueur d'onde 514,5 nm et 785 nm, respectivement. La puissance du laser a été déterminée à la surface de l'échantillon d'environ 40 mW. Le microscope couplé au spectromètre, est équipé de différents objectifs de grossissement et distances focales différentes, permettant d'analyser un volume d'échantillon d'environ quelques centaines de μm^3 . Toutes les expériences présentées dans cette étude, ont été réalisées en utilisant un objectif Leica, de grossissement $\times 50$, de longue distance de travail (8.1 mm) et d'ouverture numérique 0.5.

La figure 2.3 montre que le choix d'un objectif $\times 50$ de longue distance focale, n'est pas une configuration optimale pour avoir une bonne résolution spatiale et collecter une intensité rétrodiffusée maximum, sachant que celle-ci est proportionnelle à l'angle solide de collecte de la lumière diffusée $\Omega = 2\pi(1 - \cos \theta)$. Le choix d'un objectif $\times 100$ de plus courte distance focale et de plus grande ouverture numérique ($ON = n \sin \theta$, où n représente l'indice du milieu) permet d'associer une bonne résolution spatiale avec une intensité collectée maximum. Cependant il est imposé par la nécessité de focaliser sur l'échantillon placé à l'intérieur d'une cellule pression-température. On notera toutefois que l'ouverture numérique est relativement importante pour un objectif de longue distance de travail ce qui limite la perte

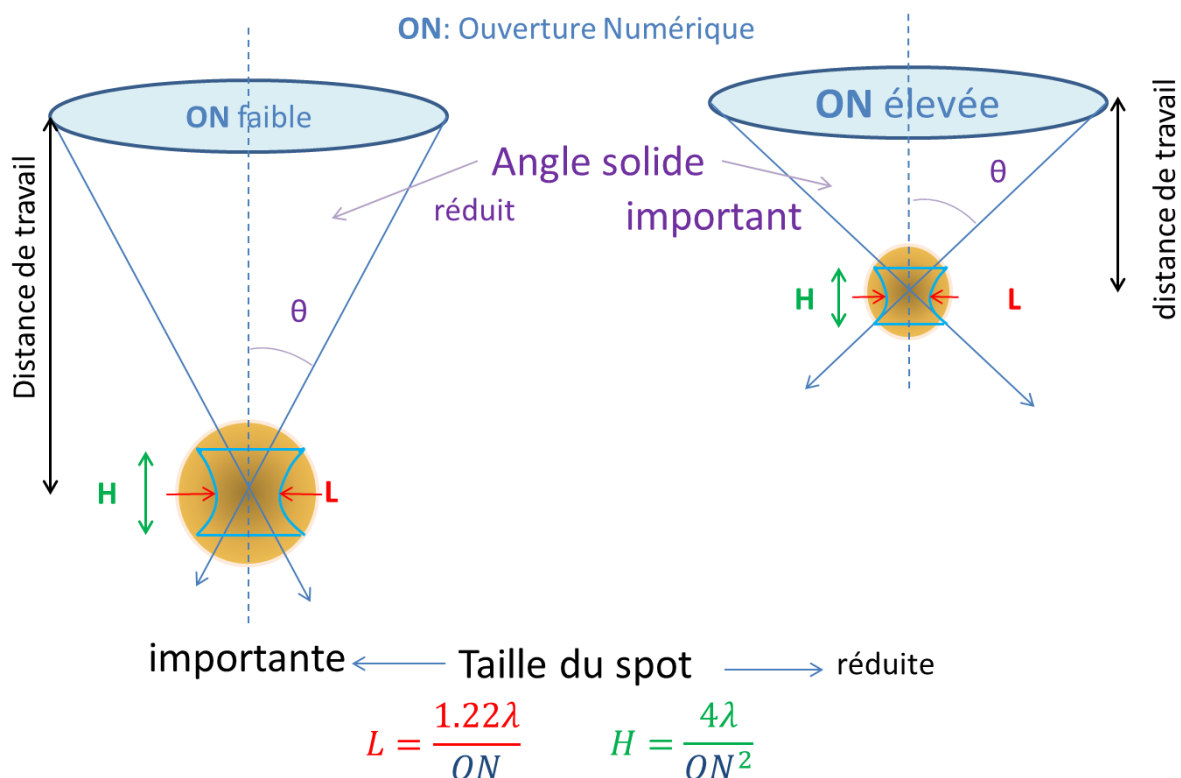


FIGURE 2.3 : Détermination du volume analysé en fonction des caractéristiques de l'objectif.

d'intensité collectée. Le volume analysé dépend principalement de la longueur d'onde de la source laser et de l'ouverture numérique voir figure 2.3. Dans la configuration laser – objectif Leica $\times 50$, le volume analysé est d'environ $150 \mu\text{m}^3$ par point.

La distance focale du spectromètre est de 250 mm et le système de dispersion de la lumière est constitué d'un réseau de 1200 traits/mm pour $\lambda = 785 \text{ nm}$ ou de 1800 traits/mm pour $\lambda = 514.5 \text{ nm}$. La zone spectrale accessible s'étale de 150 cm^{-1} à $3000/4000 \text{ cm}^{-1}$ suivant la longueur d'onde utilisée. La source émettant dans le proche infrarouge limite la détection des bandes de vibration à $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$, compte tenu de la sensibilité du détecteur qui décroît drastiquement au-delà de 2000 cm^{-1} pour ce type de rayonnement. La résolution spectrale du spectromètre est d'environ 2 cm^{-1} . La détection du signal Raman s'effectue au moyen d'un détecteur CCD (Charge Coupled Device). L'acquisition de données est effectuée à l'aide du logiciel Wire 4. Des dispositifs de régulation en température, pression et humidité, couplés au spectromètres, permettent l'analyse des échantillons dans différentes conditions.

2.3. Spectres Raman des systèmes biomoléculaires

Le spectre complet du lysozyme en solution dans l'eau lourde est représenté sur la figure 2.4. Nos études portant sur le décryptage des mécanismes de dénaturation et de stabilisation des protéines sont souvent réalisées en utilisant H_2O

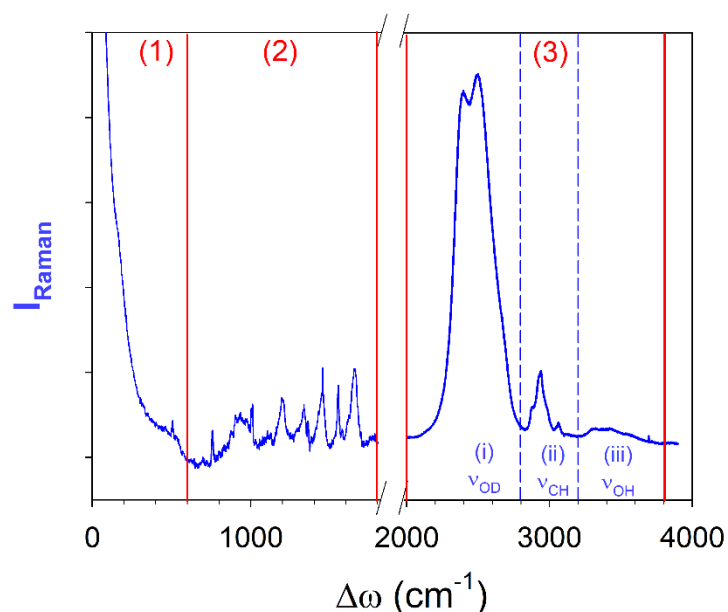


FIGURE 2.4 : Spectre Raman d'une solution binaire lysozyme- D_2O (10 % massique), enregistré à la température ambiante.

et D₂O comme solvant. L'utilisation de l'eau lourde a plusieurs intérêts dans les régions (2) et (3) du spectre. Dans la région (2) il permet de faire glisser vers les basses fréquences le mode de déformation de la molécule d'eau situé vers 1600 cm⁻¹ dans H₂O, et 1200 cm⁻¹ dans D₂O. Ceci a pour effet d'obtenir un pur spectre de la bande amide I, uniquement constitué des bandes de vibration de la protéine. Il est également possible d'analyser les échanges isotopiques indiquant ainsi que des résidus enfouis à l'intérieur de la protéine deviennent exposés au solvant. Dans la région (3), remplacer H₂O par D₂O permet également de faire glisser vers les basses fréquences les modes d'étirement de l'eau permettant ainsi leur étude lorsqu'on utilise la source laser $\lambda = 785$ nm, la sensibilité du détecteur chutant au-dessus de 1800 cm⁻¹ pour ce rayonnement.

Le spectre peut être décomposé en trois parties ; (1) le domaine basse fréquence allant de 10 à 250-300 cm⁻¹, (2) le domaine de fréquence distinctif de la conformation moléculaire du système étudié (molecular fingerprint region) entre 500 - 1800 cm⁻¹ et (3) la région des modes de vibration d'étirement des liaisons O-D, C-H et O-H, entre 2000 et 3800 cm⁻¹. Dans cette étude, seule les domaines (2) et (3) seront utilisés pour l'analyse de différentes formulations.

2.3.1. Spectre Raman basse fréquence (0-500 cm⁻¹)

Ce domaine de fréquence est généralement caractérisé par le chevauchement des mouvements relaxationnels de très large amplitude (anharmoniques) et des mouvements vibrationnels collectifs qui ont généralement un comportement quasi-harmonique. Le premier type de mouvements donne une contribution quasiélastique à très basse fréquence très intense, et fortement dépendant de la température. La dépendance en température de cette intensité quasiélastique est similaire à celle du déplacement quadratique moyen $\langle u^2 \rangle^1$. Après soustraction de cette composante quasiélastique, l'intensité basse-fréquence peut être convertie en susceptibilité Raman, qui est une représentation très proche de la densité d'états de vibrations d'un système désordonné, accessible par diffusion inélastique des neutrons. Ce spectre permet d'analyser la dynamique de la protéine et celle du solvant, avec en particulier une information sur l'organisation du réseau de liaisons H dans le solvant.

2.3.2. Spectre Raman moyennes fréquences (500-1800 cm^{-1})

L'analyse de ce domaine spectral, permet de suivre les changements de conformation d'une molécule au cours de transformations de phase. Dans des formulations protéiques, la zone spectrale allant de 900 à 1800 cm^{-1} est plus particulièrement utilisée pour analyser la structure secondaire des protéines. La figure 2.5 représente les spectres de deux solutions protéiques dans l'eau et dans l'eau lourde. Les bandes amide, représentées sur cette figure, correspondent

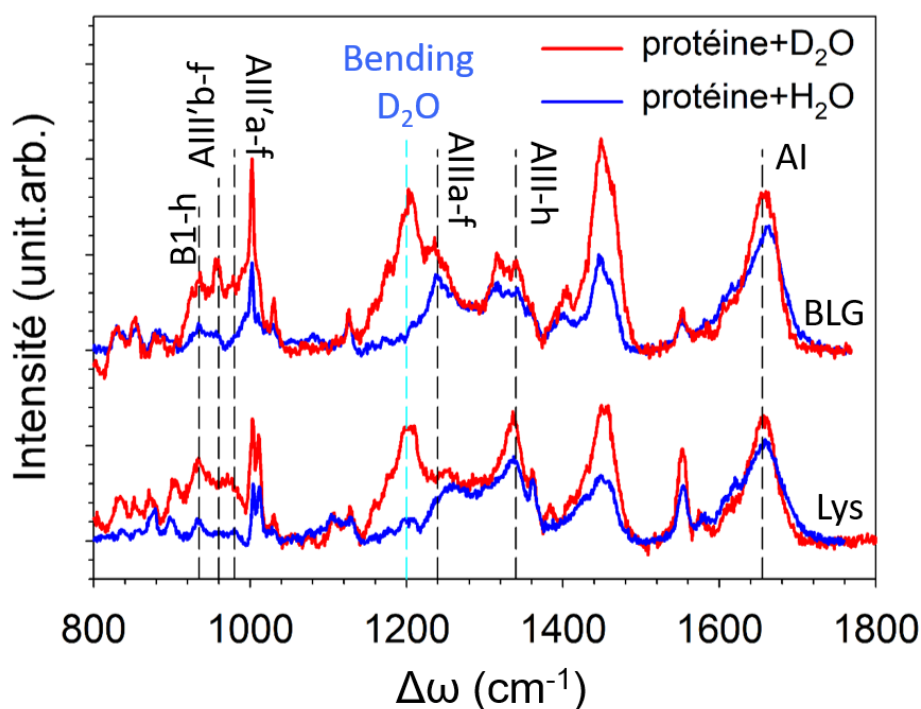


FIGURE 2.6 : Spectres Raman d'une solution 10% de lysozyme et de β -lactoglobuline dans l'eau (bleu) et dans l'eau lourde (rouge), enregistrés à température ambiante.

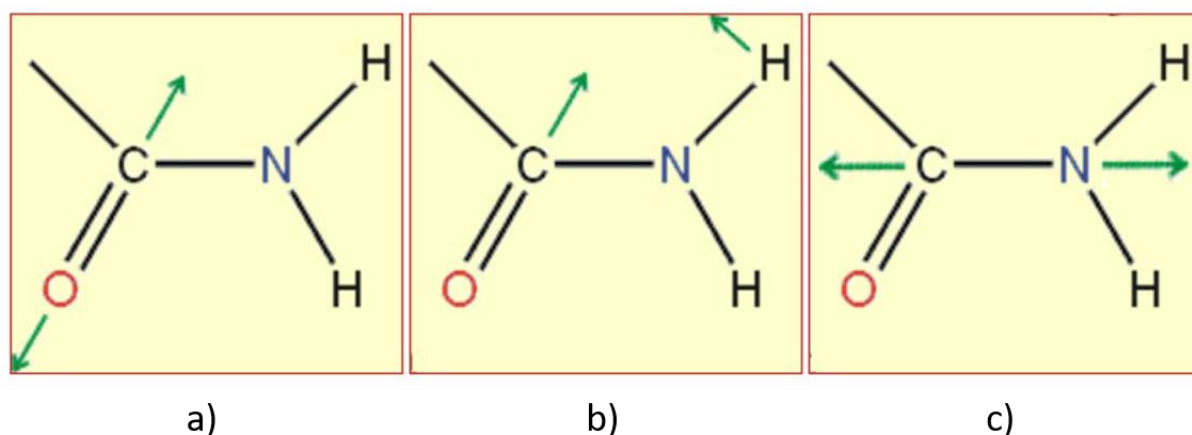


FIGURE 2.5 : Principaux mouvements impliqués dans les bandes amides I et III.

principalement à une combinaison des mouvements d'étirement de la liaison C-N et C=O ainsi que des mouvements de déformation de la liaison N-H, représentés sur la figure 2.6. L'analyse de ces bandes et principalement la bande amide I (AI), permet à la fois, de déterminer la composition en feuillets et/ou en hélices de la structure secondaire et d'étudier les changements de la structure secondaire de la protéine.

La bande AI, observée comme une bande indépendante et très intense entre 1600-1800 cm^{-1} . Elle est principalement due aux mouvements de vibrations d'étirement du groupement, C=O (figure 2.6a) avec une faible contribution des vibrations d'étirement C-N (figure 2.6c), N-H, et au mouvement de déformation angulaire entre C-N et N-H (figure 2.6b)^{2,3}. Cette bande est généralement considérée, comme une sonde structurale de la conformation moléculaire de la protéine.

La figure 2.7a représente une comparaison entre le spectre du lysozyme à l'état natif (trait bleu) et dénaturé à haute température (trait rouge). Il est évident que l'état déplié est caractérisé par rapport à l'état replié par un décalage vers les hautes fréquences de la bande AI, accompagné d'un élargissement de la bande. Ce phénomène s'explique par la rupture des liaisons H intramoléculaires (C=O...H) au sein des hélices, qui rend plus dur l'étirement de la liaison C=O. Une représentation de la position de la bande AI en fonction de la température, obtenue par une procédure d'ajustement des bandes (figure 2.7b), permet d'analyser le processus de dénaturation de la protéine⁴.

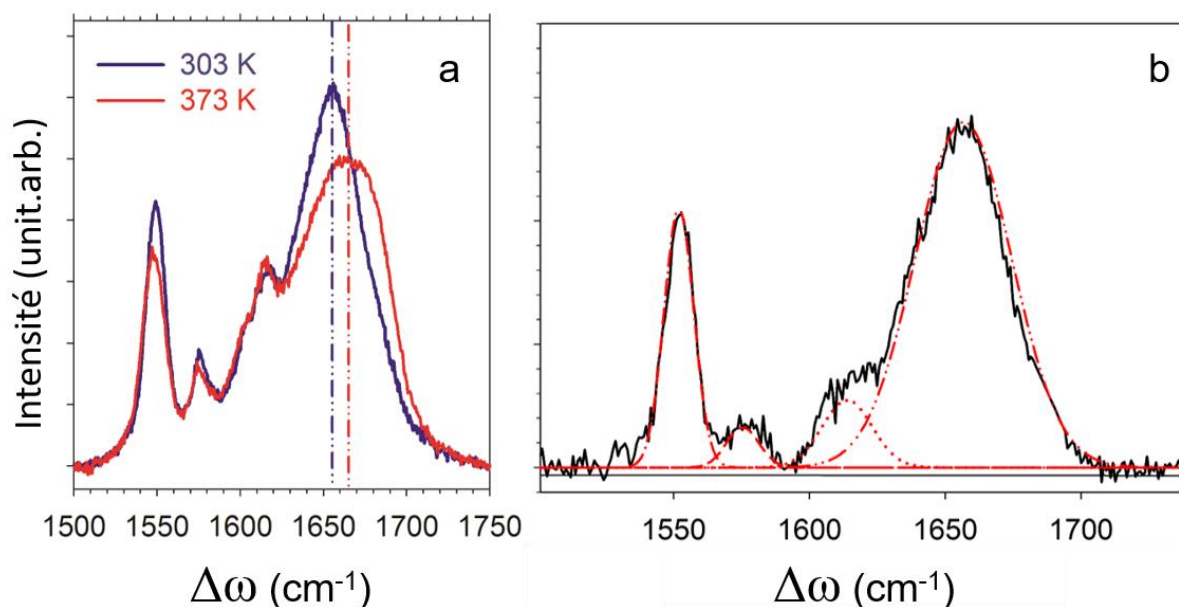


FIGURE 2.7 : Représentation de la région de la bande AI d'une solution de lysozyme dissout dans D_2O à l'état natif (20°C) et à l'état dénaturé (90°C). (b) La procédure d'ajustement permettant de déterminer la fréquence du maximum d'intensité de la bande AI.

La bande AI est souvent analysée dans la région spectrale s'étendant de 1500 à 1750 cm^{-1} afin de pouvoir déterminer au mieux la contribution du fond continue. Cette région présente l'avantage d'être distinctif de la protéine seule, sans contribution de bandes de vibration d'excipients (disaccharides, polyols, etc.) à l'exception de la bande de déformation de l'eau qui donne une très faible contribution au spectre Raman vers 1600 cm^{-1} . Cette contribution peut d'ailleurs être éliminée si on utilise l'eau lourde comme solvant, la bande de vibration glissant à plus basse fréquence ($\sim 1200 \text{ cm}^{-1}$). La figure 2.8b décrit l'évolution de la fréquence de la bande AI en fonction de la température, obtenue pendant une procédure de chauffage d'une solution de lysozyme dissout dans D_2O . Chaque point de la courbe a été obtenu à l'aide de la procédure d'ajustement présentée sur la figure 2.7b. Il est notable, que la courbe de dénaturation chaude d'une solution de lysozyme dissout dans D_2O peut être divisée en trois étapes ((1), (2) et (3) sur la figure 2.8b). Les spectres caractéristiques à chaque étape sont représentés sur la figure 2.8a. Le plateau observé entre 25 et 55 $^{\circ}\text{C}$ est considérée comme caractéristique de la structure secondaire de l'état natif de la protéine. Aucun paramètre de la bande caractérisant l'état de la structure secondaire (fréquence et largeur) présente une variation significative sur cet intervalle de température.

A partir de 55 $^{\circ}\text{C}$ jusqu'à 72.5 $^{\circ}\text{C}$, la fréquence de la bande est décalée vers les basses fréquences. Cette étape correspond à l'amplification des échanges isotopiques entre l'eau lourde et la protéine, qui montre que les groupements non exposés au solvant, se trouvant au sein de la protéine à l'état natif, le sont devenus. Ce

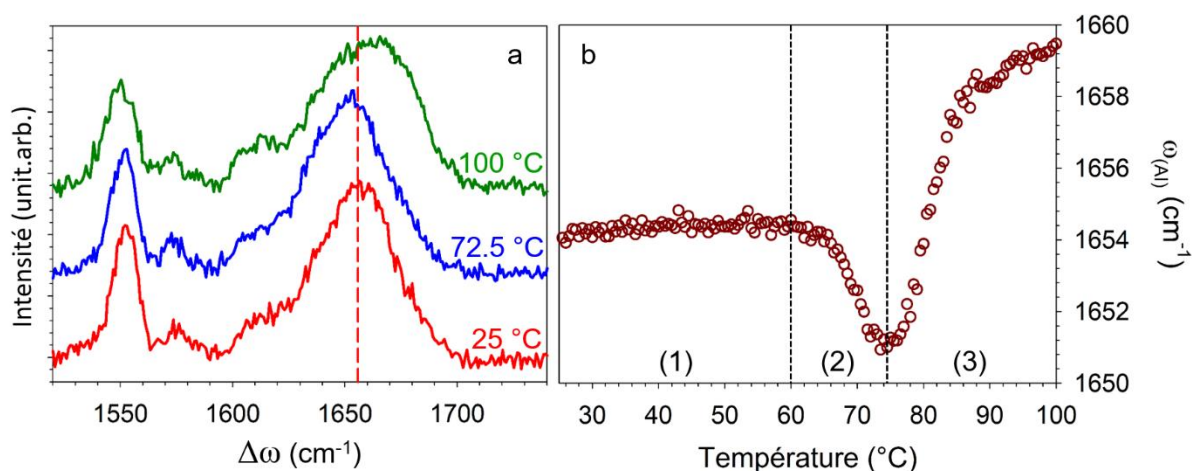


FIGURE 2.8 : Dénaturation thermique du lysozyme dissout dans l'eau lourde. (a) représentation de la région de la bande AI, du lysozyme, à l'état natif (trait rouge), à l'état « molten globule » (trait bleu) et à l'état dénaturé (100 $^{\circ}\text{C}$). (b) L'évolution de la position de la bande AI en fonction de la température, (1), (2) et (3) correspond à trois étapes de dénaturation chaude de la protéine en solution.

phénomène est dû à la pénétration du solvant à l'intérieur de la protéine, ce qui est possible dans une structure tertiaire plus flexible⁵. Une comparaison du spectre de la bande AI collecté à 25 °C et à 72.5 °C, montre que le décalage de la fréquence de la bande vers les basses fréquences est la seule différence détectée, la largeur de la bande reste constante, ce qui signifie que la structure secondaire de la protéine est intacte. Toutefois, cet état flexible appelé « molten globule », est précurseur du dépliement de la structure secondaire de la protéine, et correspond à une structure tertiaire plus flexible que dans l'état natif.

La troisième partie de la courbe de dénaturation thermique du lysozyme en solution est caractérisé par un décalage de la bande AI, vers les hautes fréquences, qui commence vers 72.5 °C et fini vers 100 °C. Le spectre de la bande AI collecté à 10 0°C est différent de celui collecté à 72.5 °C non seulement par le décalage en fréquence, mais aussi par sa forme de la bande qui est asymétrique, ce qui indique que la structure secondaire de la protéine est dépliée⁵. Cette partie de la courbe peut être ajustée en utilisant une fonction sigmoïdale d'expression :

$$\nu = \left(\frac{\nu_N - \nu_D}{1 + \exp\left(\frac{T - T_m}{\Delta T}\right)} \right) + \nu_D \quad (2.7)$$

où ν_N et ν_D représentent les fréquences de la bande AI dans les états natif et dénaturé, T_m est la température à demi-transformation et ΔT représente le domaine de température sur lequel s'étale la transformation. La valeur de la température T_m déterminée par la procédure d'ajustement utilisant la fonction 2.7 caractérise rigoureusement le dépliement de la structure secondaire de la protéine.

La figure 2.9 représente la comparaison de la courbe de dénaturation du lysozyme en solution obtenue par spectroscopie Raman et l'endotherme de dénaturation de la même solution, obtenue par analyse enthalpique différentielle. Il est notable que la température de dénaturation déterminée par spectroscopie Raman (T_m^{II}) ne correspond pas à celle déterminée par analyse calorimétrique (T_m^I), la dernière correspondant au maximum de l'endotherme c'est-à-dire au processus global de dénaturation comprenant les transformations des structures tertiaire puis secondaire. Cela montre que la spectroscopie Raman permet d'obtenir la description très fine du mécanisme de dénaturation en discriminant les deux transformations des structures secondaires et tertiaire, en utilisant l'eau lourde comme solvant.

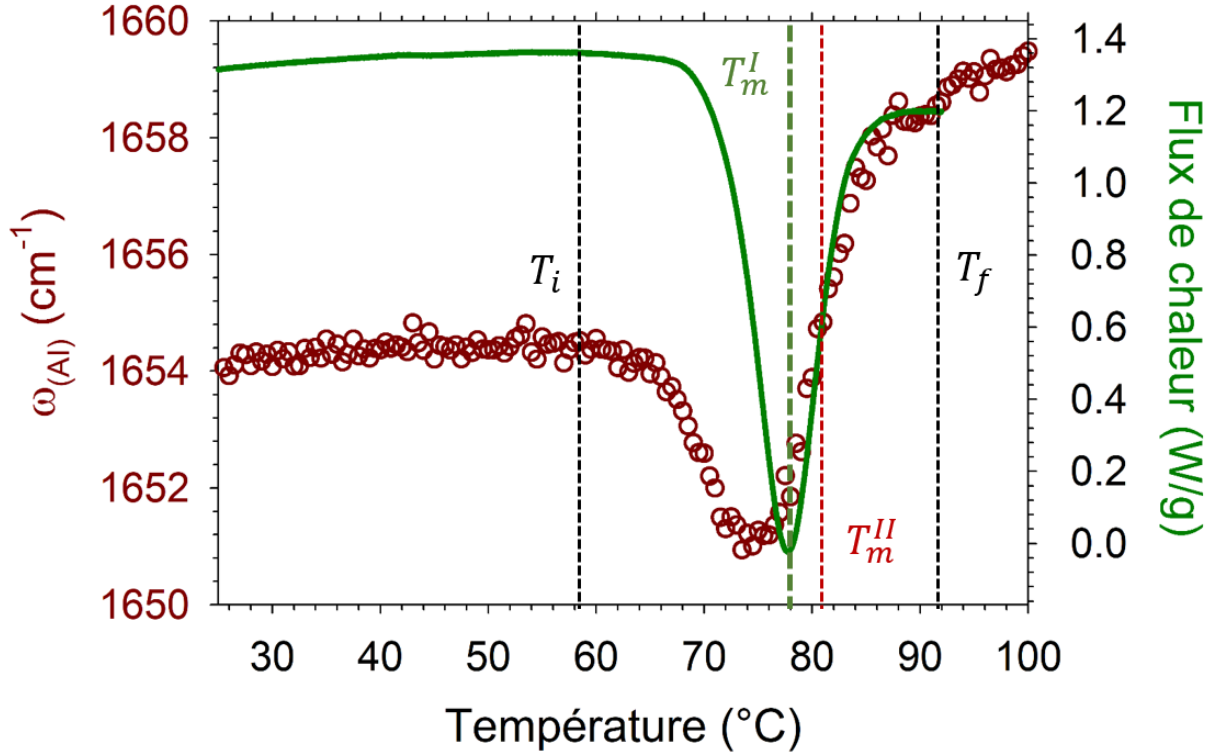


FIGURE 2.9 : Comparaison des courbes de dénaturation obtenues par spectroscopie Raman (cercles vides) et analyse enthalpique différentielle (trait plein vert foncé).

La même zone spectrale de la bande AI peut être utilisée pour quantifier le degré de dénaturation de la protéine. Cette méthode consiste à calculer un coefficient r , qui caractérise le degré de similarité entre les spectres de la protéine à l'état natif et à l'état dénaturé. Pour la première fois, elle a été décrite et utilisée par Kendrick et al. 1996⁶, pour les dérivées secondaires des spectres IR. Plus tard, Hédoux et al. 2012⁷ ont appliqué cette méthode, directement aux spectres Raman bruts (non dérivés, non lissés, mais renormés) des états natif et dénaturé d'une solution de lysozyme. Ce coefficient caractérise l'ensemble des changements de forme de la bande AI, ce qui permet d'obtenir plus de précision sur le degré de dénaturation de la protéine par rapport à la seule considération du décalage de la position de la bande. La figure 2.10 décrit la méthode de calcul de ce coefficient de similarité r , déterminer selon l'équation 2.8 :

$$r = \frac{I_0}{I_0 + I_{diff}} \quad (2.8)$$

où I_0 est l'intensité intégrée de la région de chevauchement des spectres et I_{diff} est l'intensité intégrée de la différence des spectres. Si les spectres sont similaires ($r = 1$), la protéine n'est pas dénaturée. Par contre, une petite valeur de r reflète un degré de

dénaturation important. Dans le cas des cartographies Raman, les valeurs de r sont calculées pour chaque spectre de la cartographie et représentées comme une image de la distribution du degré de dénaturation de la protéine, en gardant les position x et y de chaque spectre.

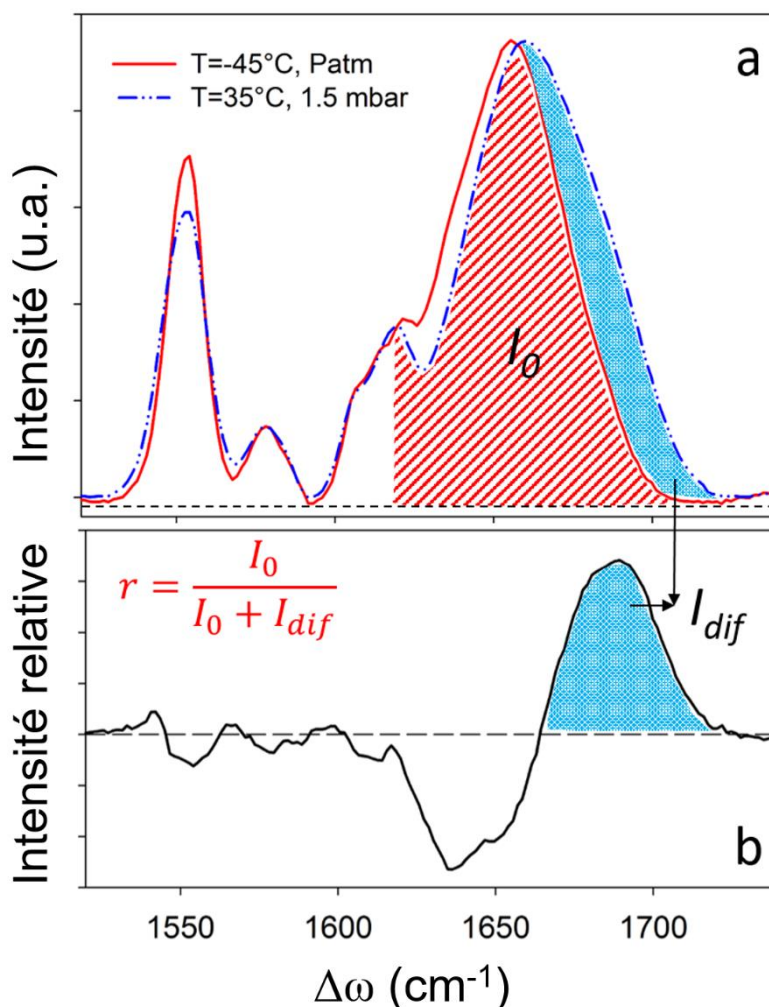


FIGURE 2.10 : Méthode calcul du coefficient de similarité entre les spectres enregistrés dans l'échantillon L pendant la lyophilisation. (a) Comparaison des spectres collectés après congélation (état natif) et après séchage primaire (état dénaturé). La zone rouge correspond à la superposition des deux spectres (I_0). (b) Le spectre différence des deux spectres présentés sur la figure (a). La zone bleue correspond à I_{dif} utilisé pour le calcul de coefficient r .

Les **bandes Amide III** (figure 2.5) correspondent principalement à une combinaison des mouvements d'étirement et de déformation angulaire des liaisons C-N et N-H (figure 2.6b), respectivement. Toutes les bandes de vibrations, observées entre 900-1400 cm^{-1} , sont de plus faible intensité, comparativement à la bande AI. Ceci provient du fait que les différents types de conformation (hélices, feuillets), donnent des contributions résolues et isolées alors que les mouvements correspondant à la bande AI donnent des contributions non résolues au spectre pour les différents types

de conformation. L'analyse des bandes AIII pourra donc être utilisée pour obtenir des informations plus fines sur la nature des modifications structurales. Cependant, on notera que la région des bandes AIII, s'étalant entre 1200 et 1400 cm^{-1} contient généralement de nombreuses bandes de vibration d'excipients (disaccharides, polyols, cyclodextrines, etc.) rendant plus délicat le dépouillement des bandes AIII.

2.3.3. Spectres Raman fréquences (2000-3800 cm^{-1})

Dans cette étude, l'eau lourde a été utilisée pour la préparation des échantillons, afin d'éviter la pollution de la bande amide par la contribution des mouvements de déformation angulaire H-O-H ($\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$). Un deuxième effet de l'eau lourde, correspond au décalage en fréquence des bandes de vibration d'étirement des liaisons O-H, observées vers 3200-3800 cm^{-1} dans H_2O et vers 2000-2800 cm^{-1} pour les bandes de vibration d'étirement des liaisons O-D dans D_2O . Donc, lorsqu'une protéine est dissoute dans l'eau lourde, le spectre de la solution aqueuse est composé de trois types de bandes de vibrations : (i) entre 2000 et 2800 cm^{-1} correspondant aux mouvements intramoléculaires de vibration d'étirement des liaisons O-D (νOD), dans le solvant constitué d'eau lourde, (ii) entre 2800-3200 cm^{-1} correspondant aux mêmes mouvements des liaisons C-H (νCH) dans la protéine (et le sucre s'il y en a) et (iii) entre 3200 et 3800 cm^{-1} correspondant aux mêmes mouvements des liaisons O-H (νOH) dans la protéine résultant des échanges isotopiques entre la surface de la protéine et le solvant (groupements OH non exposés au solvant) et dans le solvant.

2.4. Analyses multivariées des données spectrales

Une analyse classique des données, consiste souvent à analyser une seule variable : l'intensité intégrée, la position ou la largeur d'une bande dans un spectre. Si le spectre contient un nombre important de bandes, il n'est pas trivial de déterminer une corrélation ou une anti-corrélation entre les résultats obtenus sur le spectre complet. L'analyse multivariée des données est un outil qui peut être utilisé afin de déterminer toutes les variables caractéristiques du système analysé, ainsi que les corrélations entre elles et cela sans *a priori* sur le système chimique étudié. Dans la littérature, on connaît plusieurs types d'analyses multivariées qui dépendent de l'objectif recherché et des données accessibles pour décrypter un spectre d'un

système multi-composantes. On peut classer ces méthodes en deux grands groupes : les méthodes descriptives (analyse en composantes principales, analyse factorielle, résolution multivariée des courbes, etc.) qui permettent d'observer les contributions spectrales des espèces chimiques et les méthodes explicatives comme les régressions multiples, etc., qui permettent d'expliquer une variable dépendante comme une concentration d'un produit d'intérêt à partir de variables indépendantes issues des spectres.

2.4.1. Analyse en Composantes Principales

Une des méthodes descriptives, couramment utilisée pour l'analyse de données spectrales Raman^{8,9} ou infrarouge¹⁰, est l'Analyse en Composantes Principales (ACP, ou *PCA* en anglais),^{11,12} élaborée par Pearson en 1901¹³ et améliorée plus tard par Hotelling en 1933¹⁴.

Soit une matrice des données spectrales initiale **D** qui contient suivant ses lignes m spectres et suivant ses colonnes n longueurs d'onde. La figure 2.11 montre que chaque spectre de la matrice initiale peut être représenté comme un point dans l'espace des longueurs d'onde (ici de dimensions 3). L'ensemble du jeu de données et donc de la matrice **D** peut alors être considéré comme un nuage des points dans le même espace λ . L'étalement des points dans cette représentation permet d'appréhender les variances du jeu de données (figure 2.11).

L'analyse en composantes principales, a pour objectif, de trouver à partir du jeu de données les directions de plus grandes variances créant ainsi un nouveau sous-espace, de dimensions réduites. Ainsi les projections de chaque point du jeu de données sur ces nouveaux axes reconstituent les positions des points les uns par rapport aux autres, en déformant le moins possible le nuage des points initiaux (figure 2.12a). Ces nouveaux axes de coordonnées s'appellent composantes principales (CPs) et sont orthogonales et donc non-corrélées deux à deux. Chaque CP exprime une partie de la variance totale du système qui est décroissante d'une CP à l'autre. Ainsi la première composante principale extrait la plus grande variance du jeu de données, la seconde exprime la variance résiduelle non prise en compte par la première etc. Les projections de chaque point (spectre) sur les nouveaux axes de coordonnées s'appellent *scores*. Puisqu'un spectre est maintenant représenté par un

point dans un espace multidimensionnel, plus la distance entre deux points est grande, plus ces deux spectres seront différents et réciproquement.

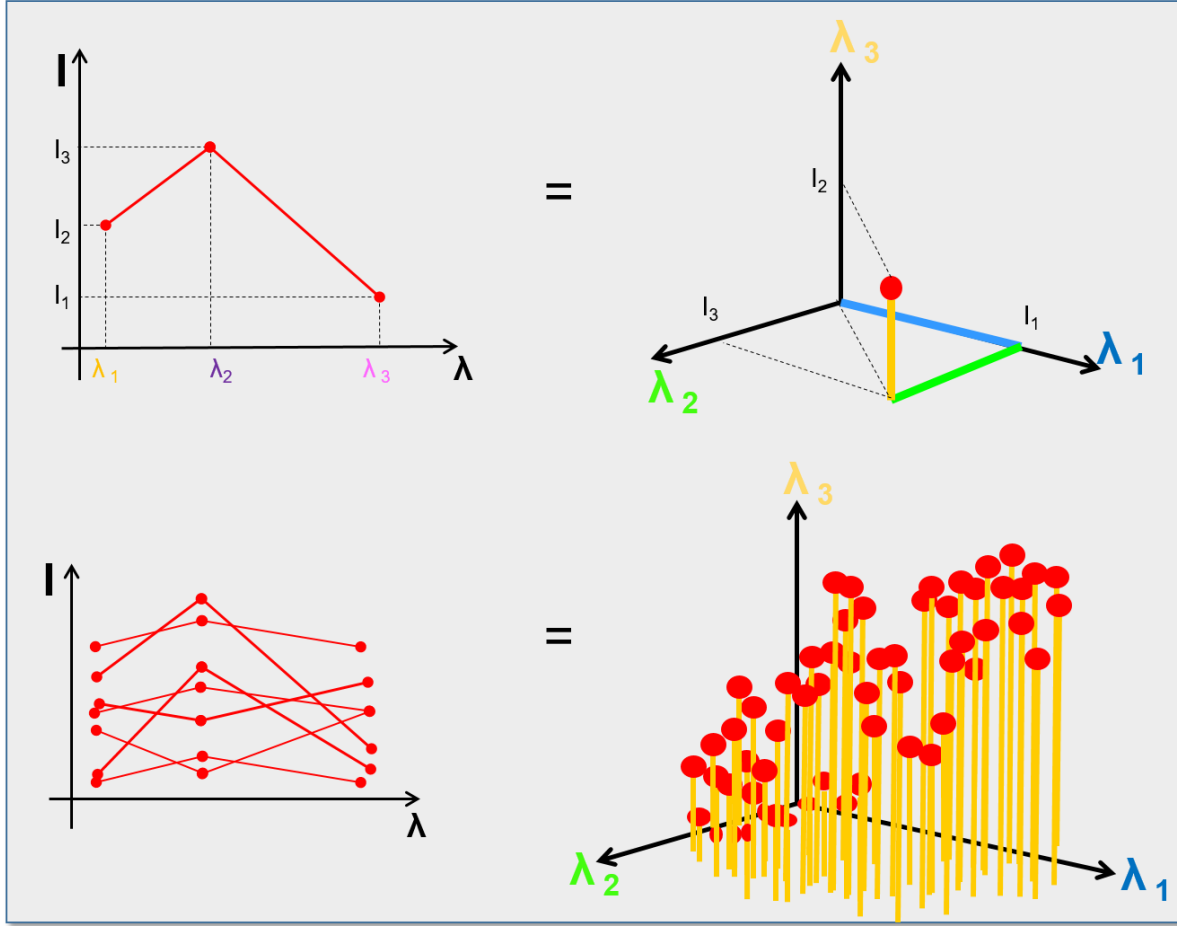


FIGURE 2.11 : Représentation géométrique des spectres Raman à trois longueurs d'onde, comme un nuage de point dans un espace λ .

Le principal algorithme de calcul de l'ACP est basé sur la décomposition en valeurs singulières de la matrice initiale de données. Soit la matrice **D** de dimension $m \times n$ (figure 2.12b). Il existe alors une factorisation de cette matrice appelée décomposition de la matrice **D** en valeurs singulières de forme suivante :

$$\mathbf{D} = \mathbf{U} \cdot \mathbf{S} \cdot \mathbf{P}^t \quad (2.9)$$

où **U** est une matrice unitaire orthogonale de dimension $m \times m$ ($\mathbf{U} \cdot \mathbf{U}^t = \mathbf{U}^t \cdot \mathbf{U} = \mathbf{I}$), **S** est une matrice diagonale de dimension $m \times n$ avec des valeurs positives et réelles et **P^t** est une matrice unitaire orthonormée de dimension $n \times n$. La matrice **S** contient les valeurs singulières, qui élevées au carré, permettent de retrouver la variance exprimée par les différentes composantes principales. Le produit des matrices **U** et **S** est égale à une troisième matrice **T** qui contient les valeurs des scores de chaque spectre pour les différentes composantes principales. La matrice **P^t** contient les CPs qui représentent

une combinaison linéaire des variables d'origine et sont considérées comme des nouvelles variables du système analysé (figure 2.12b). Il est théoriquement possible d'extraire p composantes ($p = \max(m,n)$) à partir d'un jeu de données afin d'exprimer 100 % de la variance totale du jeu de données. Néanmoins l'objectif est ici d'arrêter un nombre de composantes principales inférieur à p n'exprimant que les variations chimiques et non le bruit. On peut ainsi dire que l'ACP permet de compresser les données et mettre en évidence la variance maximale du système, en éliminant la variance résiduelle générée par le bruit.

Dans le cadre de cette thèse, l'analyse en composantes principales a été réalisée sur des cartographies enregistrées sur des formulations protéiques à l'état sec, fraîchement lyophilisés. Les scores obtenus par ACP, dans le cas des

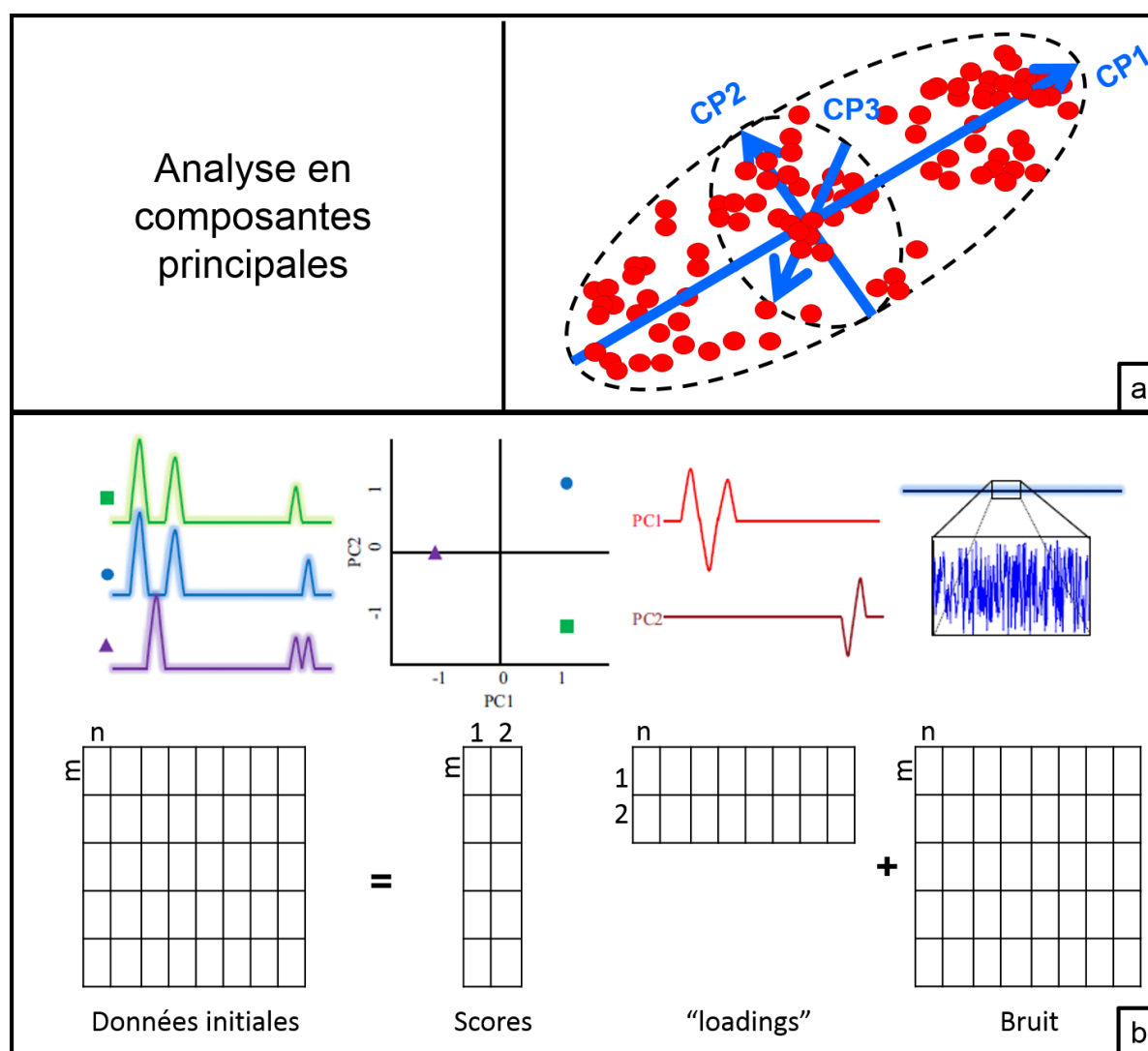


FIGURE 2.12 : Représentation schématique du principe de l'analyse en composante principale. (a) représentation du nuage de point dans un nouvel espace ; (b) décomposition de la matrice initiale à l'aide de l'analyse en composantes principales.

cartographies, ne sont plus représentés comme un nuage de points sur un espace bi ou tridimensionnelle (comme dans la figure 2.12), mais comme une image qui conserve les dimensions x et y de chaque spectre de la cartographie initiale. Afin de mieux comprendre cette nouvelle spécificité, nous proposons de décrire ici la gestion d'une expérience d'imagerie hyperspectrale. Une cartographie Raman a été enregistrée sur une surface de l'échantillon choisie (figure 2.13a). 100 spectres ont été collectés dans une zone spectrale contenant 400 variables (figure 2.13b) correspondant aux fréquences auxquelles l'intensité Raman est mesurée. Une ACP a été réalisée sur ce jeu de données et les résultats obtenus pour la première composante principale sont reportés sur la figure 2.13c, pour la représentation de la composante principale et 2.13d représentant l'image des scores associés. Sur l'image des scores on peut distinguer 5 zones numérotées de 1 à 5. Ces 5 zones sont caractérisées par des valeurs des scores qui sont négatifs dans les zones 1 et 2, avec

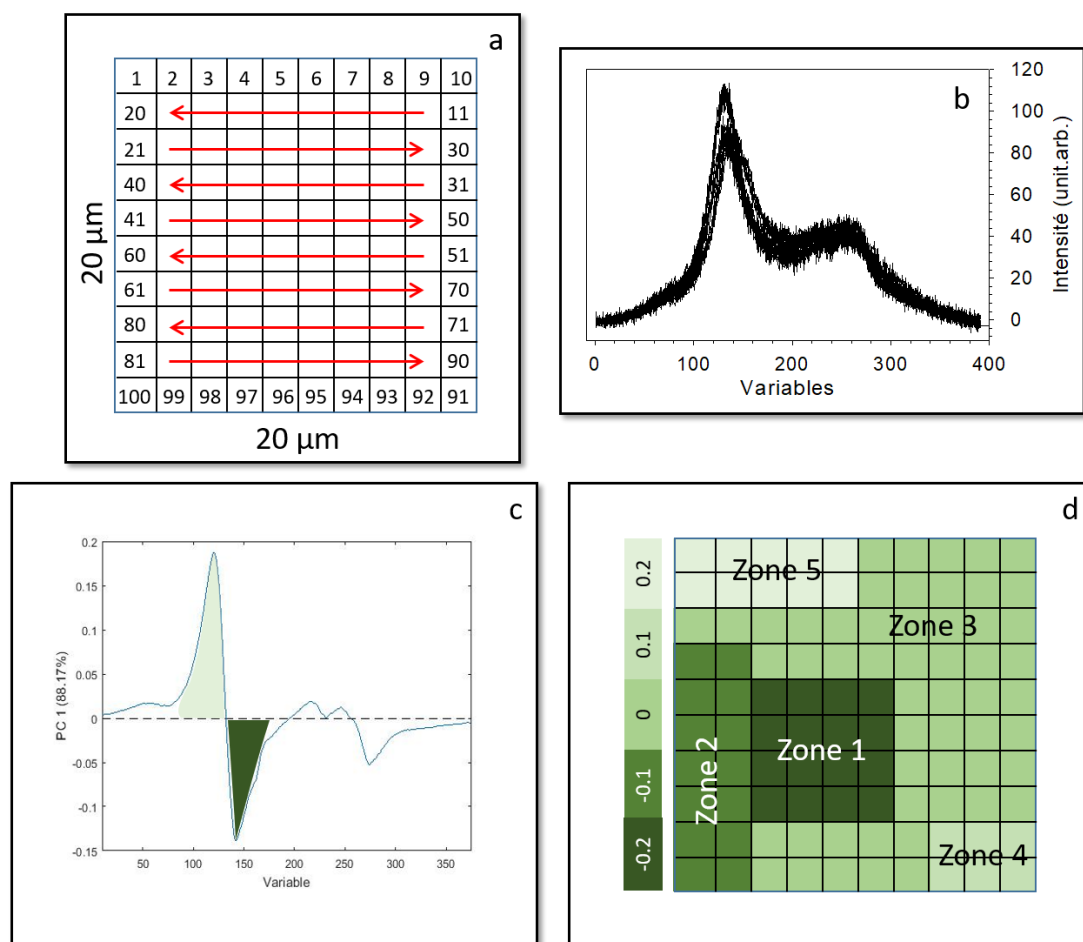


FIGURE 2.13 : Exemple d'analyse ACP sur une cartographie correspondant à une région $60 \times 60 \mu\text{m}$, balayée point par point, chaque point correspondant à un spectre numéroté en (a) ; les 100 spectres collectés durant cette cartographie sont tracés en (b). L'image des « scores » suivant la première composante principale résultant de l'ACP est présentée en c) et en d) est tracé le « loading » de la CP1, comme une combinaison linéaire des variables d'origine assimilable à une sorte de spectre.

un maximum des valeurs absolues dans la zone 1, des valeurs positives dans les zones 4 et 5, avec un maximum dans la zone 5 et des valeurs proches de zéro dans la zone 3. Ceci indique que la variance correspondant à la première CP, est maximale dans les régions de l'échantillon correspondant aux zones 1 et 5. De la même manière, on peut dire que la zone 3 n'est pas décrite par cette composante principale.

Pour mieux comprendre la différence entre les spectres collectés dans ces différentes zones spatiales (figure 2.13b), on analyse la représentation de la première CP (figure 2.13c). Les contributions spectrales significatives dans cette CP sont comprises entre les variables numérotées de 95 à 155. L'influence des autres variables dans cette composante principale étant considérée comme négligeable. On observe aussi que la CP prend des valeurs positives aux fréquences correspondant aux variables numérotées de 95 à 120 et des valeurs négatives entre les variables allant de 120 à 155. Ainsi les zones de l'échantillon où les scores sont plus importants présenteront des spectres avec de plus fortes contribution entre les variables spectrales 95 à 120 mais en même des contributions plus faibles entre les variables spectrales 120 à 155. La situation sera réciproque pour les zones présentant des scores négatifs.

L'utilisation de l'ACP, permet de mettre en évidence des hétérogénéités spatiales et de les corrélérer à des modifications spectrales localisées, à partir d'un ensemble de spectres collectés lors d'une cartographie Raman. Cette méthode est donc, un excellent outil pour explorer et décrire un jeu de données sans *a priori*. Toutefois, par ACP, il est impossible d'extraire des spectres des espèces pures se trouvant dans la formulation. Ceux-ci peuvent être obtenus en appliquant des méthodes plus avancées comme *la résolution multivariée des courbes (MCR-ALS)*.

2.4.2. La résolution multivariée des courbes (MCR-ALS)

La résolution de courbes multivariées (MCR-ALS) est une analyse de plus en plus utilisée pour traiter les données spectroscopiques. Bien que l'ACP permette de caractériser efficacement le système analysé, les résultats obtenus sont cependant purement mathématiques et restent difficiles à interpréter par les non-spécialistes. Les solutions déterminées par application de MCR-ALS ont par-contre un sens physique ou chimique réel, car cette analyse permet de modéliser les spectres des espèces pures présentes dans le système analysé, ainsi que leurs concentrations associées

dans chaque spectre collecté dans la cartographie. Contrairement à l'analyse en composantes principales, qui est basée sur une décomposition de la matrice initiale, en un produit de plusieurs matrices orthonormées, la MCR-ALS consiste à transformer la matrice des données $\mathbf{D}$, correspondant aux spectres enregistrés pendant une cartographie Raman, en un produit de deux matrices : la matrice $\mathbf{S}$ des spectres des espèces pures et la matrice $\mathbf{C}$ des concentrations de ces espèces dans chaque spectre de la matrice initiale, selon la relation 2.10.

$$\mathbf{D} = \mathbf{C} \cdot \mathbf{S}^t + \mathbf{E}$$

$$\begin{bmatrix} x_{11} & \cdots & x_{1j} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{i1} & \cdots & x_{ij} \end{bmatrix} = \left(\begin{bmatrix} c_{11} & \cdots & c_{1n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{i1} & \cdots & c_{in} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} s_{11} & \cdots & s_{j1} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ s_{1n} & \cdots & s_{jn} \end{bmatrix} \right) + \begin{bmatrix} e_{11} & \cdots & e_{1j} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ e_{i1} & \cdots & e_{ij} \end{bmatrix} \quad (2.10)$$

où $\mathbf{D}$ représente la matrice initiale de données, $\mathbf{C}$ représente la matrice des concentrations des n contributions pures et $\mathbf{S}^t$ représente la matrice transposée des spectres des n contributions pures.

Le principe de la méthode peut être représenté comme un cycle à plusieurs étapes, représenté sur la figure 2.14. La première étape consiste à calculer une estimation initiale de la matrice des spectres des espèces pures $\mathbf{S}_{ini}^t$ à partir de la matrice initiale de données $\mathbf{D}$ suivant des critères définis plus loin dans le texte. Si on remplace la matrice ainsi obtenue dans l'équation 2.10, on peut calculer une estimation de la matrice des concentrations de ces espèces dans chaque spectre $\mathbf{C}_{est}$ (2). Pour que les solutions obtenues par MCR-ALS aient un sens chimique ou physique, des contraintes doivent être appliquées sur la matrice des concentrations $\mathbf{C}_{est}$, comme par exemple imposer la non-négativité de ses valeurs (3). La matrice $\mathbf{C}_{est}$ est ainsi transformée en une matrice contrainte notée $\mathbf{C}_{ctr}$. Si cette fois-ci on remplace la

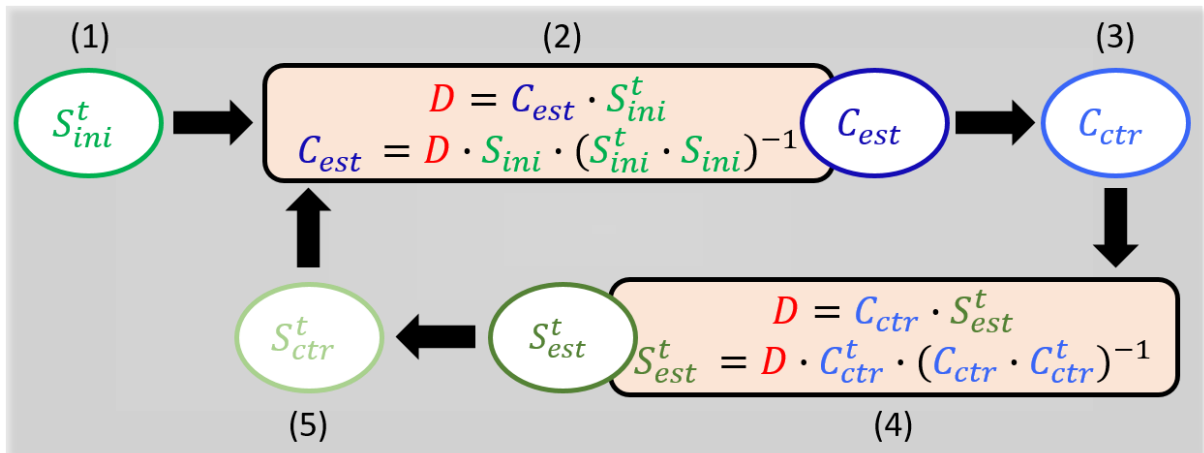


FIGURE 2.14 : Représentation schématique de l'algorithme de calcul de la MCR-ALS.

matrice des concentrations $\mathbf{C}_{\text{ctr}}$ dans l'équation 2.10, on peut déterminer une nouvelle matrice des spectres des espèces pures estimées $\mathbf{S}_{\text{est}}^t$ qui sera une version affinée par rapport à la matrice des spectres purs précédente(4). Les matrices $\mathbf{C}$ et $\mathbf{S}^t$ sont ainsi affinées successivement au cours des itérations jusqu'à convergence. Comme pour la matrice de concentration, des contraintes peuvent être à nouveau appliquées à la matrice des spectres $\mathbf{S}_{\text{est}}^t$ afin d'obtenir des solutions représentatives de la réalité. De manière analogue, nous pouvons commencer cette procédure à partir d'une estimation initiale de la matrice des concentrations ($\mathbf{C}_{\text{ini}}$), suivi par la détermination des matrices spectres ($\mathbf{S}_{\text{est}}^t$) et concentrations ($\mathbf{C}_{\text{est}}$) estimées, l'affinement des solutions lors de la boucle et l'application des contraintes restant identiques.

En général, le choix de la matrice d'initialisation $\mathbf{C}_{\text{ini}}$ ou $\mathbf{S}_{\text{ini}}^t$ dépend de la matrice des données $\mathbf{D}$:

a) Si le système analysé présente une évolution de concentration définie comme une cinétique de transformation par exemple, l'estimation initiale de la matrice des spectres purs peut être déterminée à l'aide de *l'analyse factorielle évolutive* (anglais *EFA*).¹² Le principe de cette analyse est de suivre l'évolution des valeurs singulières à partir d'une ACP, en ajoutant un spectre à la matrice de données à chaque étape jusqu'à obtenir la matrice complète des spectres collectés durant la cinétique.

b) Si la matrice initiale contient des spectres non ordonnées, sans aucune direction d'évolution, les matrices $\mathbf{C}_{\text{ini}}$ et $\mathbf{S}_{\text{ini}}^t$ peuvent être déterminées à l'aide d'autres algorithmes comme *Simplisma*^{13,14} ou *OPA*¹⁴. Le premier algorithme est basé sur la détermination de la pureté des spectres, par rapport à la moyenne tandis que le deuxième est basé sur le calcul du degré de différence d_i , entre le spectre référence et les spectres d'un bloc de données choisis dans la matrice initiale.

L'algorithme de la MCR-ALS est relativement complexe, mais l'interprétation des résultats est beaucoup plus simple. Les solutions trouvées à la fin de cette analyse contiennent non seulement les spectres des espèces pures présentes dans la matrice de données analysée, mais aussi les concentrations de chaque espèce dans chaque spectre de la matrice. Dans le cas de MCR-ALS, réalisées sur des cartographies, on représente les valeurs de concentration sous forme d'une image en gardant la position x et y initiales de chaque spectre lors de l'acquisition. Cette représentation nous permet de visualiser une distribution des contributions pures, sur la surface de l'échantillon

analysé. Dans le cadre de cette thèse, plusieurs cartographies, collectées sur plusieurs échantillons différents, ont été analysées simultanément correspondant à une analyse dite « multiblocs ». Ce type d'analyse permet de comparer non seulement la variabilité intra-système, mais aussi la variabilité inter-systèmes.

2.5. Synthèse des études récentes développées dans l'équipe sur la stabilité des protéines lors d'une procédure de lyophilisation

La micro-spectroscopie Raman a permis de suivre *in-situ* la stabilité de la protéine lors d'une procédure de lyophilisation et ainsi de déterminer la (ou les) source(s) de stress responsable(s) de changements structuraux au sein de la protéine. La majorité des études menées dans le but de déterminer les changements structuraux inhérents à une procédure de lyophilisation correspondent principalement à des mesures réalisées à la fin du cycle, sur le lyophilisat. Une cellule à pression et température variable (*Linkam FDCS 196, Linkam Scientific Instruments, Guildford, Surrey, UK*), a permis de simuler un cycle de lyophilisation, en reproduisant les trois étapes du cycle décrites dans le chapitre 1. Les analyses effectuées sur des formulations les plus simples possibles (protéine-eau, protéine-eau-sucre), ont permis, d'une part, une mise en évidence claire de changements structuraux, et d'autre part d'apporter de premières informations sur l'effet stabilisateur des sucres, en particulier celui du tréhalose. Deux types de cycles de lyophilisation ont été menés sur plusieurs protéines modèles (lysozyme, β -lactoglobuline, et chymotrypsinogène), suivant que la formulation contenait ou pas de sucre¹⁵⁻¹⁷.

2.5.1. Lyophilisation de formulations protéine/eau.

Les études ont été réalisées sur des formulations dans lesquelles la protéine était dissoute dans l'eau lourde (10% de concentration massique), afin d'observer d'éventuels échanges isotopiques liés à une altération de l'état natif de la protéine, lors des étapes de la procédure de lyophilisation. Un second intérêt de l'utilisation de l'eau lourde est abaisser les modes internes d'élongation de l'eau dans un domaine spectral proche de la bande AI. Les spectres Raman collectés entre 1500 cm^{-1} et 2800 cm^{-1} permettent de suivre simultanément les modifications structurales de la

protéine en fonction du processus de lyophilisation, c'est-à-dire des caractéristiques du solvant (l'état physique, concentration, etc.). Les formulations protéines-D₂O ont été analysées pendant un cycle de lyophilisation représenté sur la figure 2.15a pour différentes protéines modèles (β -lactoglobuline, chymotrypsinogène, sérum d'albumine bovin, lysozyme). La confrontation des résultats a permis de dégager des informations communes sur les sources et la nature des dégradations des protéines. Les plus importantes sont décrites ci-dessous sur la β -lactoglobuline (β LG).

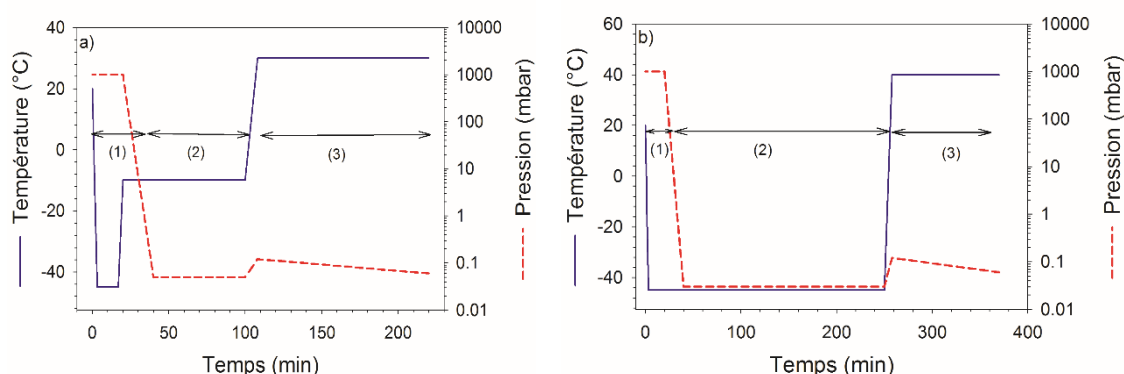


FIGURE 2.15 : Cycles de lyophilisation d'une solution de protéine en absence de tréhalose (a) et en présence de tréhalose (b). (1) correspond à la congélation de la solution, (2) au séchage primaire (sublimation de la glace) et (3) au séchage secondaire (ref.17).

La figure 2.16¹⁵ montre l'évolution des bandes AI et AIII lors des trois étapes de la lyophilisation. Les modifications spectrales les plus significatives de la bande AI ont été détectées après les deux étapes de séchage. La différence entre les spectres correspondant aux états dénaturé et non-dénaturé comparée à celle des spectres caractéristiques de la dénaturation chaude (figure 2.17a¹⁵) a mise en évidence des modifications structurales bien plus conséquentes après lyophilisation qu'après chauffage. Une analyse sur un large domaine spectral a montré que les différentes bandes associées aux éléments de la structure secondaire subissaient, après séchage, un élargissement très marqué accompagné d'un glissement de fréquences. Les analyses simultanées de la bande AI et de la bande caractéristique la plus intense de la glace (représentées sur la figure 17b¹⁶) ont permis d'étudier plus précisément la stabilité de la protéine pendant la cinétique de sublimation de la glace. Cette étude, présentée sur la figure 17c¹⁶, a révélé que la sublimation de la glace en grand volume provoque aucune modification spectrale dans la région de la bande AI, la dégradation

de la protéine serait liée à la sublimation de la glace résiduelle, probablement au voisinage de la surface de la protéine.

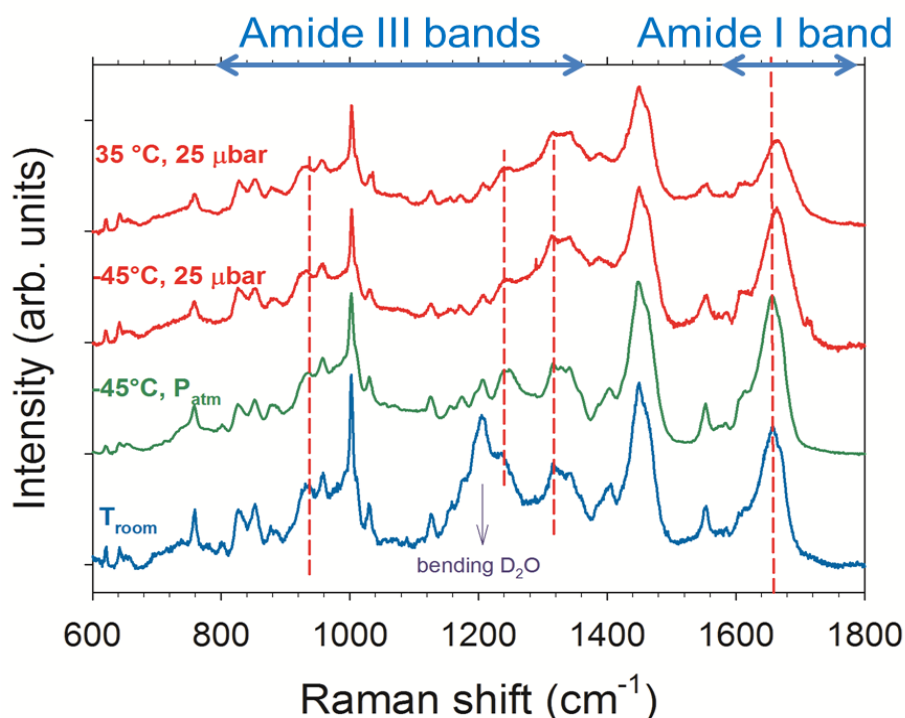


FIGURE 2.16 : Evolution du spectre de la région des bandes AI et AIII au cours des étapes de la lyophilisation de la solution β LG/D₂O. Les spectres collectés pendant la procédure de lyophilisation sont comparés à celui de la solution β LG/D₂O.

L'étude in-situ¹⁵ des cycles de lyophilisation de formulations protéine-D₂O a donc révélé que :

- l'origine principale des modifications structurales était la sublimation de la glace résiduelle au voisinage de la surface de la protéine et la désorption de l'eau liée à la protéine, en fin de cinétique de sublimation et après séchage secondaire
- la nature des modifications structurales est différente de celle correspondant à un dépliement de la structure secondaire de la protéine en solution aqueuse, soumise à différents types de stress (haute et basse températures, haute pression). Il s'agit plutôt d'une déformation des feuillets et hélices induite par la désorption d'eau ce qui engendre une désorganisation des arrangements structuraux.

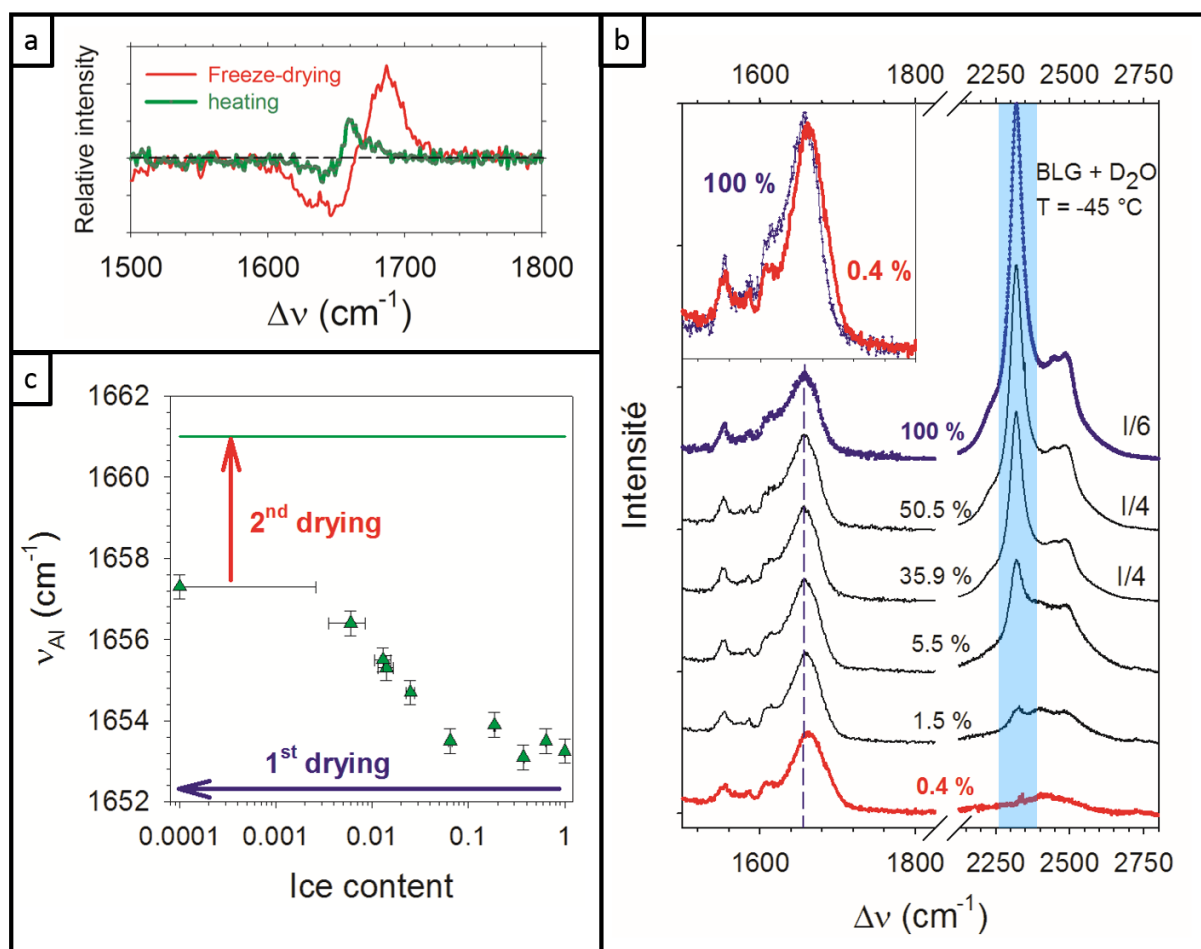


FIGURE 2.17 : (a) Comparaison des différences de spectres entre l'état natif de β LG et les états dénaturés par lyophilisation et par chauffage de la même solution. (b) Spectres Raman collectés simultanément dans les régions de la bande A-I et celle des vibrations d'étirement des liaisons O-D, durant la cinétique de sublimation à -45 °C du produit congelé (β LG/D₂O). Les pourcentages reportés sur cette figure correspondent à la proportion de glace déterminée par intégration de la bande située dans la zone coloriée. L'insert supérieur gauche montre les spectres de la bande A-I pour une proportion de 100 % et 0.4 % de glace dans le volume analysé. (c) Evolution de la fréquence de la bande A-I en fonction de la proportion de glace durant la cinétique de sublimation, comparée au glissement déterminée après le second séchage de la solution β LG/D₂O

2.5.2. Lyophilisation de formulations protéine/eau/tréhalose.

Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2, chapitre 1, afin d'éviter un phénomène d'effondrement ou « collapse », et de favoriser un phénomène de dénaturation via une mobilité moléculaire trop importante, la température du produit (T_p) ne doit pas être supérieure à la température de « collapse » (T_c). Cette dernière dépend de la composition de la formulation, et principalement des agents bioprotecteurs utilisés. La température T_c est généralement 2 degrés plus basse que T_g' . Pour éviter les dommages que peut subir un lyophilisat au niveau de la structure de la protéine (dénaturation), la détermination de la température T_g' d'une formulation

à lyophiliser est importante. Ceci a pour conséquence de modifier légèrement le cycle de lyophilisation comme indiqué sur la figure 2.16b.

Le même type d'analyses réalisées en présence de tréhalose^{15,16} (10, 20 et 30% en masse) ont montré que :

- le tréhalose avait un effet stabilisateur sur la protéine, très significatif, durant le cycle de lyophilisation, et principalement durant la cinétique de sublimation
- une concentration supérieure à 10% ne permettait pas une meilleure stabilisation de la protéine

Des cartographies Raman ont été ensuite effectuées à chaque fin d'étape avec un double objectif ; analyser la répartition des espèces chimiques composant la formulation afin de mettre en évidence des interactions préférentielles entre elles et analyser la stabilité de la protéine sur la même zone de l'échantillon, pour mieux comprendre le mécanisme de stabilisation du tréhalose. Ces études¹⁶ ont conduit aux conclusions suivantes :

- La répartition des espèces chimiques est relativement hétérogène dès l'étape de congélation. Cette répartition est le reflet d'interactions préférentielles entre l'eau et la protéine à l'état liquide, induisant, de ce fait, l'existence de régions très riches en tréhalose après congélation.

Compte tenu que les régions très riches en tréhalose ont été identifiées comme étant des régions où la protéine est la plus dégradée, et que l'effet bioprotecteur du tréhalose est principalement observé durant la cinétique de sublimation, il a été considéré que le mécanisme de stabilisation du tréhalose était lié à la capacité du tréhalose à former une matrice hôte vitreuse très rigide, dans laquelle la protéine est imbriquée. En étant figée dans la matrice hôte rigide, la protéine aurait plus de difficultés à se déformer, lorsqu'elle est soumise à des contraintes internes telles que le déplacement de molécules d'eau.

REFERENCES

1. Hédoux, A. Recent developments in the Raman and infrared investigations of amorphous pharmaceuticals and protein formulations: A review. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **100**, 133–146 (2016).
2. Williams, R. W. & Dunker, a K. Determination of the secondary structure of proteins from the amide I band of the laser Raman spectrum. *J. Mol. Biol.* **152**, 783–813 (1981).
3. Surewicz, W. K., Mantsch, H. H. & Chapman, D. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment. *Biochemistry* **32**, 389–394 (1993).
4. Nidhi, K., Indrajeet, S., Khushboo, M., Gauri, K. & Sen, D. J. Hydrotrophy: A promising tool for solubility enhancement: A review. *Int. J. Drug Dev. Res.* **3**, 26–33 (2011).
5. Hédoux, A. *et al.* Evidence of a two-stage thermal denaturation process in lysozyme: A Raman scattering and differential scanning calorimetry investigation. *J. Chem. Phys.* **124**, (2006).
6. Kendrick, B. S., Dong, A., Allison, S. D., Manning, M. C. & Carpenter, J. F. Quantitation of the area of overlap between second-derivative amide I infrared spectra to determine the structural similarity of a protein in different states. *J. Pharm. Sci.* **85**, 155–158 (1996).
7. Hédoux, A., Seo, J. A., Guinet, Y. & Paccou, L. Analysis of cold denaturation mechanism of β -lactoglobulin and comparison with thermal denaturation from Raman spectroscopy investigations. *J. Raman Spectrosc.* **43**, 16–23 (2012).
8. Pieters, S. *et al.* Raman spectroscopy and multivariate analysis for the rapid discrimination between native-like and non-native states in freeze-dried protein formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **85**, 263–271 (2013).
9. Roessler, U., Leitgeb, S., Pieters, S., De Beer, T. & Nidetzky, B. In situ protein secondary structure determination in ice: Raman spectroscopy-based process analytical tool for frozen storage of biopharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* **103**, 2287–2295 (2014).
10. Rosas, J. G. *et al.* NIR spectroscopy for the in-line monitoring of a multicomponent formulation during the entire freeze-drying process. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **97**, 39–46 (2014).
11. Vandenbroucke, T. R. a *et al.* Metal-induced malformations in early Palaeozoic plankton are harbingers of mass extinction. *Nat. Commun.* **6**, 7966 (2015).
12. Durand, C. *et al.* The Organization Pattern of Root Border-Like Cells of Arabidopsis Is Dependent on Cell Wall Homogalacturonan. *Plant Physiol.* **150**, 1411–1421 (2009).
13. Pearson, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philos. Mag. Ser. 6* **2**, 559–572 (1901).
14. Hotelling, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J. Educ. Psychol.* **24**, 417–441 (1933).
15. Keller, H. R. & Massart, D. L. Evolving factor analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **12**, 209–224 (1991).

16. Windig, W. *et al.* Interactive self-modeling multivariate analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **9**, 7–30 (1990).
17. Sánchez, F. C., Toft, J., van den Bogaert, B., Massart, D. L. & Sanchez, F. C. Orthogonal projection approach applied to peak purity assessment. *Anal. Chem.* **68**, 79–85 (1996).
18. Hédoux, A., Paccou, L., Achir, S. & Guinet, Y. In Situ Monitoring of Proteins during Lyophilization using Micro-Raman Spectroscopy: A Description of Structural Changes induced by Dehydration. *J. Pharm. Sci.* **101**, 2316–2326 (2012).
19. Hedoux, A., Paccou, L., Achir, S. & Guinet, Y. Mechanism of protein stabilization by trehalose during freeze-drying analyzed by in situ micro-raman spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* **102**, 2484–2494 (2013).
20. S. Achir. Etude des mécanismes de stabilisation des protéines par spectroscopie Raman et dynamique moléculaire. 123 (2014).

CHAPITRE 3.

ETUDE DE LA STABILITE DES PROTEINES A L'ETAT SOLIDE

Comme il a été décrit dans le Chapitre 1, la lyophilisation est un processus considéré comme relativement doux pour les protéines, très onéreux, mais induisant des pertes d'activité enzymatique et des modifications conformationnelles des protéines. Afin de palier une perte de fonction d'une protéine thérapeutique la quantité de protéine est augmentée pour respecter le dosage nécessaire à l'efficacité thérapeutique du traitement. Ceci augmente encore le coût d'une procédure de lyophilisation dans la mesure où le prix des protéines d'intérêt thérapeutique est généralement élevé. Afin de limiter les modifications structurales associées aux pertes des fonctions des protéines, des excipients comme les disaccharides, les polyols, etc, sont ajoutés dans la formulation, mais souvent de manière empirique¹⁻³.

Le tréhalose est un disaccharide de même formule chimique ($C_{12}H_{22}O_{11}$) que le saccharose, mais reconnu pour présenter des propriétés bioprotectrices exceptionnelles comparé aux autres excipients couramment utilisés³⁻⁵. Récemment, des études ont montré qu'une petite quantité de glycérol ajouté au tréhalose exacerbeait son efficacité bioprotectrice^{1,6-8}. Une concentration massique de 5 % de glycérol par rapport au tréhalose conduit à un minimum de perte d'activité des deux enzymes : peroxydase de raifort et alcool déshydrogénase¹. Des études menées sur des systèmes binaires (glycérol/tréhalose) ont montré que le glycérol influence le comportement du tréhalose par la suppression de la dynamique locale du tréhalose^{6,9}. Cette hypothèse a été confirmée par des études de spectroscopie diélectrique réalisées sur des films de glycérol – tréhalose^{10,11}. Les auteurs ont conclu que le glycérol a un rôle plastifiant ou antiplastifiant qui dépend à la fois de la température et de la fraction massique du glycérol¹⁰. Ils ont montré que l'efficacité bioprotectrice du sucre était maximale pour une fraction massique de glycérol/tréhalose de 5 %.

Les études qui ont montré l'amélioration de l'efficacité bioprotectrice du tréhalose par l'ajout d'une faible quantité de glycérol ont été réalisées à la fin de

procédures de lyophilisation de formulations protéiques par mesures d'activité enzymatique¹, ce qui ne permet pas de comprendre par quel mécanisme le glycérol renforce l'efficacité du tréhalose. Les expériences menées dans cet objectif ont été faites sur des systèmes tréhalose-glycérol^{6,7,9-11}, apportant des informations sur les modifications des propriétés du tréhalose par le glycérol. Cependant les résultats obtenus sont trop abstraits en absence de protéine. Il est ainsi impossible d'expliquer précisément comment le glycérol modifie l'action du tréhalose sur la protéine.

Il a été montré^{12,13}, dans le cadre de la thèse de S. Achir¹⁴, que la micro-spectroscopie Raman offrait la possibilité d'analyser la stabilité de la protéine in-situ lors d'une procédure de lyophilisation, en analysant le spectre de la bande AI, tout en sondant les paramètres qui contrôlent les étapes de la lyophilisation. Il s'agit des modes de vibration de l'eau, principalement les modes intramoléculaires d'étirement intenses et isolés, dans la mesure où les étapes de la lyophilisation correspondent à des transformations de l'état physique de l'eau. Ces études in-situ menées en temps réel pendant les trois étapes de la lyophilisation ont permis de déterminer les principales sources de stress responsables de la dégradation de la protéine ainsi que la nature des modifications structurales engendrées par ces stress. Il a également été possible de déterminer à quelle étape le tréhalose avait une action bioprotectrice prépondérante, permettant de décrire le mécanisme physique de bioprotection.

Seules des analyses de micro-spectroscopie Raman ont permis d'obtenir ces informations. Cependant, il est évident que ces analyses ne sont pas réalisées lors de procédures de lyophilisation industrielles, ce qui revient à négliger certains phénomènes, essentiellement liés à la cristallisation de la glace, à la conduction thermique et à la diffusion, dont les effets sur des volumes et micro-volumes peuvent être différents. Une différence significative est bien sûr la durée d'une procédure qui va dépendre fortement du volume de l'enceinte où sont placées les fioles contenant les formulations à lyophiliser. De ce fait, une première partie de ce chapitre est consacrée à l'analyse de poudres résultant des lyophilisations réalisées sur des solutions protéiques de volume classique, en utilisant un lyophilisateur de laboratoire (Martin-Christ type Epsilon 2-4D) implanté à l'Université de Lille 2. La seconde partie sera consacrée aux études in-situ par micro-spectroscopie Raman pendant des procédures de lyophilisation.

3.1. Etude des produits à la fin du processus de lyophilisation : influence de la quantité du glycérol sur l'action bioprotectrice des disaccharides pendant la lyophilisation

Dans cette partie, plusieurs formulations à l'état sec ont été analysées par micro-spectroscopie Raman après lyophilisation des solutions lysozyme-eau, lysozyme-eau-sucre et lysozyme-eau-sucre-glycérol. Les solutions ont été préparées en dissolvant la phase cristalline du tréhalose di-hydrate ou du saccharose avec le lysozyme dans l'eau doublement distillée. La solution protéine-eau, contient 10 % en masse de protéine. Les solutions ternaires ont été préparées avec un rapport massique protéine-sucre égal à 1. Les formulations contenant du glycérol ont été préparées en ajoutant une petite quantité du glycérol dans la solution protéine-sucre-eau fraîchement préparée. La fraction massique du glycérol, dans les mélanges sucre-glycérol, varie entre 2.5 à 8 %. Toutes les solutions ont été mélangées pendant une heure en étant placées dans un agitateur de tubes Eppendorf à la température ambiante. Un volume de 7 ml de chaque solution a ensuite été versé dans des tubes en verre d'un diamètre interne d'environ 2.5 cm et pré-congelé à -20 °C pendant la nuit. Le cycle de lyophilisation est représenté sur la figure 3.1. Pendant la congélation, toutes les formulations pré-congelées, ont été refroidies jusqu'à -45 °C à une vitesse de 10 °C/min. Les conditions imposées pour le séchage primaire ($T_{\text{étage}} = -45\text{ °C}$, $P_{\text{ch}} = 0.055\text{ mbar}$) correspondant à la sublimation de la glace ont été maintenues pendant 10 h. La température de consigne des étagères a ensuite été amenée à 30 °C et maintenue pendant 10 h afin de pouvoir évaporer l'eau non-congelée de l'échantillon. La pression de la chambre a été diminuée jusqu'à 0.014 mbar et maintenue durant l'étape du séchage secondaire.

Les échantillons lyophilisés ont été étudiés par micro-spectroscopie Raman. Des cartographies ont été systématiquement réalisées en utilisant la technique de balayage classique, point par point, disponible sur le spectromètre Renishaw. Pour cette étude, la source émettant à la longueur d'onde $\lambda = 785\text{ nm}$, a été sélectionnée afin de minimiser la contribution de la fluorescence au signal Raman. Le faisceau incident a été focalisé via un objectif $\times 50$, de longue distance de travail décrit dans le chapitre 2, qui correspond à un volume d'analyse d'environ $150\text{ }\mu\text{m}^3$. La zone choisie, d'aire $40 \times 40\text{ }\mu\text{m}^2$, a été balayée par pas de $2\text{ }\mu\text{m}$. Dans cette configuration, 400

spectres ont été collectés pendant environ 2h, (temps d'acquisition de 25 s/spectre), dans la région spectrale 1200-1800 cm^{-1} . L'objectif de la cartographie est de prendre en compte les potentielles variabilités au niveau local, afin de mieux décrire l'échantillon.

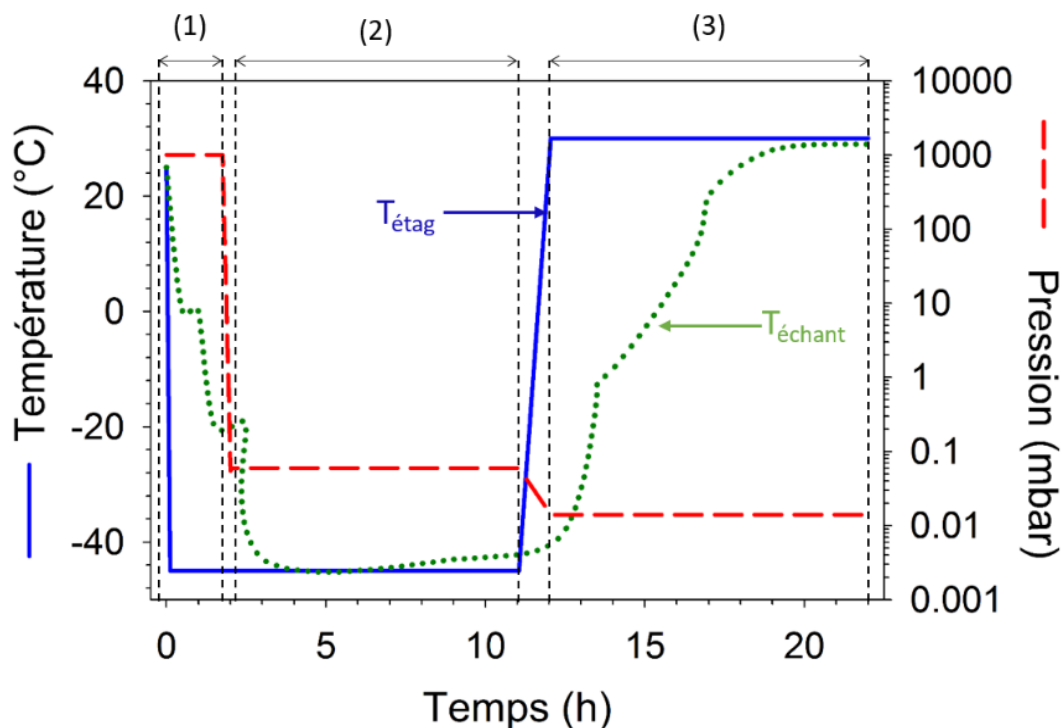


FIGURE 3.1 : Cycle typique de lyophilisation des formulations lyophilisées avec le lyophilisateur Martin-Christ type Epsilon 2-4D (1), (2) et (3) correspondent aux 3 étapes de lyophilisation : congélation, séchage primaire et secondaire, respectivement.

Cette zone est composée, principalement, des bandes du lysozyme et du disaccharide utilisé (tréhalose ou saccharose) dans la mesure où l'eau résiduelle ainsi que le glycérol sont en trop faible quantité pour pouvoir être détectés. Ce domaine spectral a été sélectionné car il permet de sonder la présence de ces deux espèces (disaccharide et lysozyme) dans la matrice solide ainsi que le degré de dénaturation de la protéine. La figure 3.2 représente le spectre du lysozyme (trait rouge), du tréhalose amorphe (trait bleu) et du mélange lysozyme-tréhalose (trait vert), lyophilisés dans l'eau non-deutérée. On remarque que dans la zone spectrale étudiée, les bandes du tréhalose se superposent à celles du lysozyme, exceptée dans la région 1500-1800 cm^{-1} qui contient uniquement des bandes caractéristiques du lysozyme et plus particulièrement la bande A1. On note cependant que dans le domaine 1300 -1450 cm^{-1} , le spectre Raman de la formulation protéine/sucre/eau reflète principalement celui

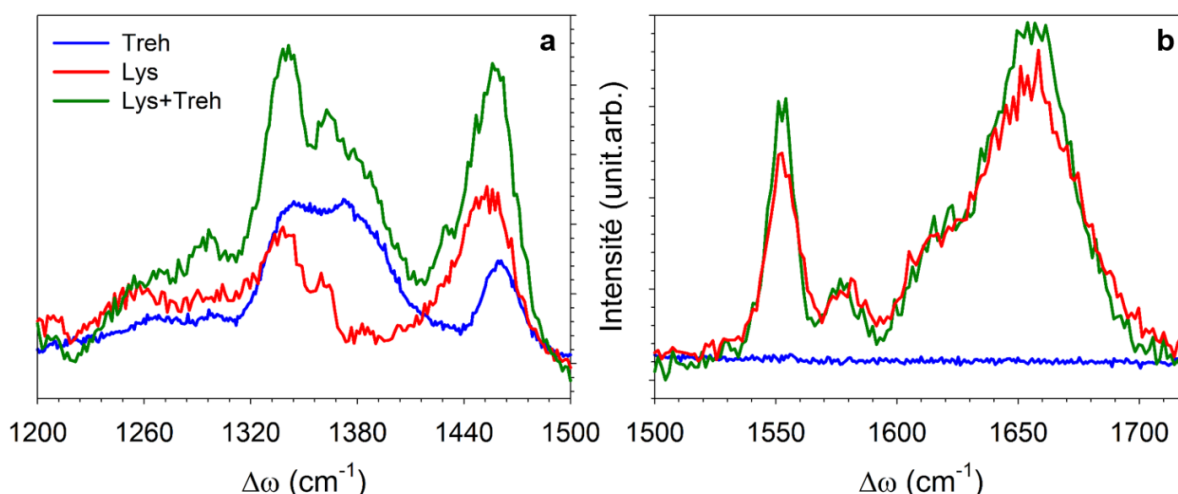


FIGURE 3.2 : Spectres Raman collectés dans trois échantillons différents (lysozyme, tréhalose amorphe et lysozyme/tréhalose lyophilisé) dans les zones spectrales analysées. (a) représente la zone spectrale 1200-1500 cm^{-1} , principalement composée des bandes distinctives du tréhalose (1360 et 1380 cm^{-1}) permettant de sonder la présence du tréhalose, et des bandes AIII du lysozyme ; (b) représente la zone spectrale de la bande A1 qui permet à la fois de sonder la présence de la protéine dans la matrice solide et d'étudier les changements de la structure secondaire observée à la fin de la lyophilisation. Aucune contribution du tréhalose n'est observée dans cette zone.

du tréhalose, avec deux bandes dominantes vers 1350 et 1380 cm^{-1} . De ce fait, l'intensité Raman dans cet intervalle 1360-1410 cm^{-1} , est dans une bonne approximation proportionnelle à la quantité du sucre dans la surface analysée de la formulation solide, alors que l'intensité mesurée dans la région 1500-1800 cm^{-1} , est rigoureusement proportionnelle à la quantité de lysozyme dans le même volume analysé.

Les spectres obtenus ont été traités en utilisant des analyses multivariées, plus précisément *l'analyse en composantes principales* (ACP) et la *résolution des courbes multivariées* (MCR-ALS). Le principe de ces deux méthodes a été expliqué dans la section 2.3 du chapitre 2. La sensibilité de ces deux méthodes permet de révéler de très fines modifications spectrales souvent cachés sous le bruit des spectres. L'originalité de ce travail est de pouvoir comparer plusieurs cartographies entre elles, ce qui n'est pas permis par l'utilisation du logiciel Renishaw WIRE. Il est ainsi possible d'analyser non seulement la variance au sein d'un échantillon seul, mais aussi la variance entre plusieurs échantillons. En d'autres termes, les paramètres pertinents (tel que les distributions du degré de dénaturation et des espèces chimiques) déterminés par ces analyses seront comparables entre eux, d'un échantillon à un autre.

Toutes les analyses de données ont été effectuées en utilisant la « boîte à outils » PLS Toolbox (Eigenvector Research Inc, USA) pour l'environnement Matlab 2015. L'étape préalable des analyses multivariées est le prétraitement des spectres, qui a été le même pour les deux types d'analyse. Les spectres des cartographies réalisées sur chaque échantillon ont été traités de la même façon. Il s'agit d'abord de retirer les contributions de la fluorescence et d'un bruit de fond à chaque spectre. A cet effet, la ligne de base a été soustraite de chaque spectre, après avoir été ajustée avec un polynôme du degré 2, en sélectionnant des zones particulières du spectre pour guider la procédure d'ajustement (méthode « baseline specified points » disponible sur PLS Toolbox). Ensuite les spectres ont été normalisés par rapport à l'intensité intégrée de la bande AI, pour exclure tout défaut de focalisation lié à la rugosité de la surface, de l'échantillon analysé. On impose de cette manière une occupation identique de la protéine sur la zone analysée, de chaque échantillon. Avant l'ACP, la matrice de donnée initiale a été centrée, c'est-à-dire qu'on a enlevé le spectre moyen de tous les spectres de la matrice. Du point de vue mathématique, cette procédure correspond au calcul d'une nouvelle origine du système de coordonnées dans lequel est représenté le nuage de point représentant la matrice initiale de données. Ce nouveau point zéro, correspond au barycentre du nuage de point lui-même.

3.1.1. Résultats obtenus sur les formulations Lysozyme-Tréhalose-Glycérol

Afin de comprendre le rôle du glycérol sur l'action bioprotectrice du tréhalose, les résultats de l'ACP et de MCR-ALS de plusieurs formulations, correspondant à différentes fractions massiques tréhalose/glycérol (0, 2.5, 5 et 8 %) ont été comparés. L'ACP a été utilisée afin de décrire les matrices de données initiales, tandis que la MCR-ALS a été utilisée pour simplifier la compréhension et aller plus loin dans la description des phénomènes. La figure 3.3A présente les images des scores associés aux CP1 et CP2, obtenues à la fin d'une ACP réalisée, simultanément, sur quatre échantillons différents : lysozyme-tréhalose (LTG_0) et lysozyme-tréhalose-glycérol

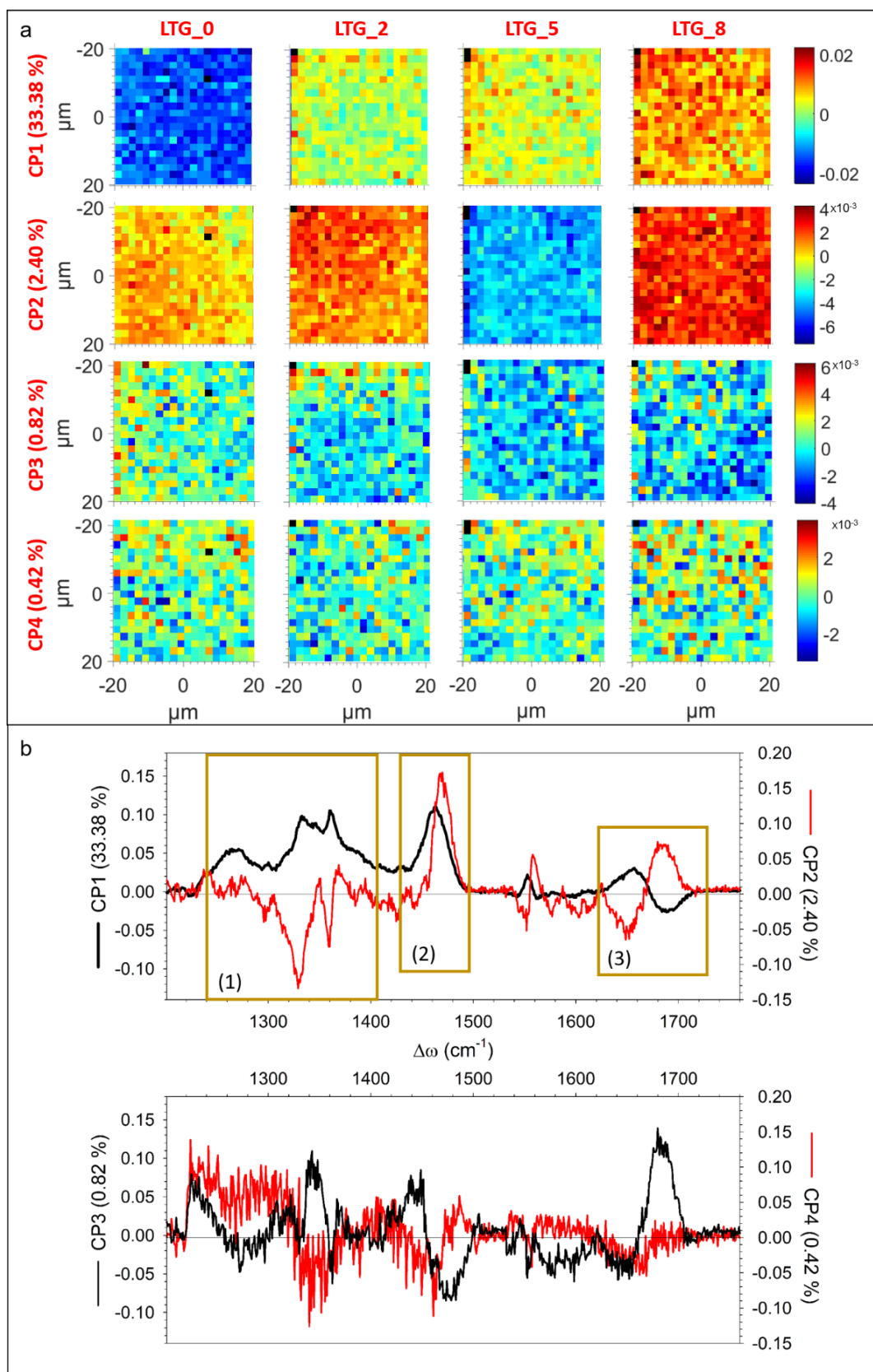


FIGURE 3.3 : (a) Les scores de la CP1, CP2, CP3 et CP4 obtenus après une ACP réalisée simultanément sur des cartographies enregistrées à la fin de la lyophilisation des mélanges lysozyme-tréhalose-eau et lysozyme-tréhalose-glycérol-eau à différentes fraction massique de tréhalose-glycérol (0, 2.5, 5 et 8 %). (b) Les composantes principales correspondantes aux images des scores.

avec différentes fraction massique tréhalose/glycérol : 2.5 % (LTG_2), 5 % (LTG_5), 8 % (LTG_8). L'observation des valeurs propres et des composantes principales ont permis de montrer que seules les trois premières composantes principales étaient significatives. La figure 3.3a montre bien qu'à partir de la quatrième composante principale, toutes les autres CP-s rendent compte du bruit de la mesure.

L'analyse globale des images montre que la variance entre les spectres collectés au sein d'un échantillon est négligeable par rapport à celle déterminée entre les spectres des différents échantillons, compte tenu de la faible dispersion des valeurs des scores au sein d'un échantillon. Les valeurs des scores de la CP1 sont négatives dans l'échantillon sans glycérol par rapport aux valeurs positives dans l'échantillon avec 8 % de glycérol et proche de zéro dans l'échantillon avec 2.5 et 5 % de glycérol. Ceci indique que la variance, correspondant à la deuxième CP, est maximale dans l'échantillon LTG_0 et LTG_8. De la même manière on peut dire que les échantillons LTG_2 et LTG_5 ne sont pas décrits par cette CP. Les valeurs des scores de la CP2 sont négatives dans l'échantillon LTG_5 par rapport aux valeurs positives dans les trois autres (LTG_0, LTG_2 et LTG_8), ceci indique, donc, que la variance exprimée par cette CP est maximale dans l'échantillon contenant 5 % de glycérol et 0, 2.5 et 8 % de glycérol. La CP3 n'exprime que 0,82 % de la variance totale. L'interprétation des images des scores de la CP3 devient donc difficile. Cependant, on observe une majorité des scores avec des valeurs négatives dans l'échantillon LTG_5 par rapport aux autres trois échantillons.

Pour mieux comprendre la différence entre les spectres collectés dans ces différents échantillons, on analyse la représentation de ces quatre CPs (figure 3.3b). Les modifications spectrales, qui reflètent la variance totale des échantillons analysés, exprimée par les CP1, CP2 et CP3 se situent dans trois zones spectrales : 1200-1400 cm^{-1} (figure 3.3b (1)), 1420-1490 cm^{-1} (figure 3.3b (2)) et 1600-1720 cm^{-1} (figure 3.3b (3)). La première zone spectrale concernée (1200-1400 cm^{-1}) est composée des bandes de tréhalose, glycérol et de protéine, plus précisément la bande AIII-h et AIII-f distinctive de l'arrangement moléculaire en hélices α et feuillets β . La deuxième zone spectrale (1400-1490 cm^{-1}) est attribuée aux modes de déformation angulaire des liaisons $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$. La troisième zone spectrale d'intérêt (1600-1720 cm^{-1})

correspond à la bande AI, dont les changements de paramètres (fréquence et largeur) sont associés à des modifications de la structure secondaire des protéines.

La première CP prends des valeurs positives aux fréquences correspondant à la zone 1 et 2 et des valeurs négatives aux hautes fréquences ($1650-1720\text{ cm}^{-1}$) correspondant à la zone spectrale de la bande AI. Par conséquent, les spectres collectés dans l'échantillon LTG_8, caractérisés par des valeurs positives des scores associés à la première CP (figure 3.3b), ont une forte contribution dans les zones spectrales 1 et 2 ainsi qu'une faible contribution dans la zone spectrale de la bande AI. De manière analogue, les spectres collectés dans l'échantillon LTG_0 présentent une forte contribution dans la zone spectrale 3 et une faible contribution dans les zones 1 et 2. Les valeurs, de la deuxième CP, sont négatives pour les fréquences de la zone spectrale 1 et les basses fréquences ($1610-1655\text{ cm}^{-1}$) dans la zone de la bande AI. En même temps la CP2 a des valeurs positives pour les fréquences de la zone spectrale 2 et les hautes fréquences de la bande AI. Par la suite, les spectres collectées dans l'échantillon LTG_5 présentent une forte contribution dans les zones spectrales $1200-1400\text{ cm}^{-1}$, ainsi que $1610-1655\text{ cm}^{-1}$ et les spectres collectés dans les échantillons LTG_8, LTG_2, et LTG_0 ont une forte contribution dans les zones spectrales $1450-1500\text{ cm}^{-1}$ et $1655-1720\text{ cm}^{-1}$. Etant donné le fait qu'il est difficile à comprendre la distribution des scores de la CP3, il est difficile d'interpréter les changements spectraux qui la concerne.

La compréhension des modifications spectrales correspondant à chaque CP reste délicate principalement dans les zones (2) et (3) sur la figure 3.3b. Dans la mesure où MCR-ALS fourni des informations similaires à des spectres, contrairement à l'ACP qui donne des « loading » d'intensité positive et/ou négative, l'interprétation des résultats est beaucoup plus directe. MCR-ALS calcule les spectres de ces trois contributions à partir de l'ACP, ainsi que leur concentration dans chaque spectre de la matrice initiale des données (figure 3.4). La figure 3.4b représente ces trois spectres qui décrivent toutes les modifications spectrales à l'origine de la variance décrite par l'ACP. Les différences spectrales qui peuvent être observées sur cette figure, sont situées principalement dans les zones spectrales identifiées par ACP, c'est-à-dire $1200-1400\text{ cm}^{-1}$ (1), $1420-1490\text{ cm}^{-1}$ (2) et $1600-1720\text{ cm}^{-1}$ (3), correspondant respectivement à la région spectrale complexe composée des bandes du tréhalose et

de la protéine (1), du mode de déformation angulaire $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$ (2) et la région spectrale de la bande AI (3).

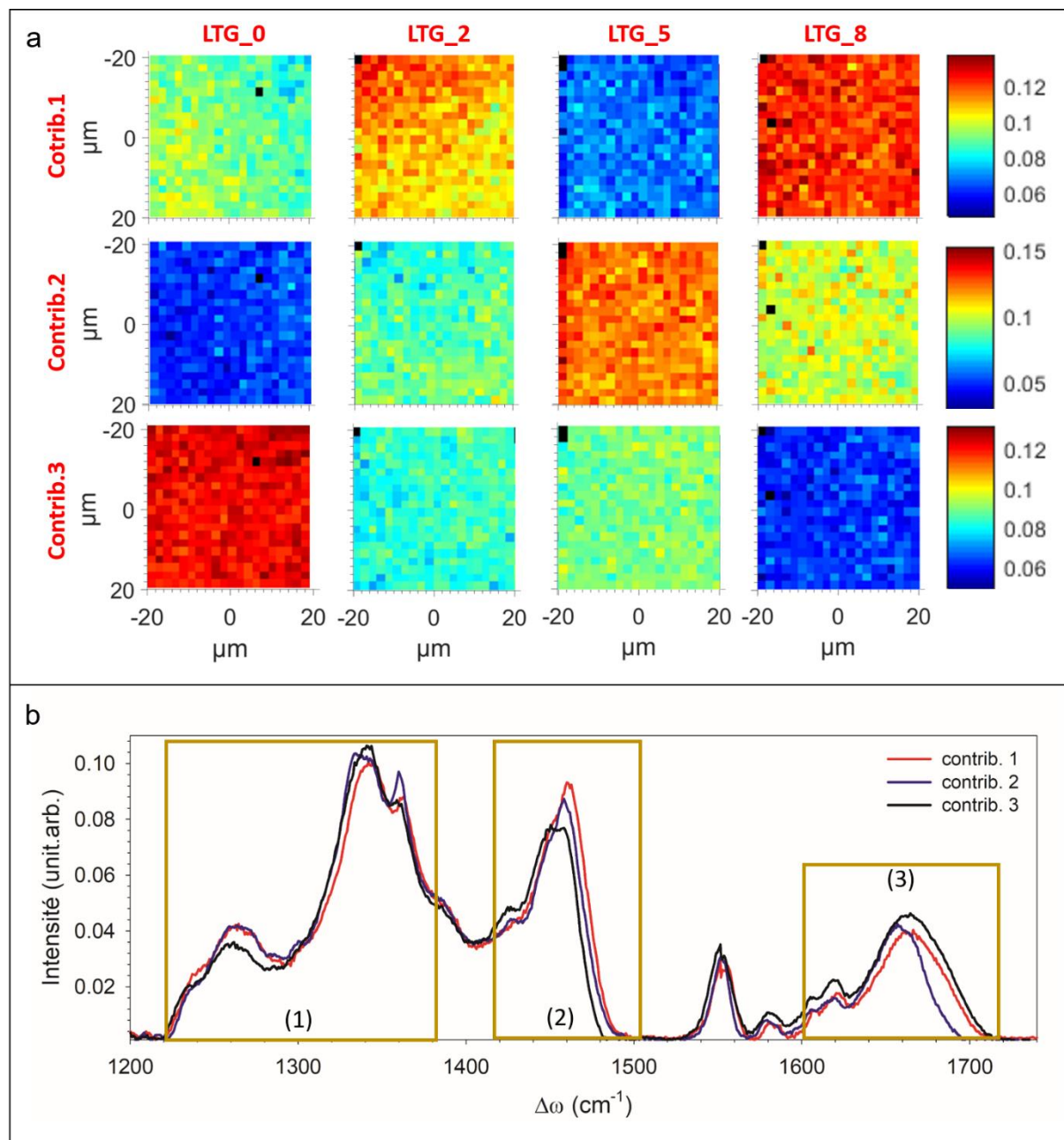


FIGURE 3.4 : (a) Images représentant la distribution des contributions pures 1, 2 et 3 dans chaque spectre de quatre cartographies collectées dans quatre échantillons (lysozyme-tréhalose, lysozyme-tréhalose-glycérol 2.5 %, lysozyme-tréhalose-glycérol 5 % et lysozyme-tréhalose-glycérol 8 %). (b) Les spectres des trois contributions 1 (trait rouge), 2 (trait bleu) et 3 (trait noir) extraits par MCR-ALS.

Si on compare les différences entre les spectres calculés par MCR-ALS dans la zone spectrale de la bande AI ($1600\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$) on constate que le spectre de la contribution 1 et 3 se distinguent de celui de la contribution 2 par un décalage de la bande AI vers les hautes fréquences. Cependant, le spectre de la contribution 3 est

différent de celui de la contribution 1, par un décalage en fréquence nettement amplifié et par un élargissement important de la bande AI, marquant ainsi une dégradation significative de la protéine. Il apparaît intéressant d'ajuster cette bande pour les trois contributions extraites, comme décrit dans le chapitre 2. Les paramètres d'ajustement obtenus pour la bande AI sont représentés dans le tableau 3.1.

TABLEAU 3.1: Paramètres d'ajustement des bandes dans la zone spectrale de la bande AI

Contributions	Position du maximum	Largeur à mi-hauteur
Contribution 1	1662.7 ± 0.1	45.4 ± 0.5
Contribution 2	1658.1 ± 0.1	35.1 ± 0.5
Contribution 3	1664.7 ± 0.1	49.8 ± 0.5

Les spectres collectés dans les échantillons contenant une concentration importante du spectre de la contribution 3 caractériseront des zones spatiales où la protéine aura été fortement dégradée par le processus de lyophilisation. La figure 3.4a représente les concentrations de ces trois contributions, déterminées par MCR-ALS, pour chaque spectre collectées dans chacune des quatre cartographies réalisées. On observe que l'échantillon LTG_5 est riche en contribution 2, l'échantillon LTG_0 est riche en contribution 3 et les échantillons LTG_2 et 8 sont riches en contribution 1. Cela indique qu'en absence du glycérol (LTG_0), la structure secondaire de la protéine est beaucoup plus affectée par le processus de lyophilisation, comparée aux autres trois échantillons qui contiennent du glycérol en différentes proportions (LTG_2, LTG_5 et LTG_8). La figure 3.4a montre également, au regard des images de concentration de la contribution 2, que l'efficacité du tréhalose augmente graduellement avec la quantité de glycérol ajouté au tréhalose jusqu'à une concentration massique de 5 % et diminue en augmentant la concentration de 5 à 8 %.

La deuxième région spectrale qui donne une contribution à la variance totale de l'ensemble des données ($1420-1490\text{ cm}^{-1}$) associée aux modes de déformation angulaire $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$, n'est pas représentative de la conformation moléculaire de la protéine. Cependant, on constate que cette bande se décale vers les basses fréquences et diminue en intensité d'une contribution à l'autre, par rapport à la contribution 1. La position du maximum de cette bande déterminée pour la contribution 1 se situe vers 1462 cm^{-1} . Cette valeur est proche de celle observée dans le spectre

du glycérol pur¹⁵. De ce fait, cette zone spectrale peut être considérée comme marqueur de la présence du glycérol dans la formulation. En sachant que l'échantillon LTG_8, LTG_5 et LTG_0 sont riches en contributions 1, 2 et 3 respectivement et que l'intensité de la bande se trouvant à 1462 cm^{-1} diminue graduellement d'une contribution à l'autre, on peut en déduire que les modifications spectrales observées dans cette zone sont associées à la variation de la quantité du glycérol présente dans le mélange.

La dernière zone spectrale ($1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$) qui donne aussi une contribution à la variance totale des données spectrales, est composée d'un chevauchement de bandes du tréhalose, du glycérol et de la protéine. Il est très difficile alors d'identifier l'origine réelle de ces changements observés sur les spectres dans ce domaine de fréquences. Toutefois, la zone spectrale $1200\text{-}1240\text{ cm}^{-1}$ principalement composée d'une bande AIII-f de la protéine, distinctive de l'arrangement en feuillets β n'est pas polluée par des contributions du tréhalose ou de glycérol. On observe, que le spectre de la contribution 3 montre l'élargissement de la bande AIII-f, pouvant résulter d'une déformation locale de la structure en feuillets β . Les images des concentrations montrent que l'échantillon riche en contribution 3, ne contient pas de glycérol, ce qui indique qu'en absence de glycérol, toutes les entités de la structure secondaire de la protéine sont affectées par la lyophilisation. Toutefois, il faut prendre en compte que la variance inhérente à cette zone spectrale reste faible, et que les changements structuraux correspondants le sont également.

Ces résultats indiquent que l'action bioprotectrice du tréhalose est améliorée en présence du glycérol. De plus, on remarque que l'efficacité du glycérol est fortement liée à la fraction massique du glycérol dans le mélange tréhalose/glycérol. Effectivement, il a été montré que l'ajout de 5% de glycérol (par rapport à la masse du tréhalose) a un effet beaucoup plus important que 2 ou 8 %. L'étude montre que le domaine spectral où ressortent le plus nettement les modifications structurales correspond à la région de la bande AI. Des modifications plus fines des bandes AIII sont détectées, mais en partie masquées par la présence des bandes de vibration du tréhalose. On remarque également qu'en présence du glycérol, l'arrangement des feuillets β est préservé.

Les fines modifications spectrales révélées par les analyses multivariées (ACP et MCR-ALS) montrent la sensibilité de la spectroscopie Raman pour détecter de très

légers changements de conformation moléculaire. L'utilisation de ces méthodes d'analyse basées sur le traitement global d'un nombre de spectres important, est certainement un facteur qui amplifie cette sensibilité. Elle apporte également un caractère de fiabilité aux résultats qui peut être considéré supérieur à celui fourni par des méthodes traditionnelles d'ajustement de spectres qui ne peuvent être validées pour chaque spectre d'une cartographie en comportant plusieurs centaines. Il est cependant nécessaire de veiller à une interprétation correcte des résultats en prenant en compte un facteur prépondérant de ces analyses qui correspond à la représentativité d'une CP par rapport à la variance totale. Il convient effectivement, de moduler la prise en compte d'une CP par sa contribution à la variance totale, lors de l'évaluation d'une modification spectrale (représentée par cette CP) dans une région donnée de l'échantillon.

3.1.2. Analyse de l'influence du glycérol sur les propriétés bioprotectrices du saccharose.

Les formulations protéiques à base de tréhalose-glycérol ont fait l'objet de nombreuses études pour exacerber l'efficacité bioprotectrice du tréhalose en vue d'obtenir l'agent bioprotecteur le plus efficace possible. Cependant, il n'existe que peu d'études comparatives faites sur les effets bioprotecteurs de différents disaccharides pendant des procédures de lyophilisation. De ce fait aucune étude sur l'action du glycérol sur le saccharose n'est reportée dans la littérature à ce jour, dans la mesure où l'effet bioprotecteur du saccharose est considéré comme moindre par rapport à celui du tréhalose. Cette étude a été réalisée pour déterminer si l'effet du glycérol est systématique sur les disaccharides et également pour mieux comprendre le mécanisme par lequel le glycérol exacerbe les propriétés du tréhalose. Pour cela, les solutions protéiques lysozyme-saccharose et lysozyme-saccharose-glycérol contenant 5 % de glycérol, ont été lyophilisées simultanément avec les échantillons contenant du tréhalose. Des cartographies ont été collectées à la fin de la lyophilisation avec les mêmes conditions expérimentales que celles utiliser pour cartographier les échantillons contenant du tréhalose. Le pré-traitement des spectres a été le même que celui décrit précédemment pour l'analyse des échantillons à base de tréhalose. L'ensemble des spectres collectés pendant les cartographies a été traité par ACP et MCR-ALS. Considérant que les changements les plus importants ont été observés

dans la zone spectrale de la bande AI, toutes les analyses présentées dans cette partie ont été faites sur les spectres de cette région.

L'ACP réalisée sur deux cartographies différentes a montré que la variance correspondante à ces deux cartographies peut être prise en compte par la considération de deux CPs. Les spectres de ces deux contributions, calculés par MCR-ALS, sont représentés sur la figure 3.5a. Cette figure montre que la bande AI dans le spectre de la contribution 2 est décalée vers les hautes fréquences par rapport à celui de la contribution 1 d'environ 2 cm^{-1} . Comme précédemment expliqué, cet effet résulte

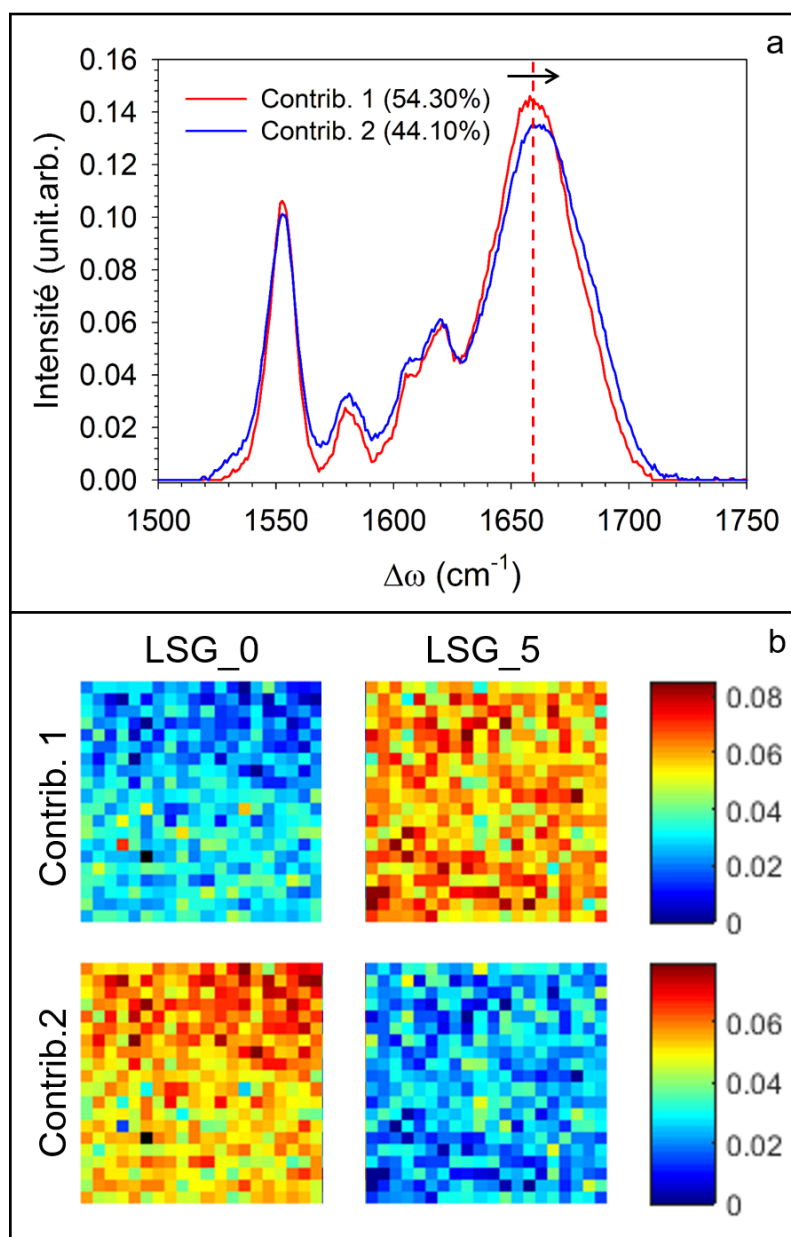


FIGURE 3.5 : (a) Les spectres des contributions pures avec (b) leurs cartes de concentrations associées obtenues à la fin d'une MCR-ALS réalisée sur deux échantillons (lysozyme-saccharose et lysozyme-saccharose-glycérol 5%).

de modifications de la structure secondaire de la protéine. Les images des concentrations de ces deux contributions, représentées sur la figure 3.5b indiquent que l'échantillon qui ne contient pas de glycérol est riche en contribution 2, tandis que l'échantillon qui en contient est riche en contribution 1. Cela montre clairement que l'addition de 5 % de glycérol améliore aussi de manière significative l'effet bioprotecteur du saccharose pendant une procédure de lyophilisation.

Il est intéressant de comparer les effets bioprotecteurs des deux disaccharides (tréhalose et saccharose) pendant une même procédure de lyophilisation, puis ceux des mélanges disaccharides-glycérol. Ces comparaisons sont faites sur la figure 3.6, où sont reportées les positions de la bande AI déterminées par la procédure d'ajustement décrite dans le chapitre 2 des spectres collectés dans les cartographies réalisées sur les échantillons lysozyme-saccharose et lysozyme-saccharose-glycérol d'une part et sur les échantillons lysozyme-tréhalose et lysozyme-tréhalose-glycérol d'autre part. La première information importante est que le saccharose est meilleur bioprotecteur que le tréhalose lorsqu'on utilise un disaccharide pur (sans ajout de glycérol) pour stabiliser la structure de la protéine pendant une procédure de lyophilisation. On remarque effectivement que la position de la bande AI dans l'échantillon LSG_0 est nettement plus basse que dans l'échantillon LTG_0, indiquant un degré de dénaturation moindre dans l'échantillon LSG_0. La seconde information est que l'ajout de 5 % de glycérol au disaccharide est plus efficace dans le cas du

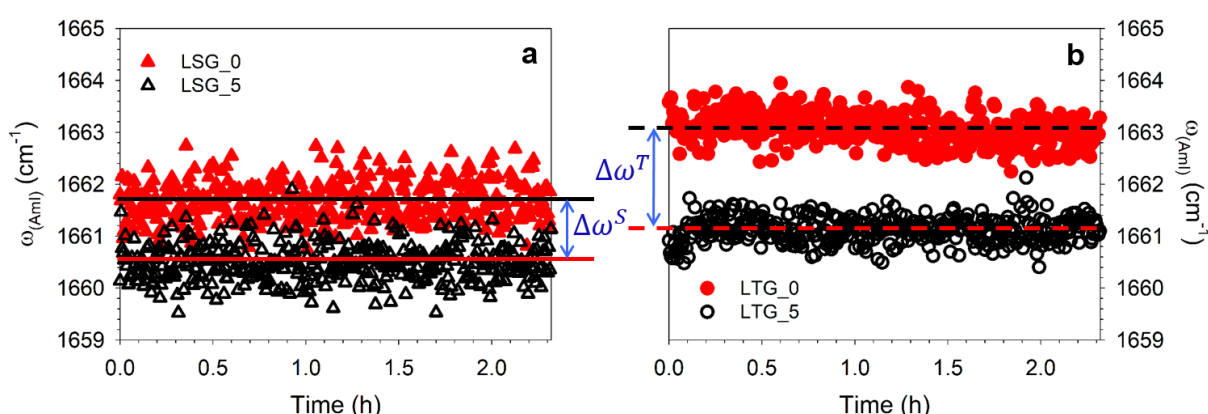


FIGURE 3.6 : Position de la bande AI déterminée à la fin du cycle de lyophilisation dans les mélanges (a) lysozyme/sucrose (▲), lysozyme/sucrose/glycérol (Δ) et (b) lysozyme/tréhalose (●) et lysozyme/tréhalose/glycérol (○). Les traits pleins représentent la position moyenne de la bande AI dans l'échantillons LSG_0 et LSG_5, tandis que les lignes en pointillé représente la position moyenne de la bande AI dans les échantillons LTG_0 et LTG_5. Les flèches représentent l'effet du glycérol sur l'action bioprotectrice du tréhalose ($\Delta\omega^T$) et saccharose ($\Delta\omega^S$).

tréhalose, dans la mesure où l'écart entre les positions de la bande AI dans les spectres collectés en absence et en présence de glycérol est clairement plus important dans le cas du tréhalose. La troisième information est que le mélange saccharose-glycérol (comprenant 5% de glycérol) est le meilleur agent bioprotecteur pendant une procédure de lyophilisation, même si l'écart avec le mélange tréhalose-glycérol est très faible.

3.1.3. Synthèse des analyses des lyophilisats par imagerie Raman.

Les analyses réalisées par imagerie Raman sur des échantillons lyophilisés dans un lyophilisateur de laboratoire ont permis de confirmer que l'action bioprotectrice du tréhalose était renforcée par l'ajout d'une faible quantité de glycérol et que la concentration de 5 % était la concentration optimale pour avoir un effet bioprotecteur maximum du tréhalose. Le principal effet bioprotecteur des mélanges tréhalose-glycérol est observé sur les structures en hélices. Pour les mélanges contenant 5 % de glycérol, les analyses ACP et MCR-ALS ont révélé que les structures en feuillets étaient préservées, ce qui pourrait avoir pour conséquence d'inhiber des phénomènes d'agrégation lors de la réhydratation du lyophilisat.

Il a été montré dans cette partie que malgré les propriétés bioprotectrices qui lui sont reconnues, le tréhalose n'est pas l'agent le plus efficace pour préserver la structure du lysozyme pendant une procédure de lyophilisation, même si l'écart entre les degrés de dénaturation des formulations LTG_5 et LSG_5 est très faible. Le fait que l'efficacité bioprotectrice du saccharose soit moins renforcée que celle du tréhalose par l'ajout de 5 % de glycérol pourra être utilisé pour comprendre le mécanisme d'action du glycérol sur les disaccharides.

3.2. Mécanismes de dénaturation et bioprotection du lysozyme, analysées *in-situ*, pendant un cycle de lyophilisation, par μ -spectroscopie Raman

Les résultats reportés dans la section 3.1, ont été obtenus suite à des analyses des cartographies obtenues à la fin du processus de lyophilisation. Evidemment, il est difficile de comprendre et d'expliquer le mécanisme par lequel l'ajout d'une petite quantité du glycérol améliore de manière significative l'efficacité bioprotectrice du tréhalose, sans connaître à quelle étape du processus de lyophilisation le glycérol a un effet maximal. Compte tenu des résultats issus des analyses de formulations contenant différentes concentrations de glycérol, cette étude a été focalisée sur la formulation de lysozyme dans laquelle le mélange tréhalose-glycérol est le plus efficace (5% en masse de glycérol par rapport au tréhalose). L'analyse *in-situ* d'un processus complet de lyophilisation peut fournir des informations importantes à ce sujet^{12,16,17}. Il s'agit d'une partie à la fois originale et cruciale de cette étude, car l'étude par micro-spectroscopie Raman qui permet de sonder les sources principales de dénaturation et de déterminer à quel étape l'excipient est plus efficace et par conséquent expliquer les mécanismes de stabilisation des protéines.

Les formulations, analysées *in-situ*, ont été préparées en dissolvant du tréhalose partiellement deutéré et du lysozyme dans de l'eau lourde. Le tréhalose partiellement deutéré a été obtenu par lyophilisation d'une solution de D₂O et d'environ 10 % en masse de tréhalose. Les mélanges lysozyme-tréhalose-D₂O ont été préparés en ajoutant 5% (en masse) de glycérol, par rapport à la masse du tréhalose. Les trois solutions ainsi préparées (lysozyme-D₂O, lysozyme-D₂O-tréhalose et lysozyme-D₂O-tréhalose-glycérol) ont été mélangées pendant une heure sur l'agitateur Eppendorf à la température ambiante et lyophilisées en micro-volumes (~ 600 μ L). Une chambre à pression et température contrôlées *Linkam FDCS 196* (*Linkam Scientific Instruments, Guildford, Surrey, UK*), nous a permis de mimer et de suivre en temps réel le processus de lyophilisation. Le cycle de lyophilisation, représenté sur la figure 3.7 a été imposé en grande partie par les propriétés liées à l'agent bioprotecteur (T_g') et à la durée des cartographies Raman. Les solutions ont été refroidies à une vitesse de 10°C/min, de la température ambiante (25°C) jusqu'à -45°C et maintenues à cette température pour l'enregistrement d'une cartographie Raman, environ 12h (Map 1 sur la figure 3.7). Le

séchage primaire a été réalisée à la même température en diminuant la pression à 2-5 μ bar. Les formulations ont été maintenues dans ces conditions pendant la cinétique de sublimation de la glace, c'est-à-dire environ 1h et pendant la réalisation d'une cartographie Raman, environ 12h (Map 2 sur la figure 3.7). Pour l'étape de séchage secondaire, la température de l'échantillon a été augmentée progressivement, à une vitesse de 0.2°C/min, de -45°C à 30°C. L'échantillon a été maintenu dans ces conditions pendant 2h, afin d'évaporer l'eau non-congelée. La troisième cartographie Raman (Map 3 sur la figure 3.7) a été collectée après avoir placé la formulation dans des conditions ambiantes (température d'échantillon T=25°C et P=1bar). Lors des changements de conditions (température et pression de chambre), la formulation a fait l'objet d'un suivi optique via le microscope couplé au spectromètre, afin de pouvoir analyser la même zone de la formulation à l'état solide, de l'état congelé (en présence de la glace) jusqu'à l'état sec (en fin de lyophilisation).

Chaque échantillon a été analysé *in-situ* à la fin de chaque étape de lyophilisation par cartographie Raman d'une zone 60x60 μm^2 . Les spectres ont été collectés en utilisant la technique de balayage classique, point par point, par pas de 1,5 μm . Pour cette étude, la longueur d'onde de l'excitatrice a été sélectionnée à $\lambda = 514.5 \text{ nm}$, ce qui nous permet d'analyser les zones spectrales situées dans le domaine

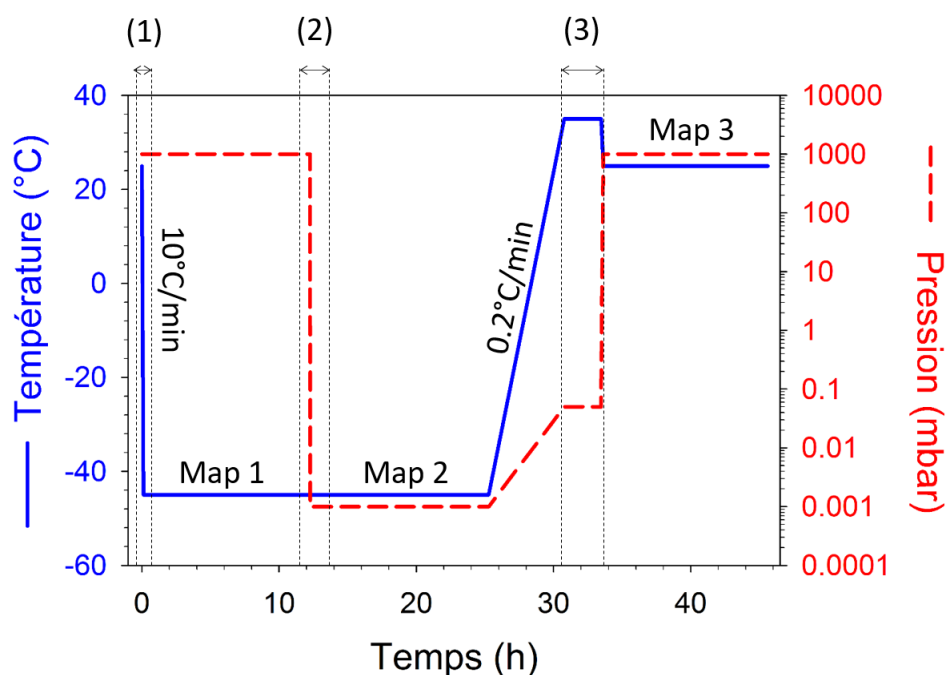


FIGURE 3.7 : Cycle typique de lyophilisation d'une formulation analysée. (1), (2) et (3) correspondent aux étapes de lyophilisation ; congélation, séchage primaire et secondaire, respectivement. Map 1, 2 et 3 correspondent aux temps d'acquisition d'une cartographie Raman après chaque étape de lyophilisation.

des hautes fréquences. Un objectif $\times 50$ à longue distance de travail, a été utilisé pour permettre la focalisation sur l'échantillon à travers la fenêtre optique de la cellule pression-température. Ces conditions expérimentales (objectif, longueur d'onde) imposent l'analyse d'environ $150 \mu\text{m}^3$ de l'échantillon. Le temps d'acquisition de chaque spectre correspond à 25 s. Pendant chaque cartographie, 1681 spectres ont été collectés pendant 12 h, sur une fenêtre fixe dans deux zones spectrales : 1200-1800 et 2000-2800 cm^{-1} représentées sur la figure 3.8.

La première zone analysée, 1200-1800 cm^{-1} (figure 3.8a), est composée principalement des bandes de lysozyme et du tréhalose, à l'exception de la déformation angulaire de D_2O détectée vers 1200 cm^{-1} . Cette zone a été sélectionnée car elle permet de déterminer la distribution des espèces dans la matrice solide, afin de mettre en évidence des interactions préférentielles et de les corrélérer avec les changements structuraux de la protéine analysées par le suivi de l'évolution de la bande AI. Le rapport des intensités intégrées des bandes caractéristiques du tréhalose et du lysozyme, I_T/I_L , décrit la distribution relative du sucre par rapport à la protéine.

La deuxième zone analysée, 2200-2800 cm^{-1} (figure 3.8b), est principalement composée des modes de vibrations d'étirement intramoléculaires des liaisons intramoléculaires O-D, provenant majoritairement de l'eau en volume avec une petite

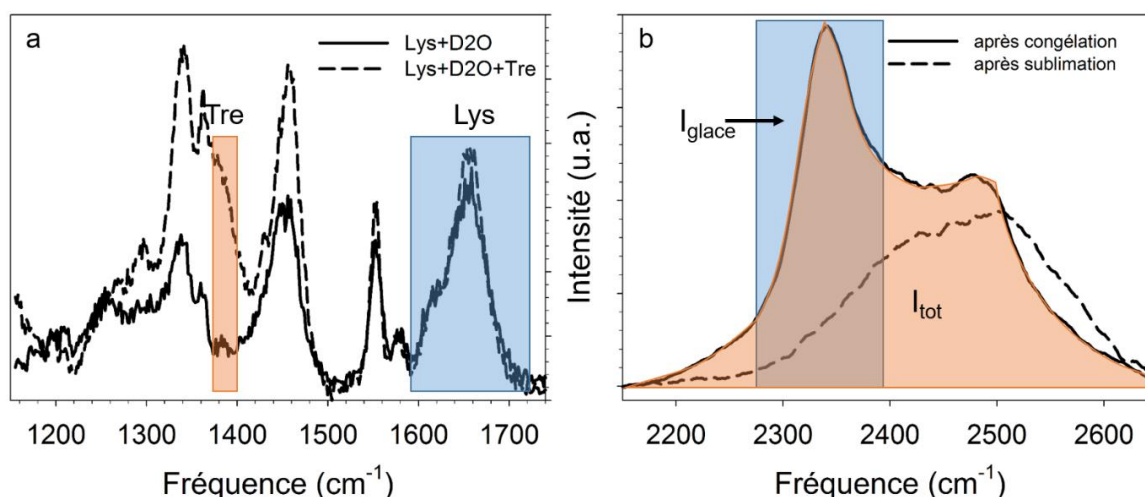


FIGURE 3.8 : Spectres Raman dans les zones spectrales analysées. (a) Spectres des formulations lysozyme/eau (trait plein) et lysozyme/eau/tréhalose (trait en pointillés) enregistré après la congélation dans la zone spectrale de l'empreinte moléculaire de la protéine. Tre et Lys représente les signatures Raman du tréhalose et lysozyme et ont été utilisées pour analyser la présence de ces espèces sur les images Raman. (b) Spectres enregistrés après congélation (trait plein) et sublimation de la glace (trait en pointillé) dans la zone des vibrations d'étirement des liaisons O-D. L'aire colorée I_{glace} correspond à la signature Raman de la glace, utilisée pour détecter la présence de la glace dans les zones analysées.

contribution issue de la protéine par échanges isotopiques (OH/OD) avec D₂O et également du tréhalose. Après la congélation d'une solution, la bande observée vers 2280-2400 cm⁻¹, très intense et très fine est la signature la plus marquante de la glace cristalline dans le spectre des vibrations d'étirement O-D. Cette bande est très sensible à la quantité de la glace dans le volume analysé et a été utilisée pour suivre la cinétique de sublimation de la glace. Elle est également utilisée pour sonder la présence de la glace dans la zone spatiale analysée. Le rapport entre l'intensité intégrée des bandes de la glace et celle du spectre entier des vibrations d'étirements O-D, $I_{\text{glace}}/I_{\text{tot}}$, représente la distribution relative de la glace par rapport aux autres espèces de la matrice solide.

Les valeurs ainsi obtenues, ont été utilisées pour construire l'image de la distribution des espèces chimiques, en gardant la position x et y de chaque spectre sur la zone spatiale analysée. L'intensité de chaque pixel de l'image obtenue, représente la concentration d'une espèce chimique par rapport à une autre dans le volume analysé (~ 150 µm³) en un point de la formulation. Ce résultat, fournit des informations importantes sur les interactions préférentielles entre les espèces chimiques dans la formulation, en rappelant qu'il est impossible de discriminer ces interactions au sein d'un volume de 150 µm³.

3.2.1. Distributions des espèces chimiques dans les matrices solides

Congélation

La première étape du processus de lyophilisation est la congélation. La figure 3.9 représente la distribution des espèces après la congélation d'une solution lysozyme - D₂O - tréhalose (LT). La figure 3.9a décrit la distribution de la glace dans la matrice congelée, tandis que la figure 3.9b montre la distribution relative du sucre par rapport à la protéine. Ces deux images Raman ont été obtenues en calculant le rapport des intensités intégrées, selon la méthode de calcul expliquée ci-dessus (figure 3.9). Les zones jaunes sur la figure 3.9a correspondent à des valeurs élevées $I_{\text{glace}}/I_{\text{tot}}$. Par conséquent, ces régions spatiales de l'échantillon contiennent plus de glace que du tréhalose et/ou protéine. En revanche, les zones bleues sont principalement constituées de protéine et tréhalose. La quantité de glace dans les zones jaunes est 1.5 à 2 fois plus importante que la quantité de tréhalose et/ou protéine, tandis que dans les zones bleues, la quantité de glace est 2 fois plus petite que la quantité des autres

deux espèces moléculaires présentes dans la formulation. Une comparaison des spectres représentatifs de ces deux zones (figure 3.9c) indique que l'intensité de la bande de la glace du spectre collecté dans les zones bleues est significativement inférieure à celle observée dans le spectre correspondant aux zones jaunes. Les deux images Raman (figure 3.9a et 3.9b), produites par traitement de deux régions spectrales différentes présentent les mêmes motifs. En comparant ces deux figures, on observe que les régions riches en glace sont systématiquement riches en protéines (les zones jaunes sur la figure 3.9a correspondent aux zones bleues sur la figure 3.9b). Cette répartition des trois espèces moléculaires (glace, protéine et tréhalose) suggère que le sucre est préférentiellement exclu de la surface de la protéine, avant la

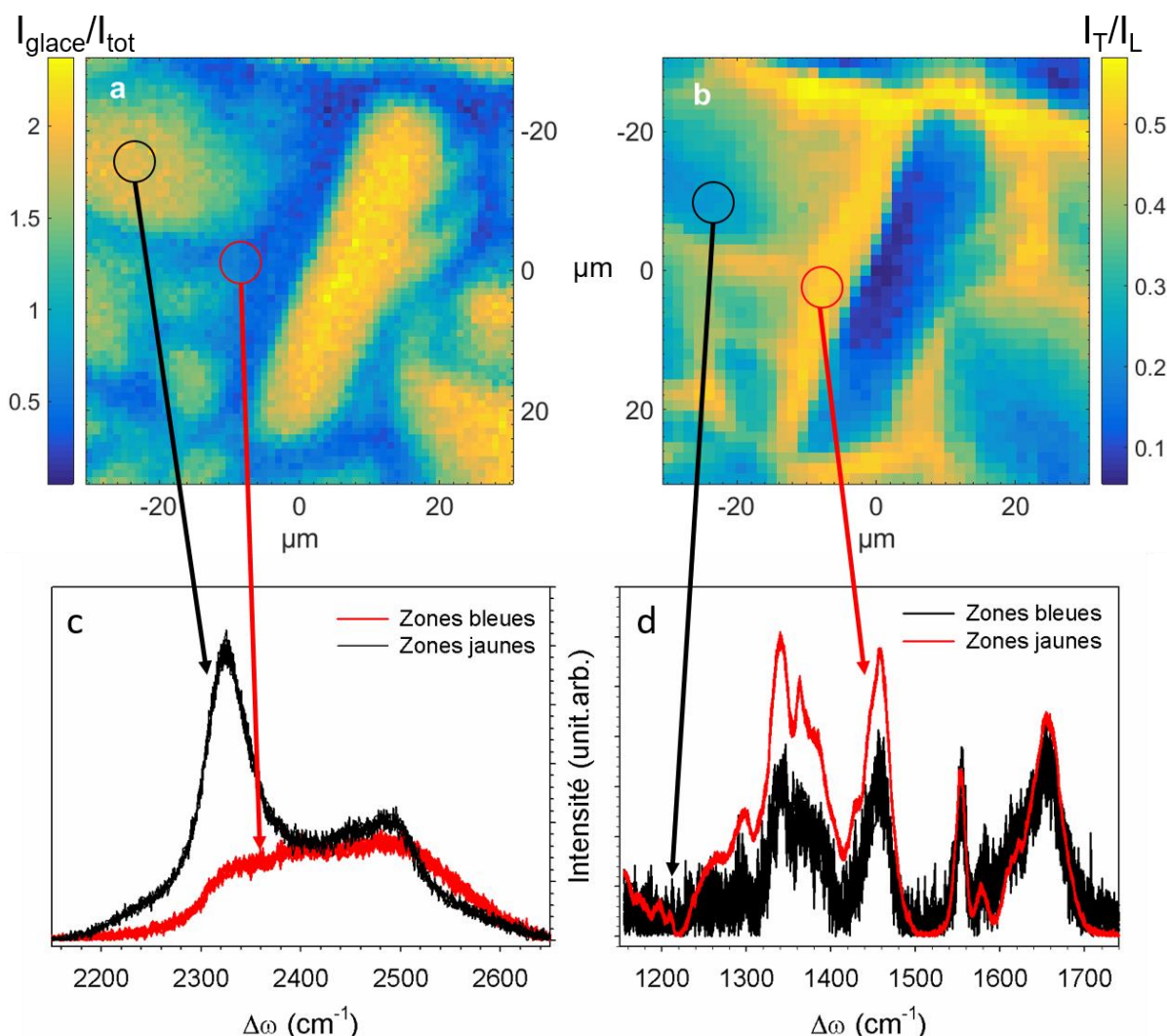


FIGURE 3.9 : *Panel d'images obtenues après l'étape de congélation de la solution Lys+D₂O+Treh.* (a) La distribution de la glace dans la zone analysée. (b) La distribution du tréhalose par rapport au lysozyme. (c) et (d) spectres distinctives des zones riches en glace (trait noir) et riche en sucre (trait rouge).

congélation, lorsque la formulation est à l'état liquide. Cette observation est en accord avec l'hypothèse d'hydratation préférentielle proposée par Timasheff¹⁸.

Dans l'échantillon LT, les espèces chimiques sont réparties de manière très hétérogène à l'échelle du micron, ce qui induit une séparation de phase (glace/eau non congelée) au niveau de la surface des protéines, en accord avec d'autres études¹⁹. Il a été suggéré²⁰⁻²², que, la surface de la protéine est exposée à deux états physiques différents de l'eau (cristallin et eau liquide non congelée), engendrant des interactions protéines – eau de différentes natures. Ce phénomène pourrait rompre l'équilibre fragile entre les interactions solvant et résidus de nature hydrophobe et hydrophile, considéré comme un précurseur des changements structuraux.

La figure 3.10a représente la répartition de la glace par rapport au tréhalose et à la protéine, après la congélation d'une solution Lys+Treh+Gly (LTG). En ajoutant une petite quantité du glycérol dans la formulation LT, des phénomènes importants peuvent être observés. Tout d'abord, la figure 3.10a montre que la distribution des cristaux de glace est beaucoup plus homogène qu'en absence du glycérol (figure 3.10a). Quantitativement, le rapport d'intensité varie de 0 à 2,5 en absence du glycérol (figure 3.10a) alors qu'il varie de 0,25 à 0,5 en présence du glycérol (figure 3.10a). Dans cet échantillon, 90% de la zone spatiale analysée est caractérisée par des valeurs du rapport $I_{\text{glace}}/I_{\text{tot}}$ compris entre 0.45 – 0.5, qui suggère une répartition plus homogène de la glace par rapport au tréhalose et/ou protéine. La quantité de glace est deux fois plus petite que la quantité de tréhalose et protéine et sa répartition est uniforme sur toute la zone analysée. Une quantité significative de glace reste dans les spectres collectés dans les régions bleues (figure 3.10c). On observe que la protéine et le sucre sont répartis de manière beaucoup plus homogène en présence du glycérol, les rapports d'intensité, représentés sur la figure 3.10b, varient dans ces deux échantillons (LT et LTG) de 0,25 à 0,6 et de 0,1 à 0,55, respectivement. Ces caractéristiques indiquent que l'addition d'une petite quantité de glycérol conduit à une répartition des espèces chimiques plus homogènes. La différence d'homogénéité entre les distributions des espèces chimiques d'un échantillon à un autre est retranscrite sur les spectres distinctifs des zones riches en glace et riches en tréhalose. En comparant deux à deux les figures 3.9c, 3.9d avec les figures 3.10c, 3.10d, on remarque effectivement des variations d'intensité moins marquées dans les régions spectrales analysées sur les figures 3.10c et 3.10d par rapport aux figures 3.9c et 3.9d.

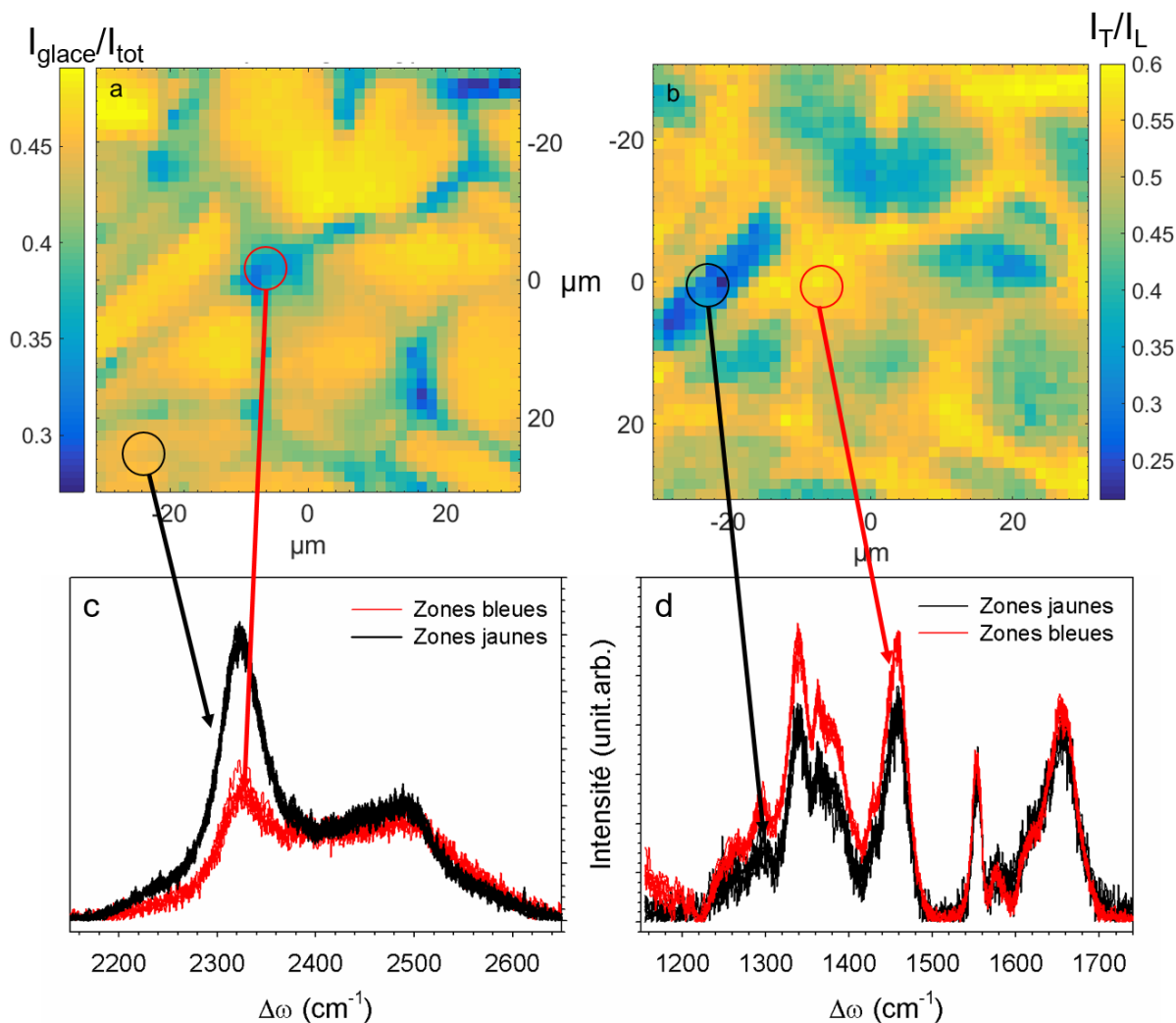


FIGURE 3.10 : *Panel d'images obtenues après l'étape de congélation de la solution Lys+D₂O+Treh+Gly (LTG). (a) La distribution de la glace dans la zone analysée. (b) La distribution du tréhalose par rapport au lysozyme. (c) et (d) spectres distinctives des zones riches en glace (trait noir) et riche en sucre (trait rouge).*

Séchage primaire

La deuxième étape de la lyophilisation est le séchage primaire et correspond à la sublimation de la glace. La cinétique de sublimation de la glace a été suivie *in-situ* par spectroscopie Raman en analysant la bande la plus fine du spectre des mouvements d'élongation des liaisons O - D vers 2320 cm⁻¹. Lorsque cette bande n'est plus détectée, la cinétique de sublimation est considérée terminée et la cartographie Raman de la même zone spatiale de l'échantillon est alors réalisée. A cette étape, seule la région spectrale à moyenne fréquence est analysée dans la mesure où il n'y a plus de glace au sein de la formulation.

La figure 3.11a représente la répartition topologique des rapports d'intensité (I_T/I_L), qui reflète la distribution du tréhalose par rapport au lysozyme dans la matrice solide de l'échantillon LT, après la sublimation de la glace. L'image obtenue après le séchage primaire (figure 3.11a) est assez similaire avec l'image obtenue après la congélation (figure 3.9b), avec toutefois de petites différences correspondant à une fissure apparue à la surface de l'échantillon sous l'action du vide primaire. Le contraste des couleurs plus atténué, indique que la répartition des espèces chimiques après la sublimation de la glace est plus homogène que celle observée après la congélation (figure 3.9b). De plus, la valeur minimum du rapport I_T/I_L sur la figure 3.11a est plus élevée que la valeur minimum du même rapport déterminée après la congélation (0.4 et 0.1 respectivement). Par conséquent, la sublimation de la glace induit un désordre dans la distribution des espèces chimiques, comme cela est observé lors de la déshydratation des formes cristallines hydratées²³. Par conséquent on peut conclure

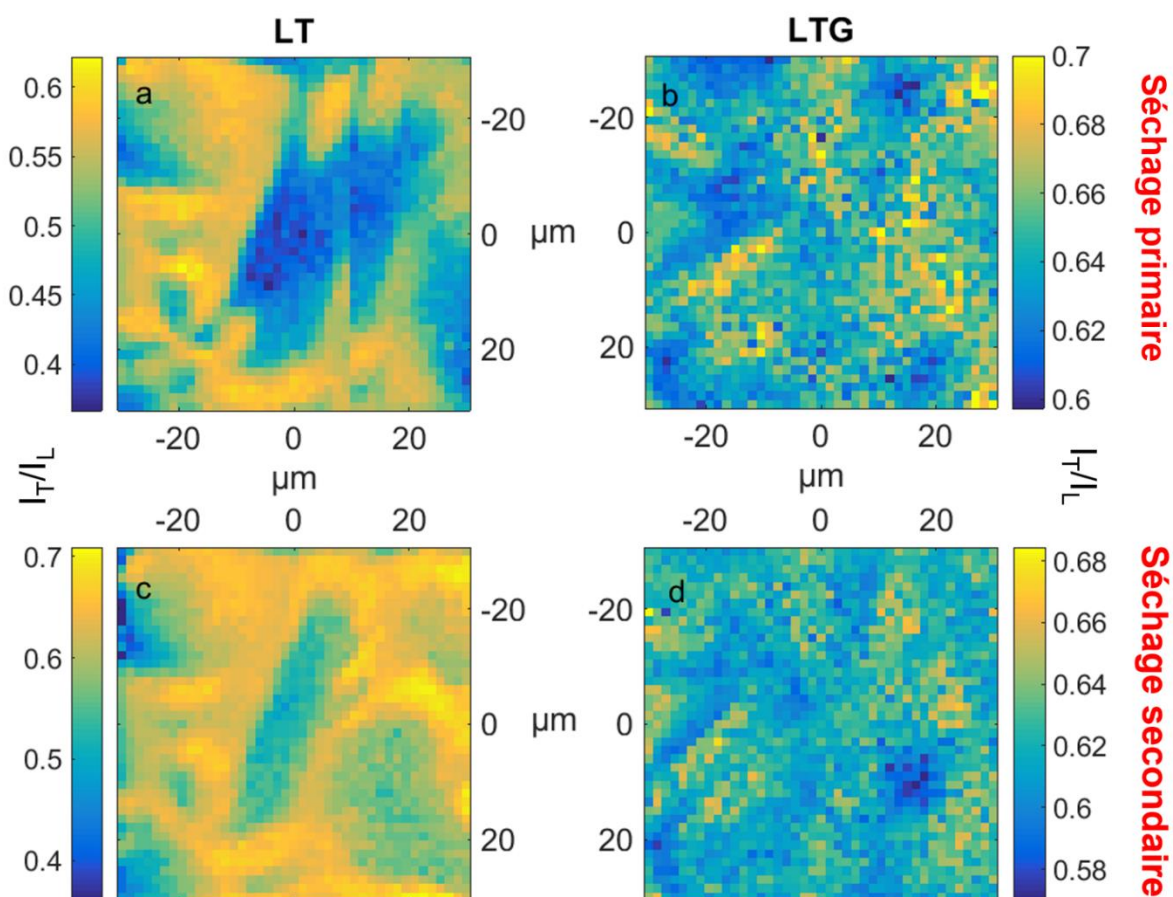


Figure 3.11 : Panel d'images Raman obtenues par calcul I_T/I_L sur des cartographies enregistrées après le séchage primaire (a, b) et secondaire (c, d), qui reflète la distribution relative du tréhalose par rapport au lysozyme dans la formulations LT (a, c) et LTG (b, d).

que le degré d'homogénéité de la distribution des espèces chimiques dans la matrice solide augmente après la sublimation de la glace.

Dans l'échantillon de LTG, la répartition relative du tréhalose par rapport au lysozyme était déjà beaucoup plus homogène après la congélation par rapport à l'échantillon de LT. La même tendance est observée après le séchage primaire (figure 3.11b) ; les molécules de protéine et de sucre sont réparties de manière plus homogène dans l'échantillon LTG que dans l'échantillon LT. Cette observation est confirmée par une similarité significative des valeurs I_T/I_L qui varient de 0.6 à 0.7 dans LTG (figure 3.11b) au lieu de 0.4 à 0.6 dans LT (figure 3.11a).

Séchage secondaire

Le séchage secondaire est la troisième et dernière étape du cycle de lyophilisation, correspondant à la désorption de l'eau non congelé par chauffage de l'échantillon, et en le maintenant à des températures relativement élevées (35 °C). Cette eau résiduelle en fin de séchage primaire est donc liée d'une part à la protéine, mais surtout à l'excipient (tréhalose ou tréhalose-glycérol) constituant ainsi la matrice vitreuse au sein de laquelle la protéine est imbriquée. Afin d'analyser la dégradation de la protéine, ainsi que l'action des excipients sur la stabilité de la protéine pendant cette étape de la lyophilisation, une cartographie a été réalisée en fin de lyophilisation, avec les mêmes conditions que les précédentes (conditions de balayage et temps d'acquisition sur la même zone de l'échantillon). La figure 3.11c décrit la distribution des espèces chimiques après l'étape de désorption de l'eau dans l'échantillon LT. Le tréhalose et la protéine sont répartis de manière beaucoup plus homogène à la fin du processus de lyophilisation, bien que les valeurs I_T/I_L soient assez similaires par rapport à celles obtenues après la sublimation de la glace (figure 3.11a). En présence de glycérol (échantillon LTG), la comparaison des figures 3.11b, 3.11d et 3.11a, 3.11c, montre que l'influence de la désorption de l'eau sur la distribution des espèces chimiques est moins marquée que dans l'échantillon LTG. Cela indique que le glycérol a un effet sur la distribution des espèces chimiques dans la formulation à l'état solide, dès l'étape de congélation, certainement inhérent aux interactions préférentielles qui se développent à l'état liquide.

Le degré d'hétérogénéité de la distribution des espèces chimiques dans la matrice, est plus facilement visualisable à partir d'une représentation en histogrammes de l'intensité des points, cette intensité étant proportionnelle à la population de

l'espèce chimique mesurée dans chaque spectre d'une cartographie. Les histogrammes représentés sur la figure 3.12 (a, b et c pour l'échantillon LT, d, e et f pour l'échantillon LTG) correspondent aux images Raman des figures 3.9, 3.10 et 3.11. Les distributions des valeurs ont été ajustées à l'aide d'une méthode statistique non-paramétrique appelée estimation par noyau (ou méthode Parzen-Rosenblatt). Chaque colonne est ajustée par une gaussienne, et les courbes tracées sur la figure 3.12 représentent une moyenne des gaussiennes.

Une comparaison des histogrammes obtenus dans l'échantillon LT (figure 3.12a, 3.12b et 3.12c) montre que pendant le processus de lyophilisation, le degré d'homogénéité de la distribution du tréhalose par rapport au lysozyme augmente progressivement d'une étape à l'autre, car la largeur des courbes représentatives des histogrammes diminue. En absence de glycérol, le passage de la congélation au séchage primaire correspond au passage d'une distribution très large à une distribution moins large et marquée par deux populations, ce qui est due à une diminution d'intensité centrée sur la valeur du rapport I_T/I_L égale à 0.45, au détriment de l'augmentation d'intensité de la distribution centrée autour de 0.55. Après le séchage secondaire, ce phénomène est amplifié avec un décalage vers les plus

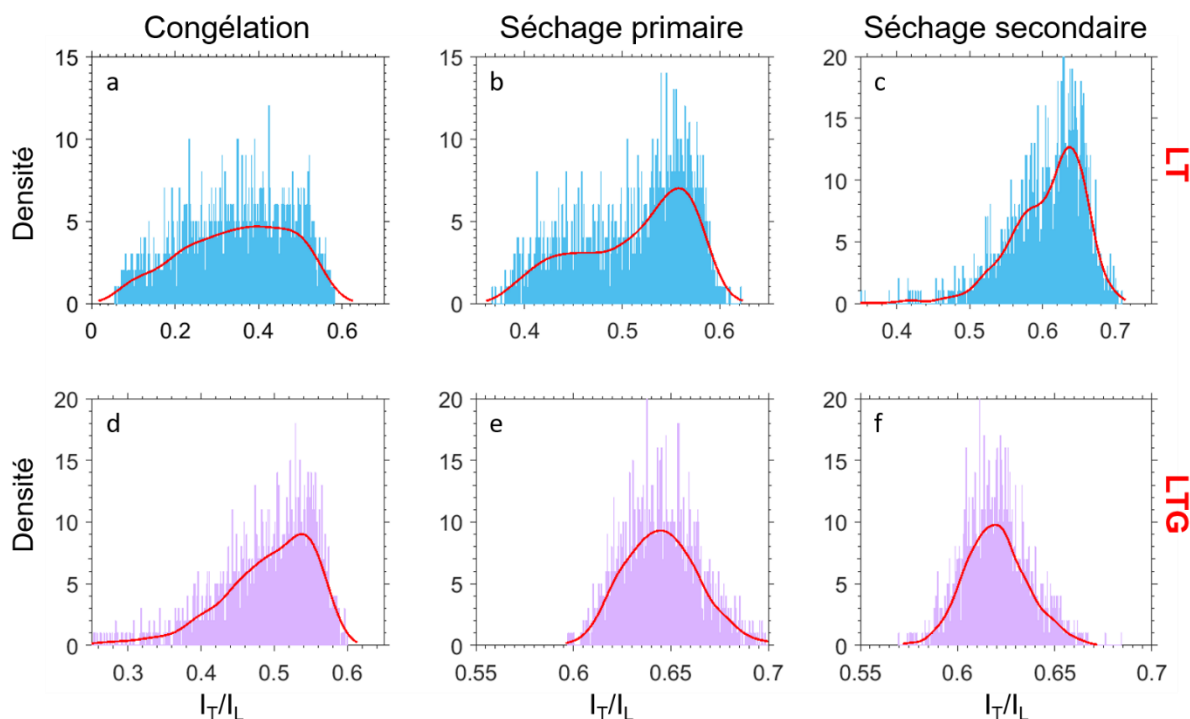


FIGURE 3.12 : Histogrammes représentant les distributions des valeurs du rapport I_T/I_L obtenues pour les échantillons LT (a, b, c) et LTG (d, e, f) après la congélation (a, b), séchage primaire (c, d) et séchage secondaire (e, f). Les traits rouges représentent l'ajustement des histogrammes de distributions des valeurs à une loi statistique en utilisant la méthode Parzen-Rosenblatt (estimation par noyau).

grandes valeurs de I_T/I_L . En présence de glycérol (figure 3.12d, 3.12e et 3.12f), on note une réduction substantielle de la largeur de la courbe de l'histogramme obtenu après congélation par rapport à celui obtenu en absence de glycérol (figure 3.12a). Après le séchage primaire, la courbe est moins large et quasiment symétrique, et continue de s'affiner après le second séchage.

3.2.2. Analyse de la zone spectrale de la bande AI

Congélation

Des cartographies ont été analysées plus particulièrement dans la région de la bande AI pour détecter des changements de conformation de la protéine. La fréquence de cette bande a été déterminée pour chaque spectre collecté durant les cartographies réalisées après chaque étape de lyophilisation dans trois échantillons (L, LT et LTG). Il est ainsi possible de sonder l'efficacité des excipients à chaque étape du processus de lyophilisation en comparant les résultats obtenus en présence d'excipients (échantillons LT et LTG) avec ceux obtenus sans excipient (échantillon L). Après congélation les positions de la bande AI dans les trois formulations sont présentées sur la figure 3.13. Elles sont tracées en fonction du temps, chaque position étant reportée à l'instant où le spectre a été collecté. On observe que les valeurs déterminées par la même procédure d'ajustement pour chaque formulation, s'insèrent dans un intervalle légèrement supérieur à 2 cm^{-1} , y compris pour la lysozyme- D_2O à l'état liquide. Ceci indique que la conformation des protéines n'est pas affectée par la

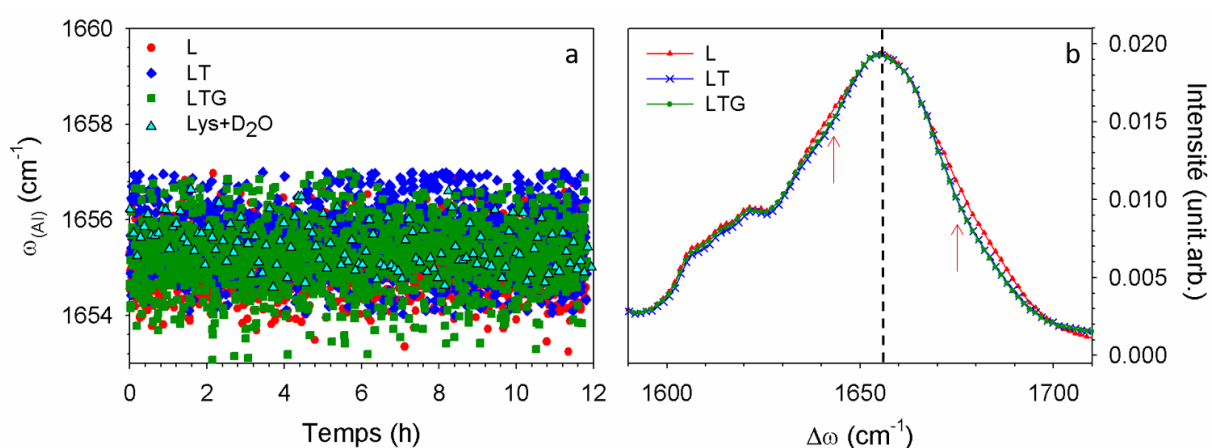


FIGURE 3.13 : Etude des changements de la bande AI après la congélation des formulations L, LT et LTG. (a) La position de la bande AI déterminée par fit dans toutes les formulations congelées comparée avec la position de la bande AI dans la solution de lysozyme seule non congelée. (b) Comparaison de la forme de la bande AI d'un spectre enregistré après congélation de L, LT et LTG et la solution de lysozyme seule avant la congélation.

formation des cristaux de glace ni par les basses températures (dénaturation froide), bien que la protéine soit exposée à ces formes de stress²⁴. Cependant, la figure 3.13b montre que les spectres collectés en présence d'agents bioprotectants (échantillons LT et LTG) et ceux collectés dans l'échantillon contenant du lysozyme seul ne se superposent pas rigoureusement. Effectivement, les spectres de la bande AI de la collectés dans l'échantillon sans excipients sont systématiquement plus larges que ceux collectés dans les échantillons LT et LTG (figure 3.13b). Les spectres collectés dans les échantillons LT et LTG (après la congélation) se superposent avec ceux enregistrés dans la solution de lysozyme à l'état liquide avant la congélation. Cette observation est en accord avec les résultats antérieurs obtenues par Belton et Gil,²⁵ en utilisant la spectroscopie infrarouge. Ils ont interprété cet effet en considérant que le tréhalose a pour effet de concentrer une couche d'eau à la surface de la protéine (confinement de l'eau d'hydratation), induisant ainsi un environnement au voisinage de la surface de la protéine, identique dans les états liquide et congelé. Ce n'est plus le cas lorsque le lysozyme est congelé seul, car la couche d'eau d'hydratation n'est plus préservée par le disaccharide et des cristaux de glace peuvent interagir avec la surface de la protéine.

Séchage primaire

Afin de pouvoir caractériser les changements de la structure secondaire de la protéine après la sublimation de la glace, la position de la bande AI a été déterminée pour les trois formulations analysées (L, LT et LTG) et représentée sur la figure 3.14a. Etant donné le nombre de spectres collectés par cartographie (1681 spectres), correspondant au même nombre de positions de la bande AI déterminées par ajustement des spectres, chaque point représenté sur la figure 3.14a est une moyenne de 41 valeurs consécutives, dans une cartographie de 41x41 points. Cette figure met en évidence un glissement de la fréquence de la bande AI, accompagné d'un élargissement de la bande, systématiquement observés dans chaque formulation. Ce résultat est en accord avec de précédentes études¹³. On remarque que ces effets sont amplifiés en absent d'agents bioprotecteurs. Ces modifications spectrales de la bande AI ont été interprétées comme résultant d'une déformation de la structure secondaire induite par la sublimation de la glace au voisinage de la surface de la protéine.

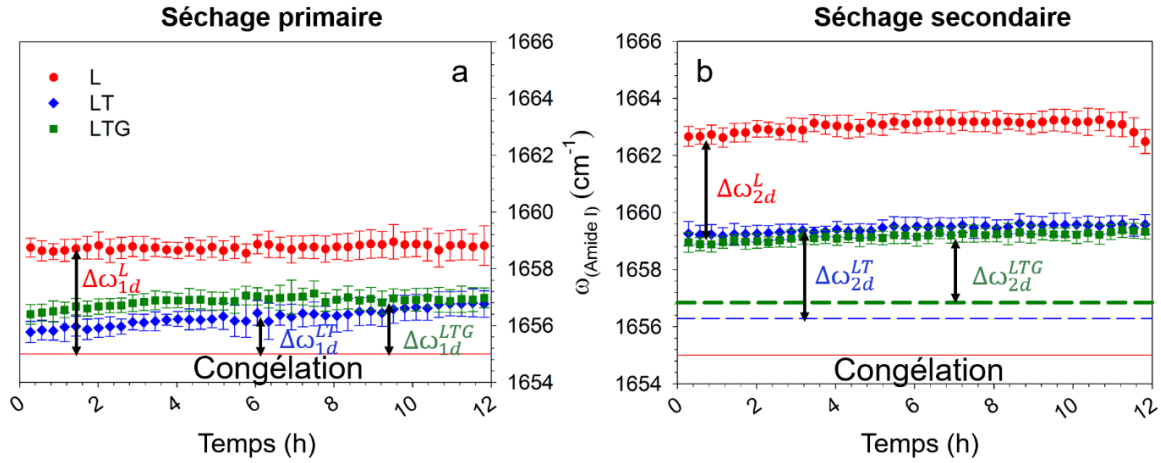


FIGURE 3.14 : La fréquence de la bande AI déterminée après le séchage primaire (a) et secondaire (b) dans les échantillons L (●), LT (◆) et LTG (■). Le trait rouge indique la position de la bande après la congélation, considérée comme l'état natif de la protéine, vue qu'aucune dénaturation à basse température n'a pas été observée. Les traits bleue et verte sur la figure (b) représentent la position de la bande AI après le séchage primaire dans LT et LTG, respectivement.

En présence de tréhalose seul (échantillon LT), le glissement de la bande AI est significativement plus petit, ce qui reflète un degré de dénaturation de la structure secondaire inférieur à celui observé dans la formulation sans excipient. L'ajout d'une petite quantité de glycérol au tréhalose (formulation LTG) a pour effet d'augmenter le glissement de fréquence déterminé en absence de glycérol (formulation LT). Ceci indique, de manière surprenante, que l'effet bioprotecteur du tréhalose est réduit en présence de glycérol, pendant la cinétique de sublimation.

Une quantification du degré de dénaturation de la structure secondaire du lysozyme après le séchage primaire et secondaire peut être obtenue en considérant qu'il est proportionnel à l'écart de fréquence de la bande AI entre l'état dénaturé par séchage et l'état congelé, considéré comme non dénaturé. Les écarts entre les moyennes des positions de la bande AI dans l'échantillon S après le premier ($\Delta\omega_{1d}^S$) et le deuxième séchage ($\Delta\omega_{2d}^S$) sont déterminés à partir des relations 3.1 et 3.2 :

$$\Delta\omega_{1d}^S = \omega_{1d}^S - \omega_f^S \quad (3.1)$$

$$\Delta\omega_{2d}^S = \omega_{2d}^S - \omega_{1d}^S \quad (3.2)$$

où ω_f^S , ω_{1d}^S et $\Delta\omega_{2d}^S$ correspondent aux valeurs moyennes de la position de la bande AI dans l'échantillon S (L, LT et LTG) après la congélation ($f \equiv \text{freezing}$), le séchage primaire ($1d \equiv 1^{\text{st}} \text{ drying}$) et secondaire ($2d \equiv 2^{\text{nd}} \text{ drying}$), respectivement. On peut également déterminer l'efficacité bioprotectrice des excipients en comparant les variations de positions de la bande AI déterminés en absence et en présence de

bioprotectants, à chaque étape de séchage. L'efficacité de l'agent bioprotecteur présent dans l'échantillon (S) pendant la première (1d) et la seconde (2d) étape de séchage sera représentée par les valeurs données par 3.3 et 3.4.

$$\Delta(\Delta\omega_{1d}^S) = \Delta\omega_{1d}^L - \Delta\omega_{1d}^S \quad (3.3)$$

$$\Delta(\Delta\omega_{2d}^S) = \Delta\omega_{2d}^L - \Delta\omega_{2d}^S \quad (3.4)$$

où S correspond à la formulation LT ou LTG et L correspond à la formulation sans agent bioprotecteur. Plus les valeurs données par 3.3 et 3.4 seront importantes plus l'efficacité du bioprotecteur sera importante pendant le premier ou le second séchage. Les valeurs numériques ainsi obtenues sont représentés dans le tableau 3.2. Ce tableau apporte deux informations importantes sur la stabilité de la structure secondaire de la protéine pendant l'étape de séchage primaire d'un cycle de lyophilisation. La première information qui peut être considérée comme attendue est la forte dégradation de la structure de protéine en absence d'excipient ($\Delta\omega_{1d}^L$ est 3 fois plus élevé que $\Delta\omega_{1d}^{LT}$ et $\Delta\omega_{1d}^{LTG}$). La seconde information, est que l'ajout de 5% de glycérol réduit l'efficacité du tréhalose pendant le séchage primaire, le degré de dénaturation du lysozyme étant légèrement plus faible dans l'échantillon LT que LTG (0,9 pour LT comparé à 1,5 pour LTG).

TABLEAU 3.2 : Les valeurs moyennes de la position et de glissement de la fréquence de la bande AI après chaque étape de la lyophilisation dans les formulations L, LT et LTG

	L	LT	LTG
ω_f^S (cm ⁻¹)	1655.1	1655.4	1655.4
ω_{1d}^S (cm ⁻¹)	1658.8	1656.3	1656.8
ω_{2d}^S (cm ⁻¹)	1663.0	1659.4	1659.2
Degré de dénaturation de la structure secondaire de la protéine			
$\Delta\omega_{1d}^S = \omega_{1d}^S - \omega_f^S$	3.7	0.9	1.5
$\Delta\omega_{2d}^S = \omega_{2d}^S - \omega_{1d}^S$	4.8	3.1	2.3
L'efficacité bioprotectrice des excipients			
$\Delta(\Delta\omega_{1d}^S) = \Delta\omega_{1d}^L - \Delta\omega_{1d}^S$	-	2.7	2.2
$\Delta(\Delta\omega_{2d}^S) = \Delta\omega_{2d}^L - \Delta\omega_{2d}^S$	-	1.1	2.0

Une estimation quantitative du degré de dénaturation de la structure secondaire des protéines peut être obtenue en calculant le coefficient r , qui prend en compte à la fois la variation de position de la bande AI, mais aussi de profil global de la bande. Il ne s'agit plus d'une méthode d'ajustement d'une fonction sur un ensemble de points,

ce qui peut conduire à certaines aberrations non contrôlables sur un ensemble de plus d'un millier de spectres. Il s'agit d'une méthode comparative de spectres utilisant uniquement des intensités intégrées. Ce coefficient a été calculé pour chaque spectre d'une cartographie et la répartition des valeurs représentées sur la figure 3.15, donne une image de la distribution du degré de dénaturation de la protéine. Les zones jaunes correspondent à un faible degré de dénaturation de la protéine, tandis que les régions bleues reflètent une forte déformation structurale.

Les figures 3.15a, 3.15b et 3.15c montrent la distribution des valeurs de r dans les formulations L, LT et LTG, respectivement, après la sublimation de la glace. En absence d'excipients, la structure secondaire de la protéine est plus affectée, puisque le coefficient r dans l'échantillon L varie de 0,89 à 0,97 comparativement à 0,96 à 1 dans les échantillons LT et LTG. La présence du tréhalose dans la formulation, augmente la stabilité du lysozyme pendant la sublimation de la glace. Ces observations sont en accord avec les résultats de décalage en fréquence de la bande AI, représentés sur la figure 3.14a. Une comparaison de la figure 3.15b et de la figure

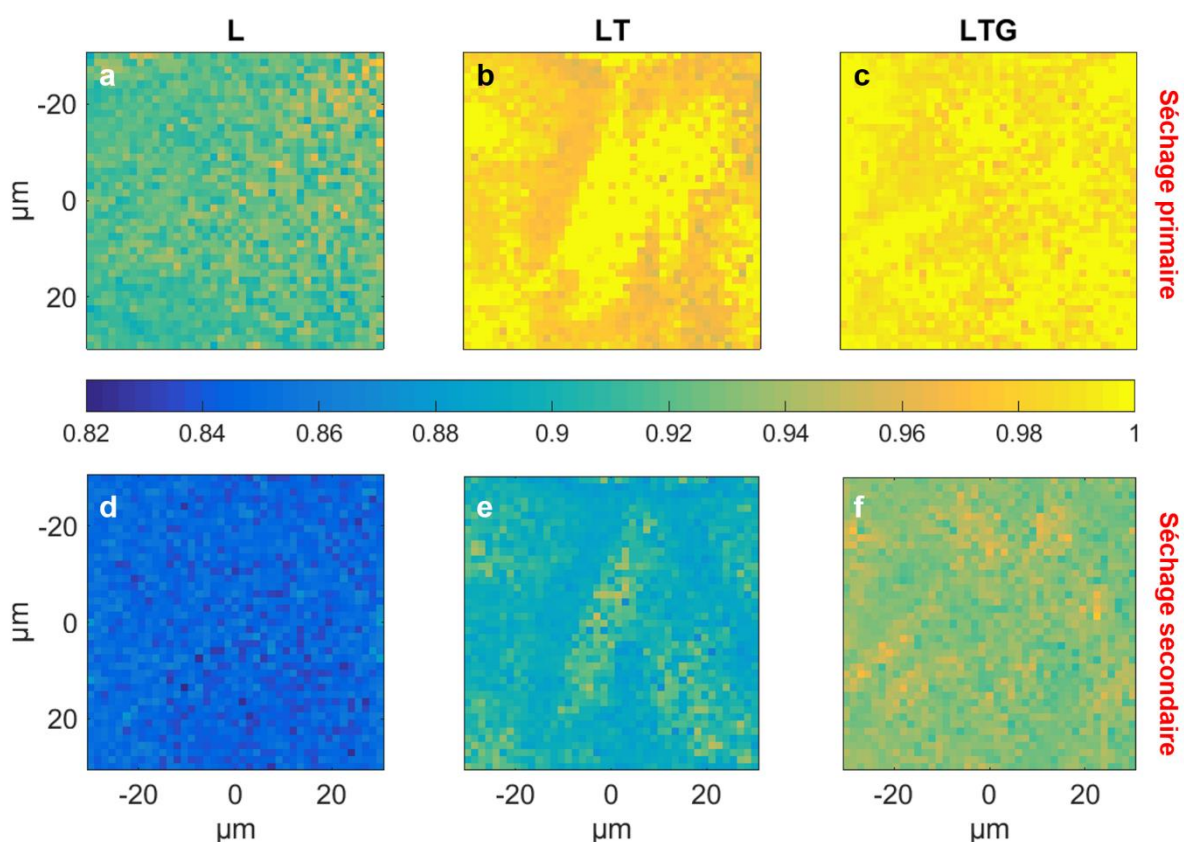


FIGURE 3.15 : Panel d'images Raman correspondant à la répartition des valeurs de r calculées selon l'Eq.1 pour L (a, d), LT (b, e) et LTG (c, f) qui reflète la distribution du degré de dénaturation de la protéine après le séchage primaire (a, b, c) et secondaire (d, e, f) de ces trois formulations.

3.11a indique que la structure secondaire du lysozyme est beaucoup plus dénaturée dans les régions riches en tréhalose. Cette observation indique une corrélation entre l'agrégation du tréhalose et un degré de dénaturation plus élevé de la protéine, qui suggère que l'agrégation du sucre diminue son action bioprotectrice. Dans ce contexte, l'action du glycérol sur l'efficacité du tréhalose pourrait être liée à cet effet d'homogénéiser la distribution des espèces chimiques, décrit précédemment. La répartition du coefficient r dans l'échantillon contenant du glycérol, représentée sur la figure 3.15c, montre clairement une dénaturation homogène du lysozyme. Il est important de mentionner donc que la distribution des espèces chimiques dans la matrice solide est fortement liée à la dénaturation des protéines, sans cependant montrer que l'homogénéité des distributions des espèces soit rigoureusement prédictive de forte stabilité de la protéine (cf. étape 2 de lyophilisation).

Séchage secondaire

La figure 3.14b montre que le glissement de fréquence induit par la sublimation de la glace augmente pendant le séchage secondaire dans tous les échantillons. De plus, toutes les valeurs de $\Delta\omega_{2d}^S$ dans les échantillons L, LT et LTG sont supérieures aux valeurs de $\Delta\omega_{1d}^S$ ce qui indique que la structure de la protéine est significativement plus affectée par la désorption de l'eau que par la sublimation de la glace. Il est remarquable que le degré de dénaturation de la protéine est beaucoup plus important en absence d'excipients (échantillon L). De manière plus fine on observe que :

- le décalage en fréquence de la bande AI est plus élevé dans l'échantillon sans excipients comparé aux deux autres qui en contiennent (figure 3.14b)
- $\Delta\omega_{2d}^L$ est plus important que $\Delta\omega_{2d}^{LT}$ et $\Delta\omega_{2d}^{LTG}$ (tableau 3.2)
- les valeurs du coefficient r dans l'échantillon sans excipients (figure 3.15d) sont significativement plus petites que dans l'échantillon de LT et LTG (figure 3.15e et 3.15f respectivement).

En présence de tréhalose seul, le glissement de fréquence de la bande AI est plus faible que dans l'échantillon sans excipient. Cependant, en comparant les valeurs $\Delta(\Delta\omega_{2d}^{LT})$ et $\Delta(\Delta\omega_{1d}^{LT})$, on remarque que l'activité bioprotectrice du tréhalose est maximale pendant le séchage primaire. L'ajout du glycérol dans la formulation (LTG) permet de réduire encore de décalage en fréquence de la bande AI, par rapport à celui observé dans LT. Les valeurs du coefficient r (figure 3.15e et 3.15f), calculées à partir

des spectres enregistrés après le séchage secondaire des échantillons LT et LTG, respectivement, confirment les résultats précédents avec une valeur plus petite de r , reflétant un degré élevé de dénaturation des protéines, dans l'échantillon LT (figure 3.15e) par rapport à celui de la formulation LTG (figure 3.15f).

3.2.3. Analyse de la bande AIII-f

La figure 3.2 montre que la bande AI permet d'analyser la conformation de la protéine sans aucune pollution du spectre par des contributions liées aux vibrations internes des molécules d'eau, de tréhalose et, à un degré moindre de glycérol (vu sa faible concentration). La figure 3.14a représente les moyennes des spectres collectés lors des cartographies réalisées après la congélation des échantillons L, LT et LTG. On peut remarquer, sur la figure 3.14a, que les spectres de la bande AI des échantillons contenant un agent bio-protecteur (LT et LTG) ou non (L) sont quasiment superposés. Ceci montre qu'il n'y a pas de déformation significative de la structure secondaire de la protéine à l'état congelé, avec ou sans bio-protecteur. A plus basse fréquence, dans la région des bandes amide III, Des modifications spectrales de la bande AIII-f, vers 1240 cm^{-1} (zone spectrale encadrée sur la figure 3.14a), sont clairement observées dans l'échantillon sans bio-protecteur (L) par rapport aux deux autres (LT, LTG). On détecte clairement dans l'échantillon sans bio-protecteur (L), un glissement de la bande AIII-f vers les basses fréquences, accompagné d'un élargissement, par rapport aux deux autres échantillons malgré la présence d'une bande ($\sim 1300\text{ cm}^{-1}$) attribuée aux vibrations internes du tréhalose.

La bande AIII-f correspondant à des vibrations décrites dans le chapitre 2 à l'intérieur des feuillets β , les modifications spectrales observées sont dues à la formation des nouvelles LHs entre les feuillets β , plus fortes que celles existantes à l'état natif^{26,27}. La formation de ces nouvelles LHs est certainement induite par la cristallisation de la glace qui a pour effet de créer des zones à forte concentration de protéine. Ces LHs relativement fortes pourraient donc engendrer des phénomènes d'agrégation à la réhydratation, si elles subsistent dans les étapes suivantes du cycle de lyophilisation²⁸. Il est donc important d'examiner les mêmes spectres, mais collectés en fin de lyophilisation, pour déterminer si cette différence observée entre les échantillons contenant ou pas d'agents bio-protecteurs subsiste. Ces spectres présentés sur la figure 3.14b, montrent que les modifications spectrales observées

dans la région de la bande AIII-f dans l'échantillon (L) par rapport aux échantillons (LT) et (LTG) sont toujours présentes et même amplifiées après le séchage secondaire. On remarquera bien sûr, sur la même figure, que le spectre de la bande AI est très déformé dans l'échantillon (L) par rapport aux deux autres contenant un agent bio-protecteur.

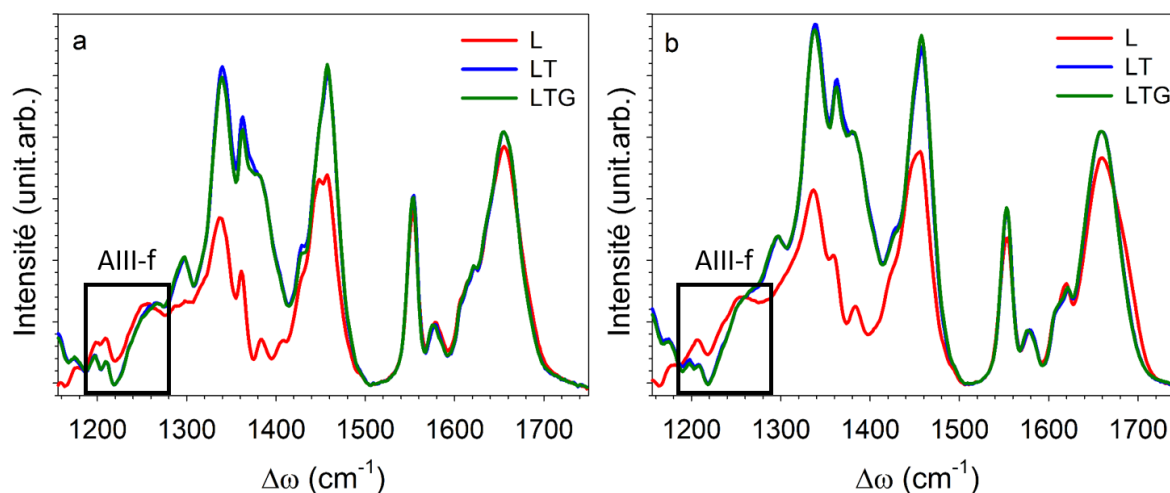


FIGURE 3.16 : Moyennes des spectres collectés lors des cartographies réalisées après la congélation (a) et à la fin de la lyophilisation (b), dans les formulations lysozyme- D_2O (L, trait rouge), lysozyme - tréhalose- D_2O (LT, trait bleue) et lysozyme-tréhalose-glycérol- D_2O (LTG, trait vert). La zone sélectionnée par le cadre noir correspond à la région des bandes AIII dans les structures en feuillets β (AIII-f).

Ceci montre que les agents bio-protecteurs ont une action importante, dès l'étape de congélation, même si la structure des protéines n'est pas déformée en absence de bio-protecteurs. Ceci montre aussi que l'étape de congélation est importante à la fois au niveau du mode opératoire, mais aussi au niveau de la protéine, bien qu'il n'y ait pas de changement conformationnel significatif à cette étape.

3.2.4. Analyses thermogravimétrique

Le degré d'humidité résiduelle a été analysé par ATG après le cycle de lyophilisation sur les formulations L, LT et LTG. Cette technique mesure le poids de l'échantillon lors d'une procédure de chauffage. La dépendance en température du poids de l'échantillon est tracée sur la figure 3.17 pour les trois échantillons lyophilisés. On observe que le lyophilisat contenant du glycérol contient le plus faible degré d'humidité résiduelle ($\sim 5\%$), et l'allure de la courbe représentant la variation de sa masse se différencie nettement de celle des deux autres échantillons. Le lyophilisat de lysozyme (L) contient le plus fort degré d'humidité résiduelle, mais l'allure de la variation de masse de l'échantillon est similaire à celle correspondant à l'échantillon

(LT). On notera donc, que malgré le faible degré d'humidité résiduelle dans l'échantillon LTG, la protéine est moins dégradée que dans les autres échantillons. L'allure atypique de la courbe de variation de masse peut être expliquée par une plus grande difficulté à évaporer une petite quantité d'eau. Cependant il n'y a pas de différence marquante entre les échantillons L et LT. La variation de masse dans LTG pourrait donc résulter d'une diffusion plus réduite de l'eau au sein d'une matrice plus rigide.

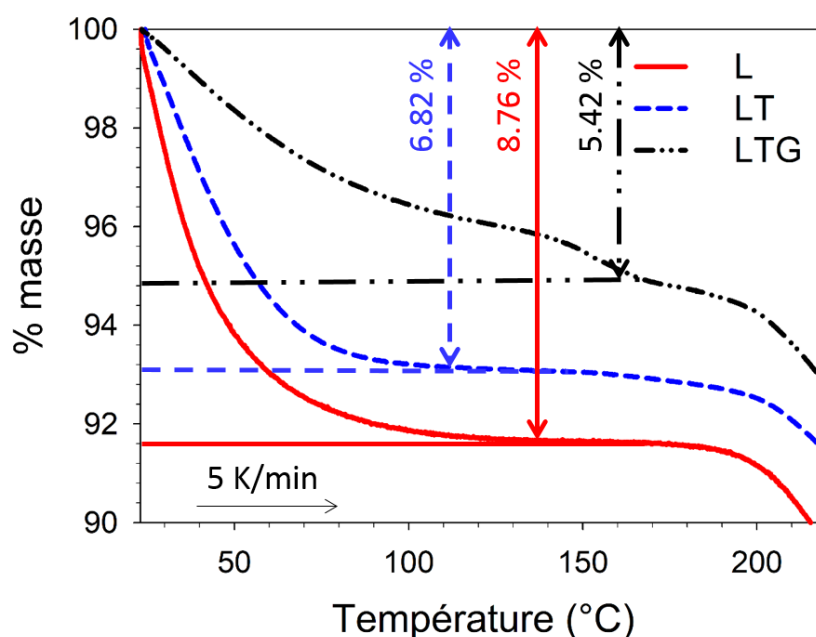


FIGURE 3.17 : Courbe d'ATG mesurant les pertes de masses de trois échantillons ; L (trait rouge), LT (trait bleue) et LTG (trait noire) au cours d'un chauffage à 5 K/min, à la fin d'une procédure de lyophilisation.

3.2.5. Synthèse des résultats

Les résultats obtenus dans cette partie de l'étude permettent d'obtenir des informations sur les mécanismes de dégradation et de stabilisation des protéines par les disaccharides, lors d'une procédure de lyophilisation. Il a été montré qu'en absence d'excipient, la protéine se dégrade pendant les deux étapes de séchage et que le degré de dénaturation de la protéine est similaire après la première et deuxième étape de séchage. Le tableau 3.2 ainsi que les figures 3.14 et 3.15 montrent que l'effet bioprotecteur principal du tréhalose est détecté pendant le séchage primaire, à basse température (-45 °C), lorsque le mélange tréhalose – eau (non congelée) forme une matrice vitreuse hôte très rigide, dans laquelle la protéine est imbriquée. Celle-ci est

de ce fait dans un état figé, difficilement déformable. L'imagerie Raman indique clairement une efficacité bioprotectrice plus faible dans les régions riches en tréhalose, dans l'échantillon LT, ce qui suggère que l'agrégation de tréhalose semble réduire son action bioprotectrice. A l'échelle de nos analyses, l'effet bioprotecteur, qui semble émergé, serait donc lié aux propriétés physiques de la matrice hôte engendrée par la vitrification du mélange tréhalose – eau (non congelée). Cependant, il est nécessaire de prendre en considération que certaines caractéristiques de la formulation à l'état solide, telle que la distribution des espèces chimiques, sont certainement inhérentes aux interactions préférentielles entre protéine et solvant à l'état liquide, dans la mesure où les images Raman déterminées pendant les différentes étapes de la lyophilisation présentent les mêmes motifs plus ou moins contrastés suivant l'étape de lyophilisation.

Concernant l'influence du glycérol sur l'action bioprotectrice du tréhalose, il a été montré que l'addition de glycérol réduit l'effet bioprotecteur du tréhalose pendant la sublimation de la glace, alors qu'il l'améliore significativement pendant le séchage secondaire. Le premier effet peut être interprété comme un effet plastifiant sur la matrice vitreuse hôte dans la mesure où la faible valeur de T_g ($-85\text{ }^{\circ}\text{C}$) a pour effet d'abaisser celle du mélange tréhalose-eau ($T_g \sim -30\text{ }^{\circ}\text{C}$).^{6,8} Le glycérol agirait donc comme un agent plastifiant sur la matrice vitreuse hôte dans laquelle la protéine est imbriquée, en accord avec de récentes études de diffusion neutronique⁶. Ceci pourrait expliquer la réduction de l'efficacité bioprotectrice durant le séchage primaire. L'action prépondérante du glycérol sur les propriétés du tréhalose peut être interprétée à partir d'études de simulation de dynamique moléculaire. Il a été montré que le glycérol a une grande capacité à former des liaisons H (fortes et de durée de vie exacerbée) avec les groupements hydroxyle du tréhalose²⁹. Cette propriété du glycérol est probablement favorisée pendant l'évaporation de l'eau, impliquant la rupture de liaisons H entre l'eau et le glycérol et entre l'eau et le tréhalose, et induisant donc la formation des liaisons H glycérol-tréhalose plus fortes. L'état sec est alors caractérisé par un nouveau réseau de liaisons H, plus robuste qu'en absence de glycérol donnant ainsi des propriétés matrice amorphe hôte plus rigides²⁹. Ces propriétés de rigidité peuvent être corrélées avec la suppression de la dynamique rapide du tréhalose, déterminée à partir d'analyses de la matrice binaire tréhalose - glycérol⁶.

Il a été mis en évidence qu'ajouter une faible quantité de glycérol à la formulation lysozyme-tréhalose, (5 % en masse par rapport au tréhalose) avait un effet

considérable (homogénéisation) sur la distribution des espèces moléculaires dans la formulation à l'état solide, et que celle-ci était corrélée avec la distribution du degré de dénaturation de la protéine. Les images Raman d'une formulation à l'état solide, calculées à chaque étape de la lyophilisation présentent des motifs identiques d'une étape à une autre, qui sont le reflet des interactions qui se développent à l'état liquide, dans la mesure où la congélation d'une solution est presque instantanée sur des micro-volumes. L'arrangement moléculaire à l'état solide correspond donc à une photo de l'organisation de l'état liquide. Il a également été montré (dans le paragraphe précédent) que l'amélioration de l'efficacité bioprotectrice par 5 % de glycérol était plus importante pour le tréhalose que pour le saccharose. Ceci peut être expliqué par les grandes capacités du tréhalose à former de nombreuses liaisons H avec l'eau à l'état liquide, comparativement aux autres disaccharides (saccharose, maltose)³⁰. Cette propriété est liée au fait que le tréhalose ne forme pas de liaisons H intramoléculaires, contrairement aux autres disaccharides (saccharose, maltose)³⁰. Ceci expliquerait pourquoi le glycérol est moins efficace en présence de saccharose qu'en présence de tréhalose pendant le séchage secondaire. Le nombre plus important de liaisons H entre l'eau et le tréhalose, par rapport au saccharose, serait à l'origine d'une matrice hôte plus compacte et plus rigide dans laquelle la protéine, imbriquée dans celle-ci, serait plus difficilement déformable.

En conclusion, cette étude montre que l'efficacité bioprotectrice d'un excipient, en particulier d'un disaccharide, résulte principalement de deux propriétés : la capacité de l'excipient à former des liaisons H avec l'eau, combinée avec la capacité de former une matrice vitreuse hôte très rigide, limitant les déformations de la protéine insérée dans cette matrice.

RÉFÉRENCES

1. Cicerone, M. T., Tellington, A., Trost, L. & Sokolov, A. Substantially Improved Stability of Biological Agents in Dried Form. *BioProcess Int.* 36–47 (2003).
2. Sun, W. Q. & Davidson, P. Protein inactivation in amorphous sucrose and trehalose matrices: Effects of phase separation and crystallization. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1425**, 235–244 (1998).
3. Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H. & Crowe, L. M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3592–3597 (1995).
4. Hansen, L. J. J., Daoussi, R., Vervaeet, C., Remon, J. P. & De Beer, T. R. M. Freeze-drying of live virus vaccines: A review. *Vaccine* **33**, 5507–5519 (2015).
5. Jain, N. K. & Roy, I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.* **18**, 24–36 (2009).
6. Cicerone, M. T. & Soles, C. L. Fast dynamics and stabilization of proteins: binary glasses of trehalose and glycerol. *Biophys. J.* **86**, 3836–3845 (2004).
7. Magazù, S., Migliardo, F. & Parker, S. F. Vibrational properties of bioprotectant mixtures of trehalose and glycerol. *J. Phys. Chem. B* **115**, 11004–11009 (2011).
8. Weng, L. & Elliott, G. D. Local minimum in fragility for trehalose/glycerol mixtures: Implications for biopharmaceutical stabilization. *J. Phys. Chem. B* **119**, 6820–6827 (2015).
9. Magazù, S., Migliardo, F., Gonzalez, M. A. & Mondelli, C. Inelastic neutron scattering study of dynamical properties of bioprotectant solutions against temperature. *J. Non. Cryst. Solids* **358**, 2635–2640 (2012).
10. Anopchenko, A., Psurek, T., Vanderhart, D., Douglas, J. F. & Obrzut, J. Dielectric study of the antiplasticization of trehalose by glycerol. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **74**, 1–10 (2006).
11. Obrzut, J., Anopchenko, A., Douglas, J. F. & Rust, B. W. Relaxation and antiplasticization measurements in trehalose-glycerol mixtures - A model formulation for protein preservation. *J. Non. Cryst. Solids* **356**, 777–781 (2010).
12. Hedoux, A., Paccou, L., Achir, S. & Guinet, Y. Mechanism of Protein Stabilization by Trehalose During Freeze-Drying Analyzed by In Situ Micro-Raman Spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* **102**, 2484–2494 (2013).
13. Nidhi, K., Indrajeet, S., Khushboo, M., Gauri, K. & Sen, D. J. Hydrotrophy: A promising tool for solubility enhancement: A review. *Int. J. Drug Dev. Res.* **3**, 26–33 (2011).
14. S. Achir. Etude des mécanismes de stabilisation des protéines par spectroscopie Raman et dynamique moléculaire. 123 (2014).
15. Mudalige, A. & Pemberton, J. E. Raman spectroscopy of glycerol/D₂O solutions. *Vib.*

- Spectrosc.* **45**, 27–35 (2007).
16. Hédoux, A., Paccou, L., Achir, S. & Guinet, Y. In Situ Monitoring of Proteins during Lyophilization using Micro-Raman Spectroscopy: A Description of Structural Changes induced by Dehydration. *J. Pharm. Sci.* **101**, 2316–2326 (2012).
 17. Mensink, M. A. *et al.* In-line near infrared spectroscopy during freeze-drying as a tool to measure efficiency of hydrogen bond formation between protein and sugar, predictive of protein storage stability. *Int. J. Pharm.* **496**, 792–800 (2015).
 18. Timasheff, S. N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9721–6 (2002).
 19. Padilla, A. M., Chou, S. G., Luthra, S. & Pikal, M. J. The Study of Amorphous Phase Separation in a Model Polymer Phase-Separating System Using Raman Microscopy and a Low-Temperature Stage: Effect of Cooling Rate and Nucleation Temperature. *J. Pharm. Sci.* **100**, 1362–1376 (2011).
 20. Dong, J., Hubel, A., Bischof, J. C. & Aksan, A. Freezing-induced phase separation and spatial microheterogeneity in protein solutions. *J. Phys. Chem. B* **113**, 10081–10087 (2009).
 21. Roessler, U., Leitgeb, S., Pieters, S., De Beer, T. & Nidetzky, B. In situ protein secondary structure determination in ice: Raman spectroscopy-based process analytical tool for frozen storage of biopharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* **103**, 2287–2295 (2014).
 22. Heller, M. C., Carpenter, J. F. & Randolph, T. W. Effects of phase separating systems on lyophilized hemoglobin. *J. Pharm. Sci.* **85**, 1358–1362 (1996).
 23. Hédoux, A., Paccou, L., Derollez, P. & Guinet, Y. Dehydration mechanism of caffeine hydrate and structural description of driven metastable anhydrates analyzed by micro Raman spectroscopy. *Int. J. Pharm.* **486**, 331–338 (2015).
 24. Bhatnagar, B. S., Bogner, R. H. & Pikal, M. J. Protein Stability During Freezing : Separation of Stresses and Mechanisms of Protein Stabilization. 505–523 (2007). doi:10.1080/10837450701481157
 25. Belton, P. S. & Gil, A. M. IR and Raman spectroscopic studies of the interaction of trehalose with hen egg white lysozyme. *Biopolymers* **34**, 957–961 (1994).
 26. Hédoux, A., Guinet, Y. & Paccou, L. Analysis of the mechanism of lysozyme pressure denaturation from raman spectroscopy investigations, and comparison with thermal denaturation. *J. Phys. Chem. B* **115**, 6740–6748 (2011).
 27. Seo, J. A. *et al.* Thermal denaturation of beta-lactoglobulin and stabilization mechanism by trehalose analyzed from Raman spectroscopy investigations. *J. Phys. Chem. B* **114**, 6675–6684 (2010).
 28. Chang, B. S., Beauvais, R. M., Dong, A. & Carpenter, J. F. Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: glass transition and protein conformation. *Arch. Biochemistry Biophys.* **331**, 249–258 (1996).
 29. Dirama, T. E., Carri, G. A. & Sokolov, A. P. Role of hydrogen bonds in the fast dynamics of binary glasses of trehalose and glycerol: A molecular dynamics simulation study. *J.*

Chem. Phys. **122**, (2005).

30. Lerbret, A. Etude de l'action bioprotectrice des sucres : une investigation par dynamique moléculaire et par spectroscopie Raman. (Université des Sciences et Technologies de Lille, 2005).

CHAPITRE 4.

ETUDE DE LA STABILITE DES PROTEINES EN SOLUTION EN PRESENCE DES DERIVES DE β - CYCLODEXTRINES

Durant ces dix dernières années, les études menées au sein de l'équipe sur la préservation des protéines ont focalisé sur les disaccharides. Elles ont permis de montrer que le mécanisme de stabilisation des protéines en solution impliquait la capacité de l'agent bioprotecteur à former des liaisons H avec l'eau. Cette propriété des disaccharides a pour effet de renforcer le réseau de liaisons H de l'eau et de le stabiliser lors de différents sources de stress de différentes natures telles que les basses et hautes températures¹⁻⁵, les dénaturants chimiques^{6,7} (urée, hydrochlorate de guanidine) qui détruisent le réseau de liaisons H de l'eau, et les très hautes pressions^{8,9}. Le renforcement des interactions O-H intermoléculaires a pour effet d'inhiber les mouvements les plus rapides de certaines chaines latérales qui sont souvent précurseur de phénomènes d'agrégation. Par distinction des disaccharides, d'autres types d'excipients tels que des surfactants, certains polymères, certaines protéines, sont utilisés pour réduire ces phénomènes d'agrégation sans forcément améliorer la stabilité de la protéine¹⁰. Dans ce contexte, les cyclodextrines (CDs) sont considérées comme des molécules très prometteuses pour réduire ces phénomènes d'agrégation¹¹⁻¹⁴.

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques, soluble dans l'eau. Selon le nombre de molécules de glucopyranose qui forme le cycle, on distingue 3 grandes classes de CDs (figure 4.1a) : α avec 6, β avec 7 et γ avec 8 unités par cycle¹⁵. En substituant certains groupements -OH d'une CD par un groupement fonctionnel (hydroxy-propyle, méthyle, etc.) on obtient un dérivé de CD, caractérisé par un degré de substitution et par des propriétés favorisant une application particulière de la CD. Les molécules de cyclodextrines peuvent être visualisées comme un cône tronqué, avec une cavité hydrophobe et l'extérieur hydrophile¹⁵. Cette caractéristique donne

aux CDs la capacité de former une cage moléculaire hydrophobe (figure 4.1b), de différentes tailles (figure 4.1a), permettant d'inclure une molécule ou une partie d'une molécule, et formant ainsi un complexe moléculaire par inclusion¹⁶. Cette propriété est largement utilisée dans le domaine pharmaceutique, afin de libérer de manière contrôlée un principe actif¹⁷⁻¹⁹, ou de rendre soluble certaines molécules d'intérêt thérapeutique^{12,16}.

Les molécules de CD sont également utilisées afin de réduire l'agrégation des protéines en solution. La plupart de ces études, ont permis d'identifier les résidus

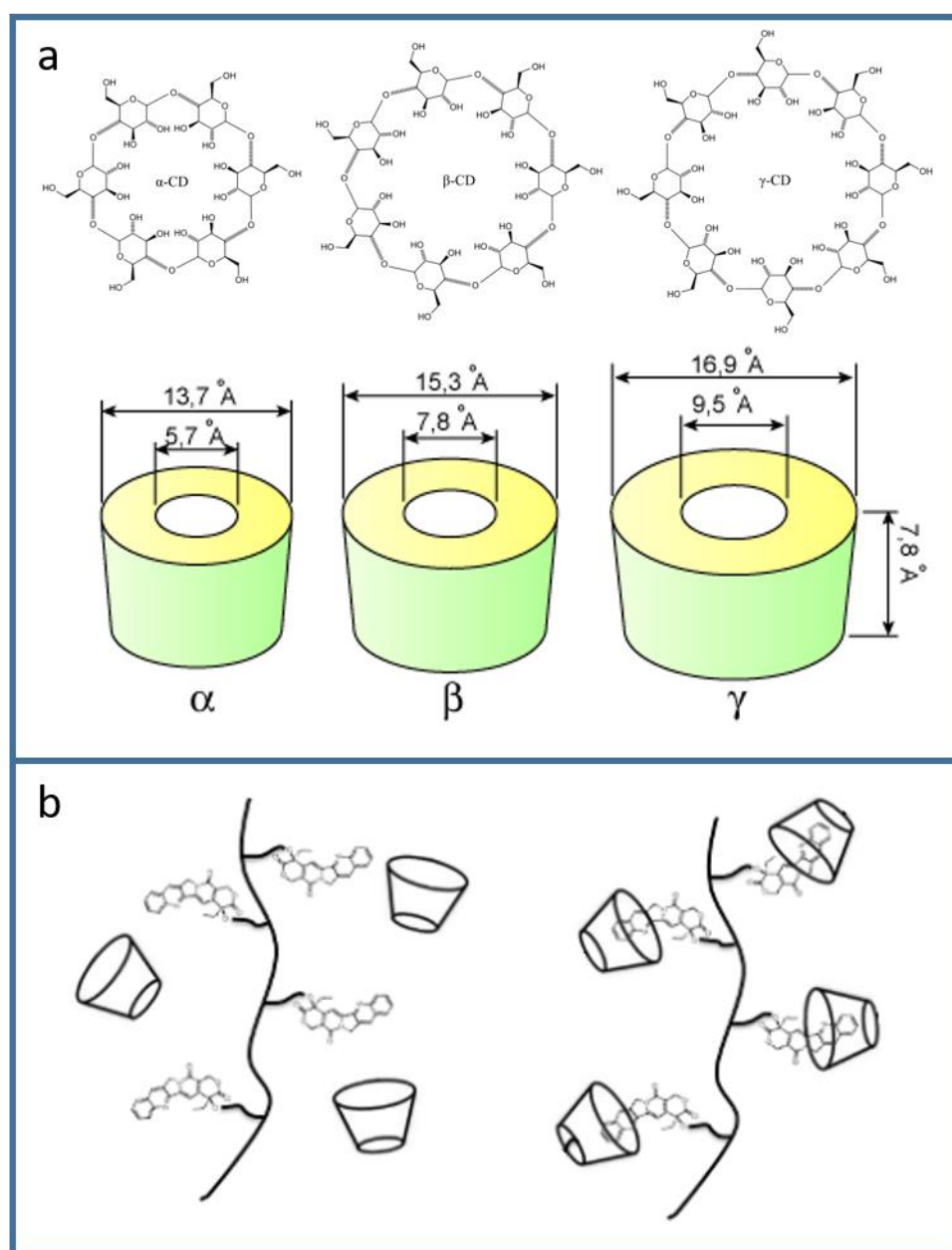


FIGURE 4.1 : (a) La structure des cyclodextrines et leurs dimensions géométriques. (b) Représentation schématique du mécanisme de complexation des entités hydrophobes par les cyclodextrines, proposé par Matsubara et al.⁵¹ et Davis et al.⁵².

hydrophobes, tels que tryptophane (Trp), tyrosine (Tyr), phénylalanine (Phe), histidine (His) des protéines comme principales sources d'interaction (complexation) entre les protéines et les cyclodextrines^{12,16} au sein de leurs cages. Ce sont les β -CDs et leurs dérivés qui semblent le plus favoriser ce type d'inclusion, compte tenu du diamètre de leur cage^{12,20-23}. La complexation des résidus hydrophobes à l'intérieur des cages formées par les α -CDs, γ -CDs et leurs dérivés sont beaucoup moins favorables, principalement d'un point de vue dimensionnel^{16,24}.

Utiliser une même molécule comme système à libération contrôlée et comme inhibiteur d'aggrégation est un argument qui a motivé une étude détaillée sur l'action des CDs pendant un processus de dénaturation chaude de protéines en solution ou pendant un cycle complet de la lyophilisation. Dans une première étude la molécule Kleptose Hydroxy Propyl (β -CD), *Roquette et Frères*, avec un degré de substitution molaire (MS) de 0.85, a été choisie pour analyser son action sur deux protéines modèles, lysozyme (L) et β -lactoglobuline (β LG). La première est largement utilisée dans de nombreuses études de structure secondaire majoritairement composée d'hélices^{8,11,25,26} et contient 6 Trp, 3 Tyr et 3 Phe (12 acides aminées hydrophobes). La seconde protéine utilisée dans cette étude, est une protéine laitière, qui a une structure secondaire majoritairement en feuillets et présente une structure quaternaire formée de dimères. La β LG contient 2 Trp, 4 Tyr et 4 Phe (12 acides aminées hydrophobes). Il est reconnu que cette protéine forme « très facilement » des agrégats^{3,9,27}. Afin d'étudier l'influence de la CD sur la dénaturation chaude de la protéine, trois types d'échantillons ont été systématiquement étudiés lors de procédure de chauffage par microcalorimétrie et micro-spectroscopie Raman. Les mélanges étudiés sont de deux types différents, suivant que la protéine est dissoute dans l'eau normale ou l'eau lourde. La protéine est d'abord étudiée dissoute uniquement dans l'eau avec une proportion de 10 % en masse, donc en absence de CDs (échantillon noté LW_h), puis en présence de 10 (LW_hHP β CD10) et 20 % (LW_hHP β CD20) de HP β CD.

4.1. Caractérisation de la dénaturation chaude du lysozyme par analyse calorimétrique

Les études par microcalorimétrie ont été systématiquement réalisées sur des échantillons d'une masse d'environ 400 mg, avec une vitesse de chauffe de 0.5 °C/min. Les thermogrammes des analyses par microcalorimétrie réalisées sur les trois échantillons (LW_h, LW_hHPβCD10 et LW_hHPβCD20) dans lesquels H₂O est utilisée comme solvant, sont représentés sur la figure 4.2a. Comme décrit dans le Chapitre 2, la dénaturation chaude est caractérisée thermodynamiquement par trois paramètres, correspondant à la température à mi transformation (T_m), l'enthalpie de l'endotherme de dénaturation (ΔH_m) et le saut de Cp (ΔC_p). Les valeurs de ces paramètres sont reportées dans le tableau 4.1.

TABLEAU 4.1 : Paramètres thermodynamiques caractéristiques de la dénaturation chaude du lysozyme dissout dans H₂O en absence de cyclodextrine (LW_h) et en présence de 10% (LW_hHPβCD10), et de 20% (LW_hHPβCD20) de HPβCD

	T_m [°C]	ΔH_m [J/g]	ΔC_p [J/°C · g]
LW_h	75.2 ± 0.1	3.5 ± 0.05	0.05 ± 0.01
LW_hHPβCD10	73.4 ± 0.1	3.3 ± 0.05	0.04 ± 0.01
LW_hHPβCD20	71.9 ± 0.1	3.3 ± 0.05	0.04 ± 0.01

La figure 4.2a montre clairement que l'ajout de CD a pour conséquence le déplacement graduel de l'endotherme de dénaturation vers les basses températures. La connaissance de ces trois paramètres thermodynamiques caractéristiques de la dénaturation chaude permet de construire les courbes de stabilité de la protéine à partir de la relation (4.1) :

$$\Delta G_{ND}(T) = \Delta H_m \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \left[(T_m - T) + T \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right] \quad (4.1)$$

Ces courbes correspondent aux tracés de l'énergie de Gibbs (ΔG_{ND}) en fonction de la température, représentés sur la figure 4.2b. Elles ont été tracées uniquement dans le domaine des hautes températures, mais leur profil parabolique est prédictif de deux valeurs de T pour lesquelles $\Delta H_m = 0$. Ceci indique l'existence d'un second phénomène de dénaturation à basse température, très difficile à mettre en évidence expérimentalement et non étudié dans cette étude. Le tableau 4.2 représente les paramètres thermodynamique caractéristiques de la dénaturation chaude du lysozyme dissout dans D₂O en absence de CD (LW_d) et en présence de 10% (LW_dHPβCD10),

et de 20% (LW_dHPβCD20) de HPβCD, permettant de construire les courbes de stabilité de la protéine. L'insert de la figure 4.2b montre que D₂O améliore sensiblement la stabilité de la protéine en décalant T_m vers les hautes températures, phénomène déjà observé sur plusieurs protéines^{3,28}, et relié à une stabilité plus importante du réseau de liaisons hydrogène dans D₂O en augmentant la température.

TABLEAU 4.2 : Paramètres thermodynamiques caractéristiques de la dénaturation chaude du lysozyme dissout dans D₂O en absence de cyclodextrine (LW_d) et en présence de 10% (LW_dHPβCD10), et de 20% (LW_dHPβCD20) de HPβCD

	T_m [°C]	ΔH_m [J/g]	ΔC_p [J/°C · g]
LW _d	77.7 ± 0.1	3.5 ± 0.05	0.06 ± 0.01
LW _d HPβCD10	75.7 ± 0.1	3.2 ± 0.05	0.05 ± 0.01
LW _d HPβCD20	73.4 ± 0.1	3.2 ± 0.05	0.05 ± 0.01

On note cependant, à température ambiante, que la stabilité de la protéine est plus forte dans H₂O que dans D₂O. La figure 4.2c, sur laquelle sont reportées les courbes de stabilité de la protéine lorsque celle-ci est dissoute dans D₂O montre les mêmes tendances dans le domaine des hautes températures, que lorsqu'elle est dissoute dans H₂O. On retrouve clairement un décalage graduel de T_m vers les basses températures en fonction de la concentration de cyclodextrine ajoutée. Dans le domaine de température proche de l'ambiante, la protéine semble par contre plus

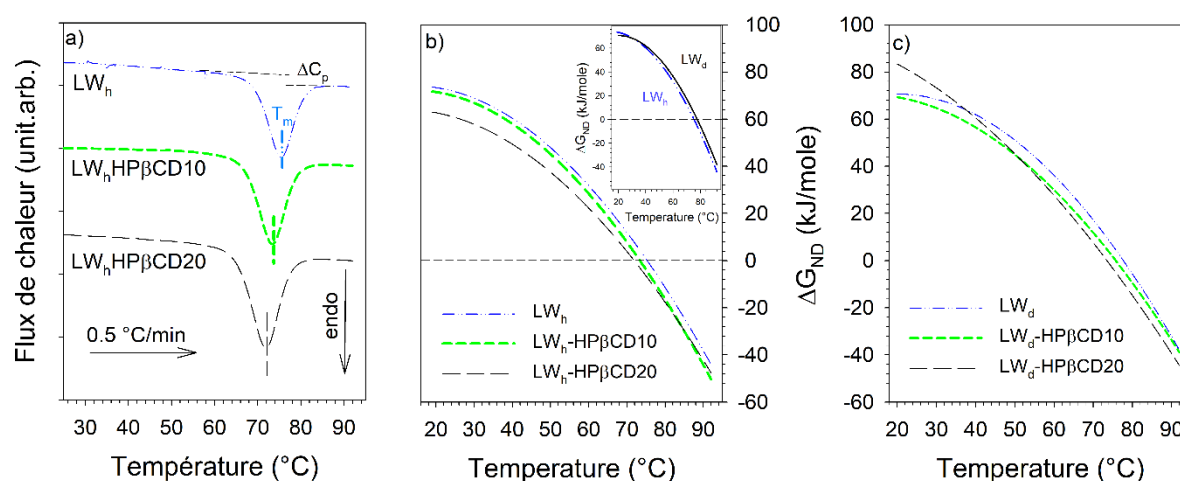


FIGURE 4.2 : Analyse de la stabilité du lysozyme en absence et en présence de 10 et 20 % en masse de HPβCD. (a) Thermogrammes des formulations à base de lysozyme dissout dans H₂O en absence (LW_h) et en présence de 10 % (LW_hHPβCD10) et 20 % (LW_hHPβCD20) de HPβCD. (b) Courbes de stabilité du lysozyme tracées à partir de la relation (4.1) pour les formulations dans lesquelles le lysozyme est dissout dans H₂O. La comparaison entre ces courbes obtenues à partir des analyses des endothermes de dénaturation du lysozyme dissout dans H₂O et D₂O est présentée dans l'insert. (c) Courbes de stabilité du lysozyme tracées pour les formulations dans lesquelles le lysozyme est dissout dans D₂O.

stable en présence de 20 % de cyclodextrine. Notre étude s'est portée plus spécifiquement sur le domaine haute température afin d'analyser comment influe la cyclodextrine sur les transformations successives de la protéine (N) $\rightarrow$ (MG) $\rightarrow$ (D), où ici (D) correspond à l'état déplié de la structure secondaire de la protéine. Celles-ci peuvent être analysées par spectroscopie Raman lorsque la protéine est dissoute dans l'eau lourde.

4.2. Analyse de l'influence de HP β CD sur la dénaturation chaude du lysozyme par spectroscopie Raman

Les analyses de micro-spectroscopie Raman ont été réalisés à l'aide du dispositif température contrôlée de Linkam Scientific, couplé au spectromètre Renishaw. Les solutions ont été versées dans une coupelle cylindrique de 10 mm en diamètre et 5 mm de profondeur. Afin d'éviter les échanges isotopiques H/D entre la solution et l'air, la coupelle contenant la solution à analyser a été couverte d'un couvercle en verre CaF₂. Les spectres ont été collectés en un point fixe, en utilisant une longueur d'onde $\lambda = 785$ nm. Chaque solution a été analysée par spectroscopie Raman, *in-situ* pendant une procédure de chauffage de 25 à 100 °C, avec une vitesse de 0.5 °C/min. Un spectre, qui correspond à 6 accumulations de 15s, a été collecté par pas de 0.5 degré, en procédure de chauffage, c'est-à-dire sans que la température soit régulée. A la fin de la procédure de chauffe, 150 spectres ont été enregistrés, couvrant une zone spectrale allant de 600 à 1800 cm⁻¹. Le temps total d'une expérience correspond à environ 2 h 30 min.

La figure 4.3 montre les spectres des formulations lysozyme dissout dans D₂O (LW_d), lysozyme dissout dans le mélange composé de D₂O et 10 % de CD (LW_dHP β CD10). La comparaison entre les spectres de ces trois formulations met en évidence que la région de la bande AI est totalement représentative de la protéine et permet d'analyser la dénaturation de la protéine à partir de l'évolution de la bande AI sans aucune pollution du spectre par des contributions liées aux vibrations internes des molécules d'eau et CD. Ce n'est pas le cas d'autres bandes de vibration de la protéine caractéristiques des structures, les bandes AIII des structures en feuillets (AIII-f situés vers 1240 cm⁻¹), et en hélices (AIII-h situés vers 1280 cm⁻¹), ainsi que les bandes des mouvements d'étirement C α – C – N dans les structures α et β situées à

930 et 960 cm^{-1} respectivement^{8,29}. De ce fait, dans cette région ($\omega < 1500 \text{ cm}^{-1}$) les bandes ne seront pas analysées en présence de 20 % de CD, les bandes de cette molécule donnant dans ce cas une contribution trop importante au spectre de la protéine, masquant ainsi les modifications structurales de la protéine.

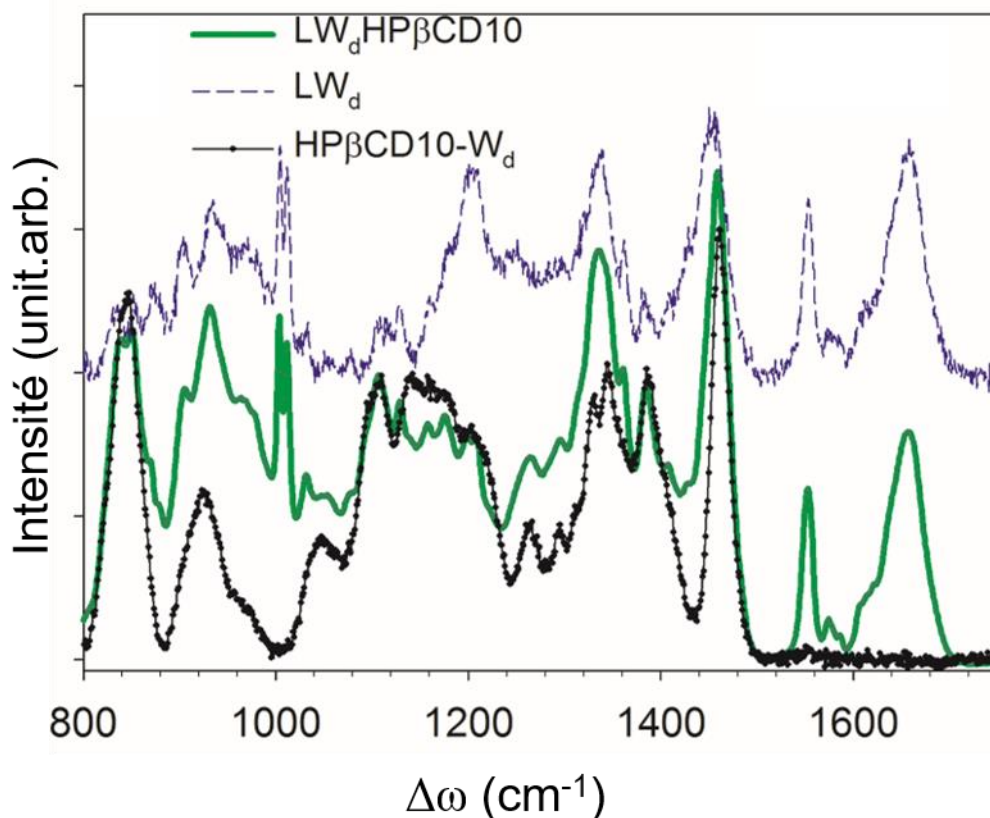


FIGURE 4.3 : Spectres dans la région correspondant à l'empreinte moléculaire des composés des formulations de lysozyme dissout dans D_2O en absence de cyclodextrine (LW_d) et en présence de 10 % de cyclodextrine ($\text{LW}_d\text{HP}\beta\text{CD}10$) de la cyclodextrine dissout dans D_2O avec une concentration massique de 10 %.

4.2.1. Analyse de la bande AI

En utilisant la procédure d'ajustement décrite dans le Chapitre 2, la position de la bande AI est déterminée à chaque température pour les trois échantillons à base de D_2O , et reportée sur la figure 4.4. On retrouve les deux glissements vers les basses puis vers les hautes fréquences de la bande AI, lors d'une procédure de chauffage, correspondant respectivement à la transformation de la structure tertiaire vers l'état « molten globule » (MG), et au dépliement de la structure secondaire. La figure 4.4 montre que l'ajout de CD déstabilise principalement la structure tertiaire de la protéine, puisque le glissement de la bande AI est détecté à des températures de plus en plus basses lorsque la concentration en $\text{HP}\beta\text{CD}$ est augmentée. Le dépliement de la

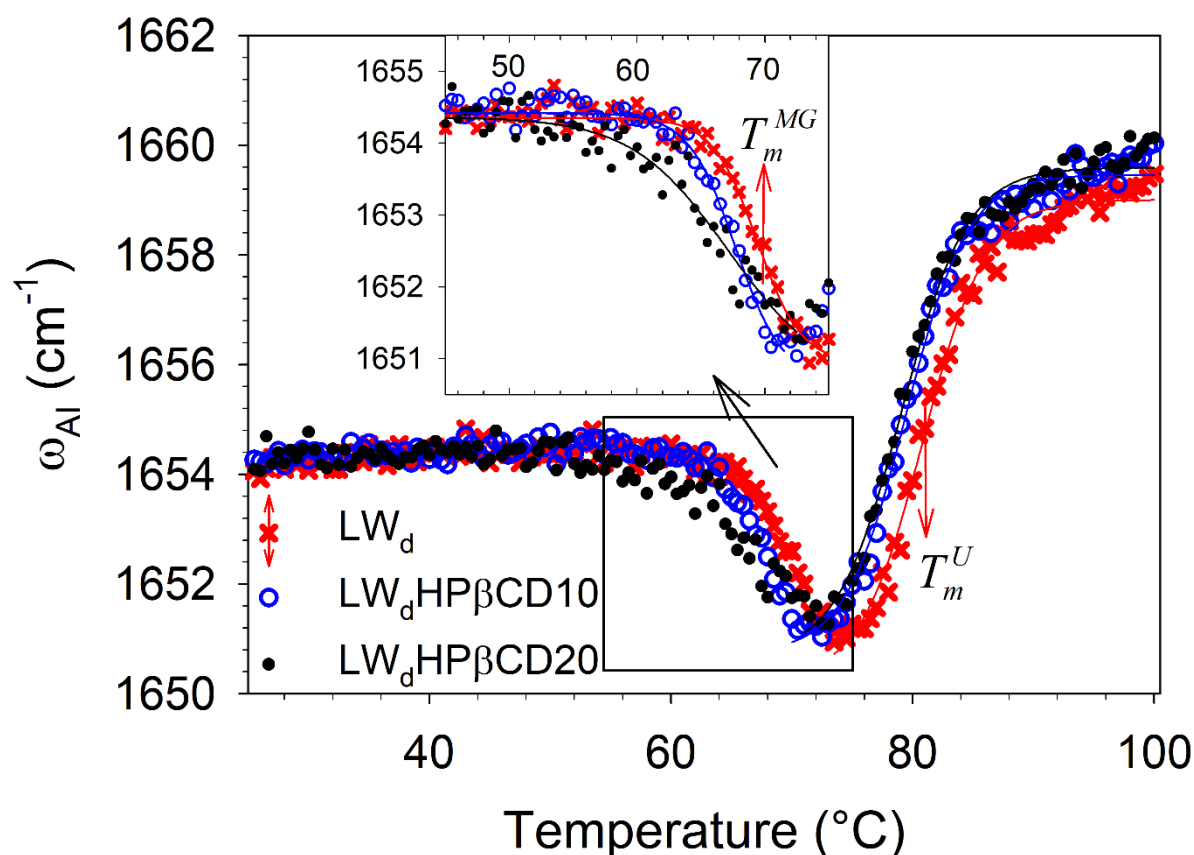


FIGURE 4.4 : Dépendance en température de la position de la bande AI, dans les échantillons pour lesquels le lysozyme est dissout dans l'eau lourde en absence de cyclodextrine (LW_d) et en présence de 10 % ($LW_dHP\beta CD10$) et 20 % ($LW_dHP\beta CD20$) de cyclodextrine. Ces positions ont été déterminées par une procédure d'ajustement décrite dans le chapitre 2 en utilisant le logiciel de traitement des données Wire, l'écart type moyen sur la détermination des positions de la bande AI est représenté par la barre d'erreur sur le symbole de l'échantillon LW_d dans la légende de la figure.

structure secondaire (décalage de la bande AI vers les hautes fréquences) semble par contre moins décalé en température que la transformation vers l'état (MG). On peut déterminer les températures à mi transformation pour chacune des deux transformations à l'aide du même type de fonction sigmoïdale présenté au chapitre 2 (eq. 2.7). Ces températures T_m^{MG} et T_m^U sont reportées dans le tableau 4.3 pour chaque échantillon, ainsi que leur différence ΔT . L'augmentation des valeurs de ΔT conjuguée avec la diminution de T_m^{MG} , lorsque la concentration de cyclodextrine augmente, révèle un effet de la cyclodextrine sur la pénétration du solvant à l'intérieur de la protéine qui est visible. Les courbes correspondant au dépliement de la structure secondaire (décalage vers les hautes fréquences) semblent simplement décalées en température en restant parallèles, alors que les courbes correspondant à la transformation (N) $\rightarrow$ (MG) sont de plus en plus étalées en augmentant la concentration en CD. Les variations de la position de la bande AI ont également été analysées pour les

échantillons à base de H₂O. Dans ce cas l'étude permet uniquement d'analyser le dépliement de la structure secondaire et n'apporte qu'une confirmation des décalages en température du dépliement de la structure secondaire de la protéine. Les résultats ne sont donc pas présentés dans ce mémoire.

TABLEAU 4.3 : Températures distinctives des deux transformations identifiées par spectroscopie Raman. $T_m^{MG}(^{\circ}C)$: température à demi-transformation de (N)→(MG) identifiée via les échanges isotopiques. $T_m^U(^{\circ}C)$: température à demi-transformation de (MG)→(D) où « U » symbolise l'état déplié de la structure secondaire (Unfolded state)

	$T_m^{MG} (^{\circ}C)$	$T_m^U (^{\circ}C)$	$\Delta T (^{\circ}C)$
LW_d	69.4 ± 0.2	80.9 ± 0.2	11.5
LW_dHPβCD10	67.7 ± 0.2	79.5 ± 0.2	11.8
LW_dHPβCD20	67.1 ± 0.2	79.1 ± 0.2	12.0

4.2.2. Analyse de la région spectrale 800 – 1400 cm⁻¹.

L'analyse de la région spectrale s'étendant entre 800 et 1400 cm⁻¹ peut être réalisée sur les deux types de formulations à base de D₂O et de H₂O. Les spectres en absence et en présence de 10 % de HPβCD sont tracés dans les états (N), (MG) et (D) sont reportés sur les figures 4.5a, 4.5b et 4.5c. Il est à souligner que les spectres dans l'état (MG) ne peuvent être tracés que pour les formulations à base de D₂O, car cet état n'est identifiable qu'à partir de l'analyse des échanges isotopiques. La figure 4.5a montre les transformations spectrales correspondant aux transformations (N) → (MG) → (D). On remarque en particulier une diminution d'intensité des bandes AIII-f et AIII-h situées à 1240 et 1280 cm⁻¹ et correspondant aux bandes AIII dans les structures en feuillets et en hélices. Ces deux bandes caractérisent donc les vibrations dans les éléments structuraux non exposés au solvant et donnent donc une contribution au spectre du lysozyme dissout dans H₂O comme le montre la figure 4.5a. La diminution d'intensité de ces deux bandes est due aux échanges isotopiques NH/ND qui se produisent lors de la pénétration du solvant au sein de la protéine.

Elle est logiquement associée à une augmentation observée à plus basse fréquence dans la région qui s'étend de 930 à 990 cm⁻¹. Cette région est assez complexe car elle correspond à la superposition des bandes de vibration d'étirements Cα – C – N dans les structures en hélices et feuillets, avec les bandes AIII correspondant aux mêmes vibrations que les bandes AIII mais pour les résidus exposés au solvant (D₂O) dans l'état natif (N) de la protéine. Il est également reporté

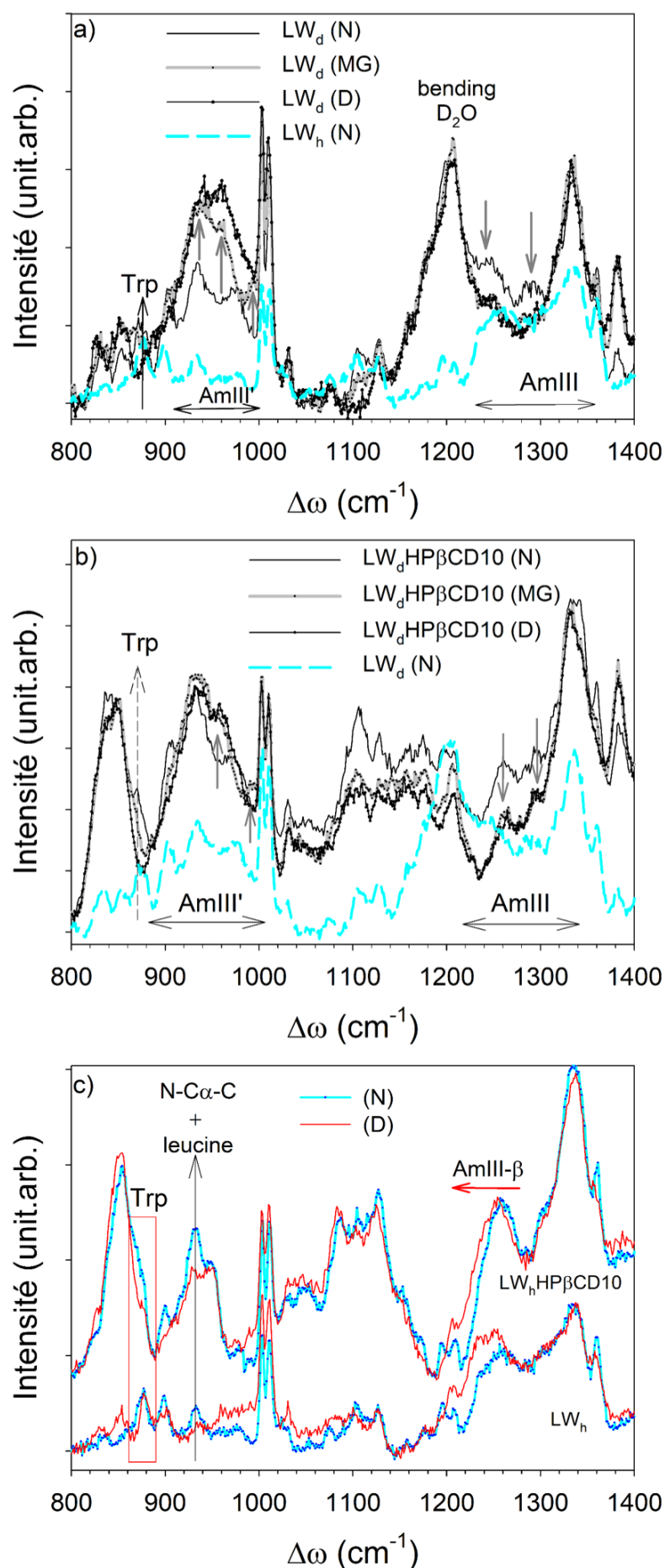


FIGURE 4.5 : Spectres collectés lors de la procédure de chauffe des formulations de lysozyme. (a) Les spectres de lysozyme dissout dans D_2O collectés dans l'état natif (N) à 25 °C, dans l'état « molten globule » (MG) à 75 °C et dans l'état dénaturé (D) à 100 °C, comparés au spectre du lysozyme dissout dans H_2O collecté à 25 °C dans l'état natif (N). Les flèches verticales grises en trait épais orientées vers le bas de la figure montre la décroissance de l'intensité des bandes AIII, alors que celles orientées vers le haut montrent la croissance concomitante de l'intensité dans la région AIII. Ces variations corrélées ont été associées aux échanges isotopiques NH/ND. (b) Les spectres du lysozyme dissout dans D_2O en absence de cyclodextrine (LW_d) dans l'état natif (N) et en présence de 10 % de HP β CD ($\text{LW}_d\text{HP}\beta\text{CD}10$) collectés dans les états (N), (MG) et (D). (c) Spectres du lysozyme dissout dans H_2O en absence de cyclodextrine (décalés vers le bas) et en présence de 10 % de HP β CD (décalés vers le haut) dans les états (N) et (D).

dans la littérature³⁰ que le résidu leucine donne une contribution vers 960 cm^{-1} correspondant à un mouvement d'élongation C – C. La complexité des modifications spectrales associées au processus de dénaturation de la protéine dans ce domaine spectral est accentuée en présence de cyclodextrine, comme le montre la figure 4.5b. Il est cependant possible de dégager les modifications les plus claires dues à la présence de cyclodextrine. Lors de la transformation (N) $\rightarrow$ (MG) l'augmentation d'intensité vers 930 cm^{-1} est considérablement réduite par rapport à ce qui est observée sur la figure 4.5a en absence de cyclodextrine. Cette observation peut être quantifiée en intégrant chaque spectre sur l'intervalle de fréquence $915 - 950\text{ cm}^{-1}$. Cette intensité intégrée est reportée en fonction de la température sur la figure 4.6a. Le même phénomène est observé à un degré moindre à 960 cm^{-1} , et l'intensité intégrée sur l'intervalle $950 - 980\text{ cm}^{-1}$ est reportée en fonction de la température sur la figure 4.6b.

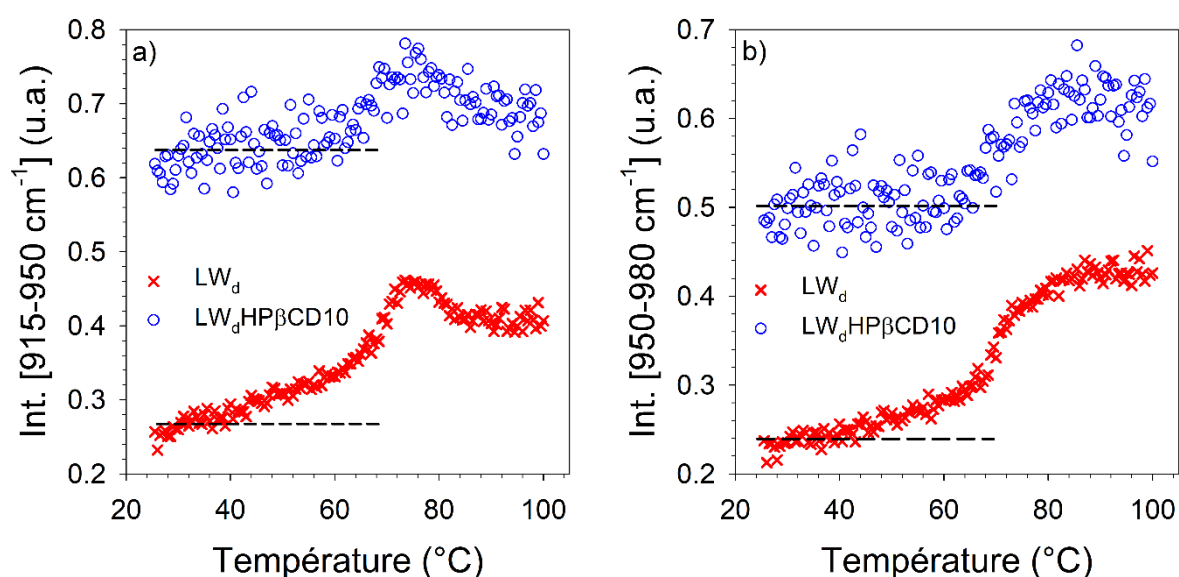


FIGURE 4.6 : Dépendances en température des intensités intégrées déterminées pour les formulations de lysozyme dissouts dans H_2O en absence (LW_d) et en présence de 10 % de HP β CD ($LW_dHP\beta CD10$), (a) dans la zone spectrale $915 - 950\text{ cm}^{-1}$ et (b) dans la zone spectrale $950 - 980\text{ cm}^{-1}$.

A plus basse fréquence il est visible (sur la figure 4.5b) que la bande, détectée vers 872 cm^{-1} comme un épaulement d'une bande intense de la cyclodextrine, disparaît graduellement et n'est plus détectée dans l'état dénaturé en présence de 10 % de HP β CD. En absence de cyclodextrine, la figure 4.5a montre que cette partie du spectre est difficile à analyser car fortement polluée par les échanges isotopiques. Cette bande est généralement associée au mode de vibration $W17$ du tryptophane.

(Trp)³¹, impliquant le cycle benzénique et le groupement -NH comme montré sur le schéma du résidu Trp de la figure 4.7.

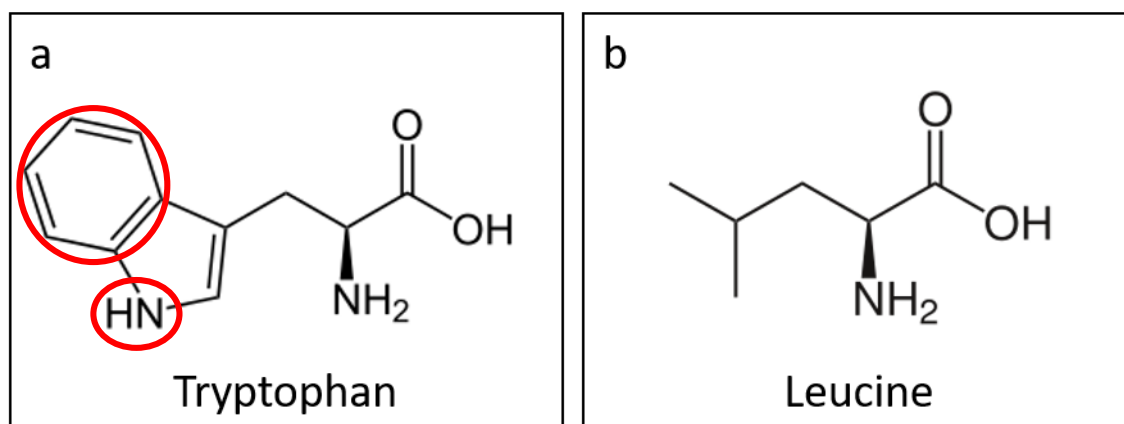


FIGURE 4.7 : Représentation des résidus (a) tryptophan et (b) leucine

Cette bande permet de sonder la nature (forte ou faible) des liaisons H dans lesquelles les résidus sont impliqués. Cette bande apparaît de manière plus isolée dans le spectre du lysozyme dissout dans H₂O en absence de CD, comme le montre la figure 4.5c. Il a donc été possible de mettre en évidence que lors d'une procédure de chauffage, la bande glisse vers les hautes fréquences. Ce glissement est accompagné d'un affinement du profil de la bande, très visible sur la figure 4.5c lorsqu'on compare les spectres des états natif et dénaturé de l'échantillon LW_n. Une telle dépendance en température d'une bande de vibration, opposée à ce qui est généralement observé lorsque la température est augmentée, peut être interprétée par des liaisons H plus faibles, entraînant une augmentation de fréquence de la bande, et par une distribution de liaisons H plus réduite entraînant un affinement de la bande. En présence de 10 % de HPβCD, la bande correspondant au mode W17 est détectée dans le spectre de LW_nHPβCD10 représenté sur la figure 4.5c, via un épaulement de la bande intense de la CD, comme dans le spectre de LW_dHPβCD10 sur la figure 4.5b. Afin de pouvoir comparer les variations de cette bande en absence et en présence de CD, l'intensité intégrée dans l'intervalle 860 – 890 cm⁻¹ a été calculée pour chaque spectre et reportée en fonction de la température sur la figure 4.8a pour chaque échantillon. Cette figure montre très bien qu'en absence de CD, la modification spectrale de la bande n'est détectée que lors du processus de dépliement de la structure secondaire (T > 70 °C), alors qu'en présence de CD, elle est détectée de

manière significative à partir de 40 °C. On observe également que la variation d'intensité est plus marquée en présence qu'en absence de CD.

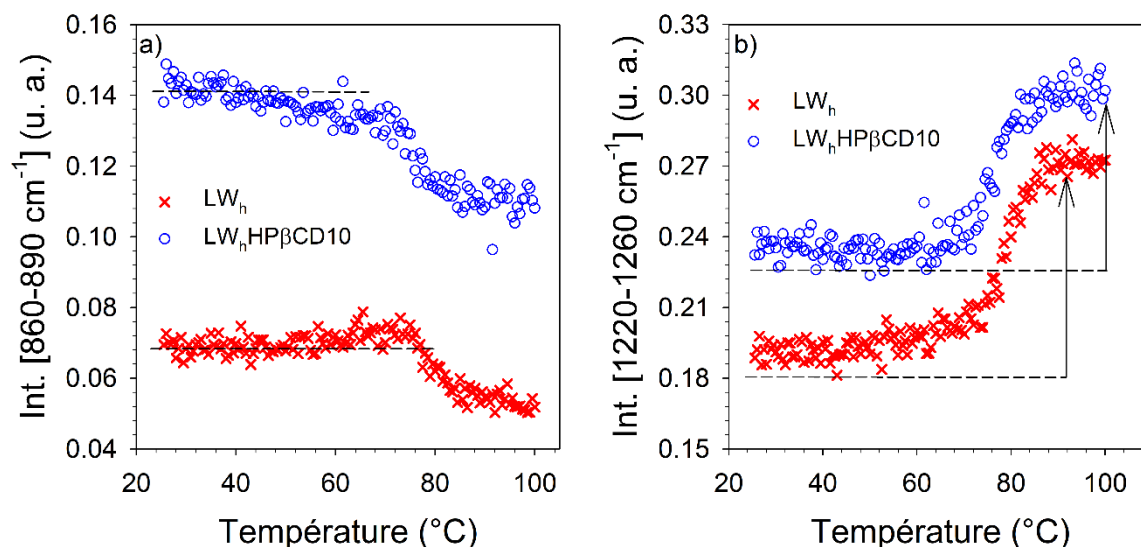


FIGURE 4.8 : Dépendances en température des intensités intégrées déterminées pour les formulations de lysozyme dissouts dans H_2O en absence de cyclodextrine (LW_h) et en présence de 10 % de $HP\beta CD$ ($LW_hHP\beta CD10$). (a) dans la zone spectrale 860-890 cm^{-1} , où est détectée la bande W17. (b) dans la zone spectrale 1220-1260 cm^{-1} , où est détectée la bande AIII dans les structures en feuillets β . Les flèches verticales permettent de visualiser l'amplitude de la variation d'intensité. Les traits horizontaux hachés sont des guides pour l'œil afin de visualiser la température à partir de laquelle est détectée une variation significative de l'intensité.

Les spectres de la figure 4.5c mettent également en évidence une influence de la CD sur le comportement de la bande AIII-f (1240 cm^{-1}) lors de la dénaturation de la protéine. En absence de CD, on observe une augmentation d'intensité accompagnée d'un glissement de la bande vers les basses fréquences, alors qu'en présence de CD l'intensité ne semble pas varier significativement et le glissement apparait plus réduit. Cette comparaison a été à nouveau matérialisée en calculant l'intensité intégrée de chaque spectre dans l'intervalle 1220 – 1260 cm^{-1} . Celle-ci est reportée en fonction de la température sur la figure 4.8b pour chaque échantillon. Il est perceptible à la vue de cette figure que l'augmentation d'intensité est plus importante en absence de CD. Cette augmentation d'intensité associée au glissement vers les basses fréquences de la bande AIII-f, sont généralement liées à la formation de nouvelles liaisons H entre feuillets β , considérées comme précurseur d'agrégation des protéines. Dans ce contexte, la présence de CD réduirait la formation de ces liaisons H, et par conséquence réduirait également le phénomène d'agrégation.

4.3. Lyophilisation des mélanges lysozyme et lysozyme-HP β CD

Il a été montré que les CDs avaient un effet bioprotecteur durant la lyophilisation de certaines protéines. L'une de ces molécules les plus couramment utilisées comme agent bioprotecteur pendant la lyophilisation est le HP β CD.^{10,32–34} Des études ont révélé que l'efficacité bioprotectrice de cette molécule, utilisée comme agent tensioactif pendant une procédure de lyophilisation, dépend de sa concentration. Les mesures de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase (LDH), lyophilisée en présence HP β CD, ont montré que, dans une plage de concentration de 0,0001 à 1 % en masse, l'efficacité de la CD est maximale entre 0.1 et 1 %^{10,32,35}. Il a été montré que les propriétés physiques de la HP β CD, liées à ses capacités de vitrification, ont aussi une influence sur l'effet bioprotecteur de la CD³², nécessitant une concentration conséquente (de 1 à 10% en masse par rapport à la protéine) pour que cette propriété soit effective³⁶. D'autres études, réalisées sur d'autres protéines (trypsine, albumine de sérum bovin (BSA), CYP3A4)^{37,38}, ont cependant révélé un effet stabilisateur de la HP β CD pendant la lyophilisation, plus réduit que celui des disaccharides (tréhalose et sucrose).

On constate à la lecture de la littérature sur l'effet stabilisateur des CDs (HP β CD en particulier) lors de lyophilisation de protéines, qu'il est très difficile de prédire leurs conditions d'utilisation. Ceci regroupe principalement le choix du dérivé, du degré de substitution, et de la concentration. Il est aussi nécessaire de connaître pour quels types de protéines l'utilisation des CDs doit être privilégiée, ce qui revient à comprendre sur quel type d'arrangement structural l'action des CDs sera efficace. Il s'agit d'une étude très large qui doit être réalisée sur un spectre étendu de protéines avec différentes CDs. Celle-ci a été initiée au cours de cette thèse en étudiant l'effet de la HP β CD sur le lysozyme pendant la lyophilisation, mais aussi après réhydratation du lyophilisat.

Dans le cadre de ce travail, les lyophilisats obtenus à partir des formulations lysozyme – D₂O – HP β CD (rapport protéine/CD 1:1), ont été cartographiés sur des zones couvrant une aire de 60×60 μm^2 . Les paramètres d'acquisition de données, décrits dans le chapitre 3, section 3.2 ont également été utilisés. Deux cycles de lyophilisation identiques ont été réalisés séparément pour deux formulations identiques (notées LW_d-HP β CD_FD1 et LW_d-HP β CD_FD2). L'efficacité bioprotectrice

de HP β CD pourrait-être déterminée par comparaison des résultats obtenus après lyophilisation de la formulation LW_d-HP β CD avec ceux obtenus après lyophilisation d'une solution de lysozyme sans excipient (LW_d).

C'est principalement la région de la bande AI (non perturbée par les bandes de la CD), et plus spécifiquement la position de la bande, qui a été utilisée pour estimer le degré de dégradation de la protéine, en présence ou non de HP β CD. La figure 4.9 montre les histogrammes correspondant aux distributions des positions de la bande AI pour les échantillons LW_d, LW_d-HP β CD_FD1, LW_d-HP β CD_FD2 et LW_d-T (lysozyme-trehalose) à la fin de la lyophilisation. On observe que dans l'échantillon LW_d, la valeur maximale de la distribution est située à plus haute fréquence que pour les autres formulations, entre 1662 et 1664 cm⁻¹, avec une moyenne calculée vers 1663.1 $\pm$ 0.4 cm⁻¹. Il est également notable que la largeur de la distribution est plus importante. En présence de 10 % de HP β CD, la distribution de la position de la bande AI est décalée à plus basse fréquences (1662.01 $\pm$ 0.2 cm⁻¹ et 1661.01 $\pm$ 0.3 cm⁻¹ pour la première et la deuxième solution, respectivement). Ceci témoigne d'une stabilisation de la structure secondaire pendant le cycle de lyophilisation. Cependant, l'effet bioprotecteur de HP β CD est plus faible que celui du tréhalose, compte tenu que la

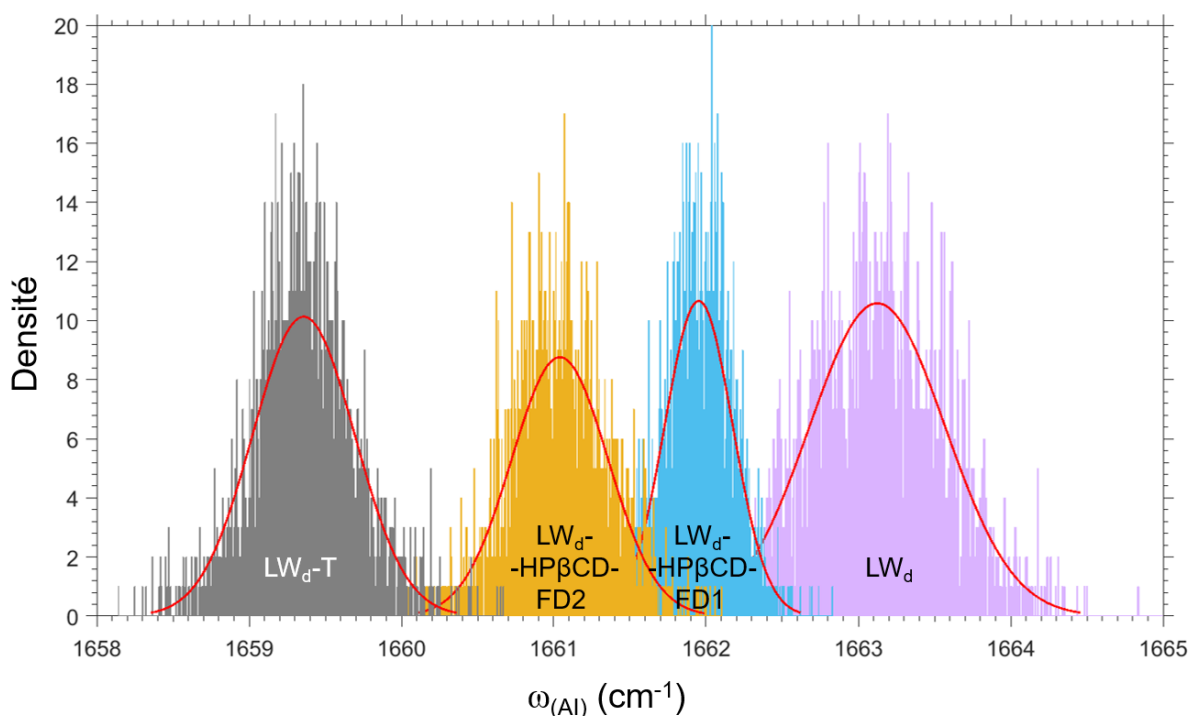


FIGURE 4.9 : La fréquence de la bande AI déterminée après une procédure de lyophilisation dans plusieurs formulations contenant du lysozyme lyophilisé en absence d'excipients (LW_d), en présence de 10 % de HP β CD (LW_d-HP β CD_FD1 et LW_d-HP β CD_FD2) et en présence de 10 % de tréhalose (LW_d-T).

distribution des positions de la bande AI dans l'échantillon LW_d-T, est centrée vers $1659.4 \pm 0.3 \text{ cm}^{-1}$. On soulignera un léger décalage ($\sim 1 \text{ cm}^{-1}$) entre les distributions représentatives des deux formulations à base de CD, bien qu'une tendance caractérisant l'effet bioprotecteur de la CD semble se dégager.

La stabilité des lyophilisats réhydratés a été analysée par micro-spectroscopie Raman, pendant une procédure de chauffage de 25 à 100 °C. Un spectre a été collecté par pas de 2.5 °C (temps d'acquisition : 6 x 15 s), à température constante, dans une zone spectrale allant de 600 à 1800 cm^{-1} . La durée d'une telle procédure de chauffage était d'environ 5 h.

La position de la bande AI, déterminée par la procédure d'ajustement décrite au chapitre 2, a été tracée en fonction de la température pour trois solutions : une solution fraîche de lysozyme dissout dans D₂O en présence de 10 % de HP β CD similaire à celle étudiée dans le paragraphe 4.2 (et notée ici LW_d-HP β CD), et les deux solutions

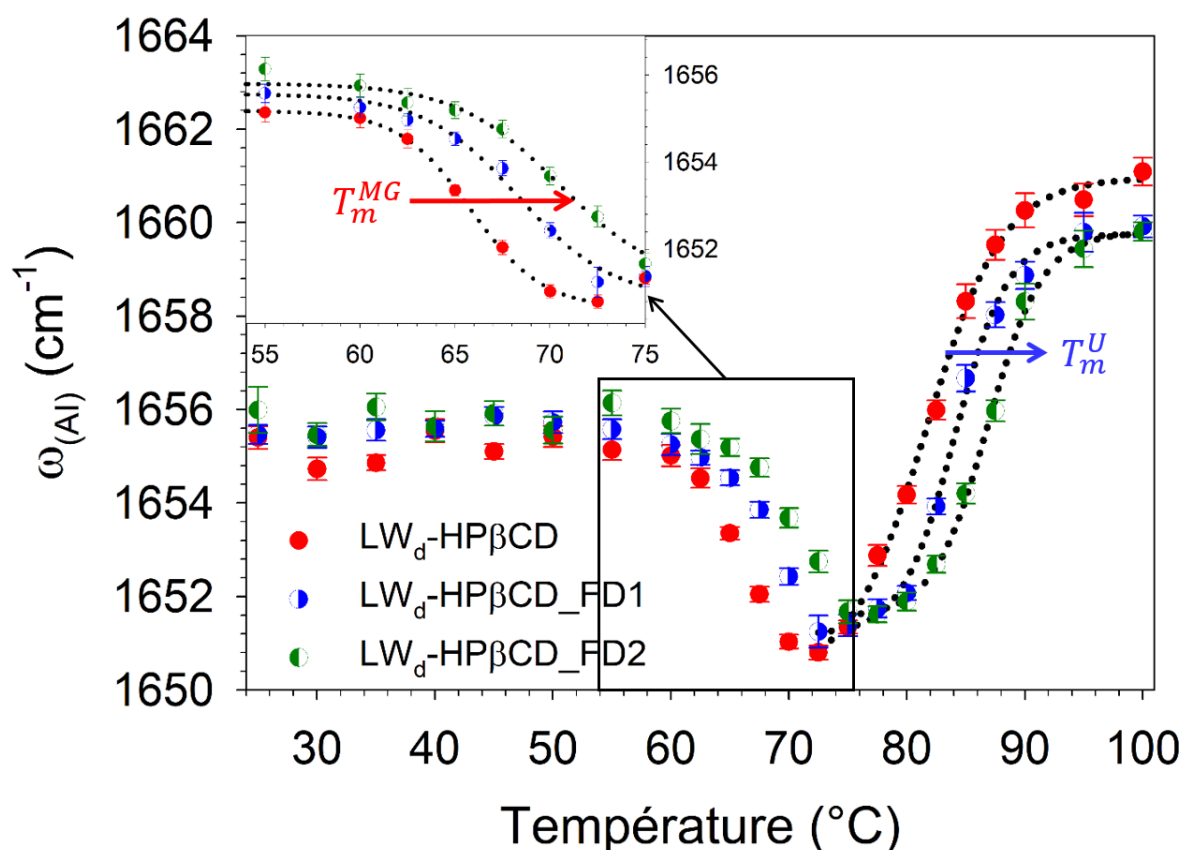


FIGURE 4.10 : Dépendance en température de la position de la bande AI, déterminée sur des spectres collectés lors d'une chauffe d'une solution à base de lysozyme, cyclodextrine et D₂O non lyophilisée (LW_d-HP β CD) et deux solutions lyophilisées et réhydratées dans D₂O (LW_d-HP β CD_FD1 et LW_d-HP β CD_FD2). Ces positions ont été déterminées par une procédure d'ajustement décrite dans le chapitre 2 en utilisant le logiciel de traitement des données Peakfit, l'écart type moyen sur la détermination des positions de la bande AI est représenté par la barre d'erreur sur les symboles.

correspondant aux lyophilisats réhydratés (notées LW_d-HPβCD_FD1 et LW_d-HPβCD_FD2). Cette étude comparative est représentée sur la figure 4.10. On observe un décalage des courbes de dénaturation du lysozyme vers les hautes températures pour les lyophilisats réhydratés, la courbe la plus décalée étant celle correspondant à l'échantillon LW_d-HPβCD_FD2. On note un décalage à peu près équivalent pour le glissement vers les basses fréquences, correspondant à la transformation (N) → (MG) et vers les hautes fréquences, attribué au dépliement de la structure secondaire, c'est-à-dire la transformation (MG) → (D). Ces résultats montrent que la lyophilisation réalisée au préalable a un effet stabilisateur par rapport à la solution LW_d-HPβCD, qui pourrait être dû à la complexation de résidus par la CD, certainement favorisée lors d'un cycle de lyophilisation, d'après la littérature^{23,39}. On remarque que suivant le degré de dénaturation, plus ou moins élevé, de la protéine après lyophilisation (figure 4.9), celle-ci est dénaturée après réhydratation à plus ou moins basse température. La figure 4.10 montre également que la position de la bande AI dans l'état (D) des échantillons lyophilisés réhydratés est plus basse que dans la solution préparée avec des poudres fraîches. Ceci indique un degré de dénaturation plus faible de la structure secondaire de la protéine, après lyophilisation en présence de HPβCD et réhydratation, par rapport à la solution LW_d-HPβCD.

TABLEAU 4.4 : Températures distinctives des deux transformations identifiées par spectroscopie Raman. $T_m^{MG}(^{\circ}C)$: température à demi-transformation de (N)→(MG) identifiée via les échanges isotopiques. $T_m^U(^{\circ}C)$: température à demi-transformation de (MG)→(D) où « U » symbolise l'état déplié de la structure secondaire (Unfolded state)

	$T_m^{MG}(^{\circ}C)$	$T_m^U(^{\circ}C)$	$\Delta T(^{\circ}C)$
LW _d	65.6 ± 0.9	80.6 ± 0.3	17.5
LW _d -HPβCD	65.8 ± 0.5	81.6 ± 0.3	17.5
LW _d -HPβCD_FD1	68.3 ± 0.6	84.0 ± 0.3	17.5
LW _d -HPβCD_FD2	70.5 ± 0.7	86.8 ± 0.2	20.0

Le tableau 4.4 montre qu'avec les conditions expérimentales utilisées lors de ces mesures, la valeur de T_m^U pour la solution LW_d-HPβCD est différente de celle obtenue dans le paragraphe précédent (tableau 4.3), pour une solution préparée de manière similaire (LW_d-HPβCD10). La différence essentielle entre les deux séries de mesures correspond à une augmentation de la durée de la procédure de chauffage, qui passe de 2 h 30 (dans le cas précédent) à 5 h (dans le cas présent). Ceci indique un effet cinétique important sur le processus de dénaturation chaude uniquement en

présence de HP β CD, car la variation de T_m^U entre les deux séries de mesures réalisées sur la solution LW_d est dans la barre d'erreur de la grandeur déterminée par ajustement d'une sigmoïde sur les positions de la bande AI. Cet effet cinétique inhérent à la présence de CD, est très probablement induit par un phénomène de complexation plus important, favorisé par une vitesse de chauffage réduite. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que l'augmentation de la température n'est pas favorable à la complexation. On montre ainsi que la protéine peut être stabilisée ou déstabilisée par la CD suivant que les conditions expérimentales favorisent ou non le phénomène de complexation.

La formation des complexes d'inclusion entre les molécules de CDs et les résidus hydrophobes de la protéine a été plusieurs fois observée après la lyophilisation d'une solution protéine-HP β CD-eau^{12,22,23}. Les techniques spectroscopiques, en particulier la spectroscopie Raman, sont bien adaptées pour mettre en évidence la formation des complexes^{22,23,40}. La complexation peut être détectée à partir de modifications des bandes correspondant aux vibrations internes des résidus hydrophobes décrites dans le tableau 4.5. L'analyse des bandes de la HP β CD peut également révéler un phénomène de complexation. En particulier la bande qui apparaît vers 951 cm⁻¹, et qui est associée à des modes d'élongation C-O-C, impliquant les liaisons α 1-4 (orientée à l'intérieur de la cage), est sensible à l'inclusion de groupements moléculaires²³, détectée par glissement de fréquence et/ou variation de largeur.

TABLEAU 4.5 : Les bandes Raman correspondant aux modes des vibrations internes des résidus hydrophobes Trp, Tyr et Phe qui peuvent former des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines

Fréquence (cm ⁻¹)	Mode de vibration	Molécule	Références
757	« Respiration » du cycle indole	Tryptophane	41–43
832	Mélange des mode de vibrations de « respiration » du cycle benzénique, déformation angulaire hors du plan	Tyrosine	44,45
853			
871-880	Mélange des mode de vibration 12 du cycle benzénique et le groupement NH	Tryptophane	31,46
1003	« Respiration » du cycle phényle	Phénylalanine	47
1012	« Respiration » du cycle benzénique	Tryptophane	41
1031	Vibration du cycle phényle	Phénylalanine	47
1362	Déformation du cycle benzénique	Tryptophane	31
1553	« Respiration » du cycle pyrole		41,42

Afin d'identifier les complexes d'inclusion formés entre le lysozyme et la HP β CD pendant la lyophilisation, 200 spectres ont été collectés, à température ambiante, sur une solution non-lyophilisée et une solution lyophilisée réhydratée. Les spectres moyens obtenus pour ces deux formulations ainsi que leur différence sont représentés sur la figure 4.11a et 4.11b respectivement. Une comparaison de ces deux figures montre des différences spectrales dans les régions des bandes associées à des mouvements des résidus hydrophobes, de la protéine, qui correspondent respectivement à un affinement de la bande observée vers 757 cm^{-1} , des décalages en fréquences du doublet 1003-1012 cm^{-1} et un décalage en fréquence de la bande située vers 1553 cm^{-1} . Ces changements montrent que les modes des vibrations des

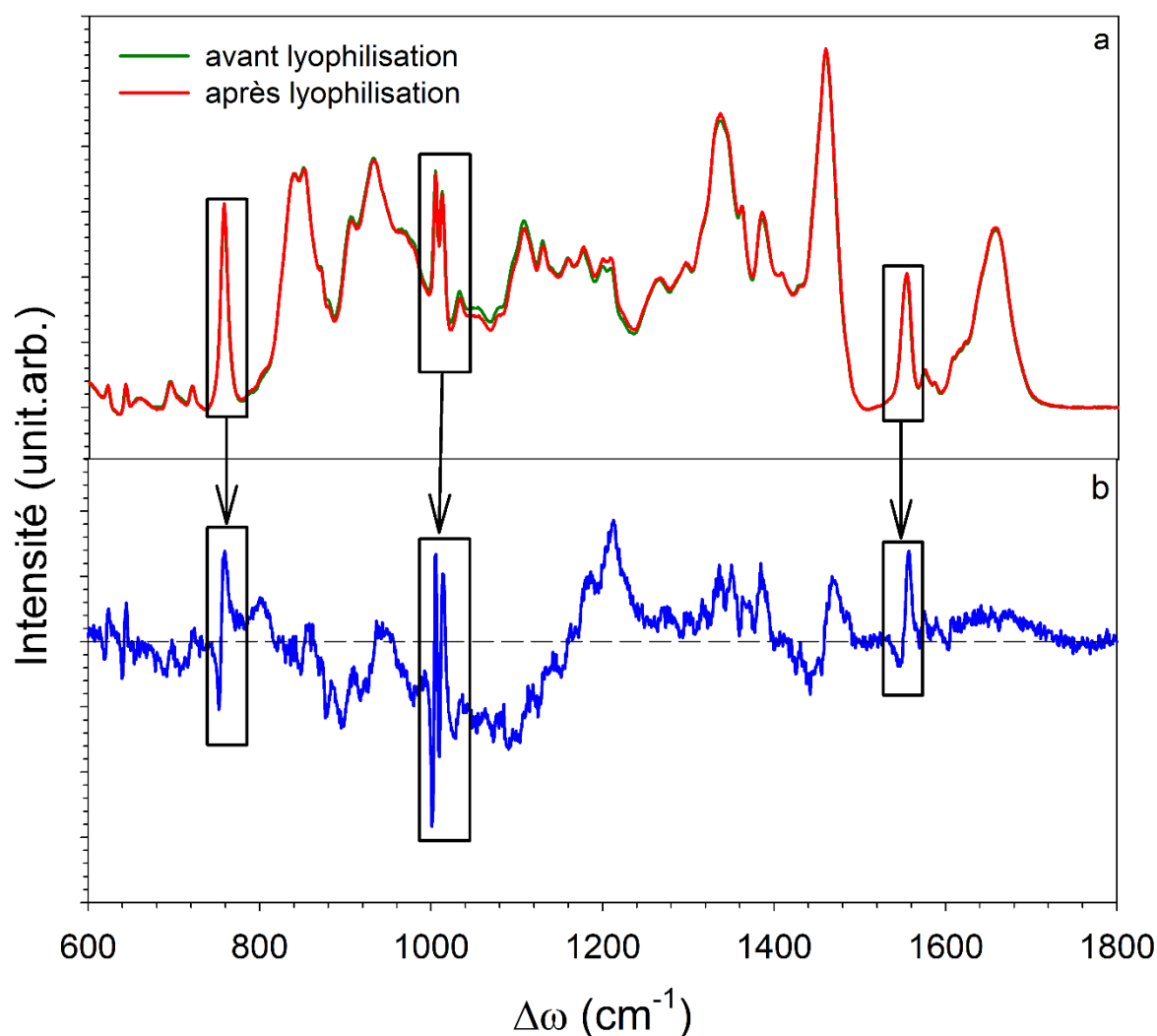


FIGURE 4.11 : (a) Les spectres moyens de 200 spectres Raman collectés à la température ambiante dans une solution lysozyme- D_2O -HP β CD, non-lyophilisée (avant lyophilisation) et une solution similaire lyophilisée et réhydratée dans D_2O (après lyophilisation). (b) Le spectre différence entre les deux spectres représentés sur la figure 4.11a.

résidus hydrophobes, plus particulièrement Trp et Phe, sont affectés par l'environnement. L'interaction entre les CDs et ces résidus hydrophobes, peut-être une explication des changements dans l'environnement des acides aminés impliqués. En considérant que le processus de lyophilisation favorise le phénomène de complexation, l'inclusion d'une partie des résidus peut inhiber leurs mouvements rapides et rendre moins flexible la protéine. C'est une explication possible de la stabilisation de la structure tertiaire native observée dans les solutions LW_d-HP β CD_FD1 et LW_d-HP β CD_FD2, via le décalage vers les hautes températures du glissement basse fréquence de la bande AI.

4.4. Discussion des résultats obtenus sur le lysozyme

Les analyses réalisées par microcalorimétrie et spectroscopie Raman pour déterminer comment HP β CD influence le comportement du lysozyme lors de sa dénaturation à haute température, convergent sur le fait que l'ajout de cette CD déstabilise la protéine lors d'une procédure de chauffage. La spectroscopie Raman permet de décrypter de manière fine l'action de la CD sur la protéine pendant les deux principales étapes de la dénaturation chaude correspondant aux deux transformations, (N) $\rightarrow$ (MG) $\rightarrow$ (D).

Il est remarquable sur la figure 4.4, que la CD a pour principal effet de déstabiliser la structure tertiaire native de la protéine. La transformation (N) $\rightarrow$ (MG) est détectée à des températures de plus en plus basses en fonction d'une concentration croissante en HP β CD. La transformation (N) $\rightarrow$ (MG) semble par contre de plus en plus étalée toujours en fonction d'une augmentation de la concentration en HP β CD. La transformation (MG) $\rightarrow$ (D) marquant le dépliement de la structure secondaire présente des lois sigmoïdales parallèles entre elles contrairement à la première transformation, et relativement voisines les unes des autres. Ceci indique que la CD interagit avec la protéine lorsque le solvant pénètre au sein de la protéine. Cette interaction a pour conséquence de réduire la formation de liaisons H entre les feuillets, qui sont souvent considérés comme étant à l'origine d'un phénomène d'agrégation^{5,9,48}.

L'interaction protéine – CD est également détectée à partir d'une réduction des échanges isotopiques détectées au niveau des bandes AIII. La nature de l'interaction

est plus difficile à décrypter vu la superposition des bandes de la protéine et de la CD sur une large partie du spectre dans la gamme de fréquence étudiée. Les observations sur la bande située à 875 cm^{-1} montre une évolution différente suivant que la formulation de lysozyme contient ou non de la CD. Elles suggèrent qu'une partie du résidu tryptophane (cycle benzénique) pourrait être complexée, lors du chauffage de la solution, engendrant ainsi la suppression de certaines liaisons H dans lesquelles le tryptophane est engagé. On note que la formation de complexes d'inclusion n'est généralement pas favorisée d'un point de vue thermodynamique à haute température, mais semble ici s'effectuer car les résidus de nature hydrophobe deviennent accessibles lors de la transformation (N) $\rightarrow$ (MG).

Il est également reconnu que c'est à partir de l'état MG que la formation d'agrégats se développe⁴⁹, et l'interaction entre CD et protéine dans l'état MG est certainement à la base du mécanisme permettant de réduire les phénomènes d'agrégation des protéines. Si effectivement, la CD réduit les phénomènes d'agrégation par complexation de certains résidus de la protéine, on peut considérer que cet effet est important par rapport au faible effet déstabilisateur qu'elle induit sur la structure secondaire de la protéine. L'amplification du processus de complexation peut également être envisagée en plaçant la protéine dans l'état MG à température ambiante, c'est-à-dire sans chauffer la solution. Il a été montré que l'ajout d'urée permettait de placer la protéine dans un état proche de l'état (MG) à température ambiante², ce qui laisse prévoir qu'un mélange urée-HP β CD serait intéressant en vue de favoriser la formation de complexes d'inclusion, avec pour objectif la stabilisation de la structure secondaire de la protéine et la réduction du phénomène d'agrégation.

Il a également été montré qu'une autre manière de complexer certains résidus de protéine consistait à lyophiliser la protéine en présence de CD. Cependant, la stabilité de la protéine dans une solution préparée par réhydratation du lyophilisat dépend du degré de dénaturation de celle-ci pendant la lyophilisation. Il convient donc d'optimiser le mode opératoire du cycle de lyophilisation pour optimiser les conditions de stabilité de la protéine en solution.

4.5. Analyse de l'influence de HP β CD sur la dénaturation chaude de la β -lactoglobuline.

Les analyses calorimétriques et Raman ont été reproduites en utilisant une autre protéine modèle (β -lactoglobuline, notée β LG). Il s'agit d'une protéine laitière qui présente une structure quaternaire (dimères) et dont la structure secondaire est principalement composée de feuillets β . Cette protéine est également reconnue pour former des agrégats^{3,9,27}. Etant donné la difficulté d'analyser les spectres Raman en présence de 20 % de CD, seules les formulations de β LG dans l'eau en absence et présence de 10 % (en masse) de HP β CD ont été étudiées.

Les analyses calorimétriques ont permis de déterminer les paramètres caractéristiques de la dénaturation de la β LG, donnés dans le tableau 4.6 qui ont conduit aux tracés des courbes de stabilité ($\Delta G_{ND}(T)$) présentées sur la figure 4.12a. Les résultats montrent des tendances similaires à celles observées sur le lysozyme, indiquant une déstabilisation de la protéine en ajoutant la CD.

TABLEAU 4.6 : Paramètres thermodynamiques caractéristiques de la dénaturation chaude de β LG dissout dans H₂O en absence de cyclodextrine (β LG-W_h) et en présence de 10% (β LG-W_h-HP β CD10), de HP β CD

	T_m [°C]	ΔH_m [J/g]	ΔC_p [J/°C · g]
β LG-W _h	72.8	1.47	0.014
β LG-W _h -HP β CD10	71.4	1.31	0.013

La variation de T_m pour la protéine β LG est toutefois légèrement plus réduite que pour le lysozyme. La figure 4.12b montre les spectres Raman collectés dans les états (N) et (D) de la β LG dissoute dans H₂O en absence et en présence de 10 % de HP β CD. Les glissements de la bande AI, vers les hautes fréquences, détectés entre les deux états apparaissent relativement similaires dans les deux échantillons. Le glissement de la bande AI a été précédemment attribué au dépliement des hélices⁵⁰ en nombre plus faible dans cette protéine par rapport au lysozyme. Ceci explique pourquoi les modifications spectrales de la bande AI dans les formulations de β LG sont plus fines que dans celles à base de lysozyme.

Les cinétiques de dépliement ont été déterminées à partir des mêmes procédures d'ajustement que celles utilisées précédemment pour le lysozyme. Ces

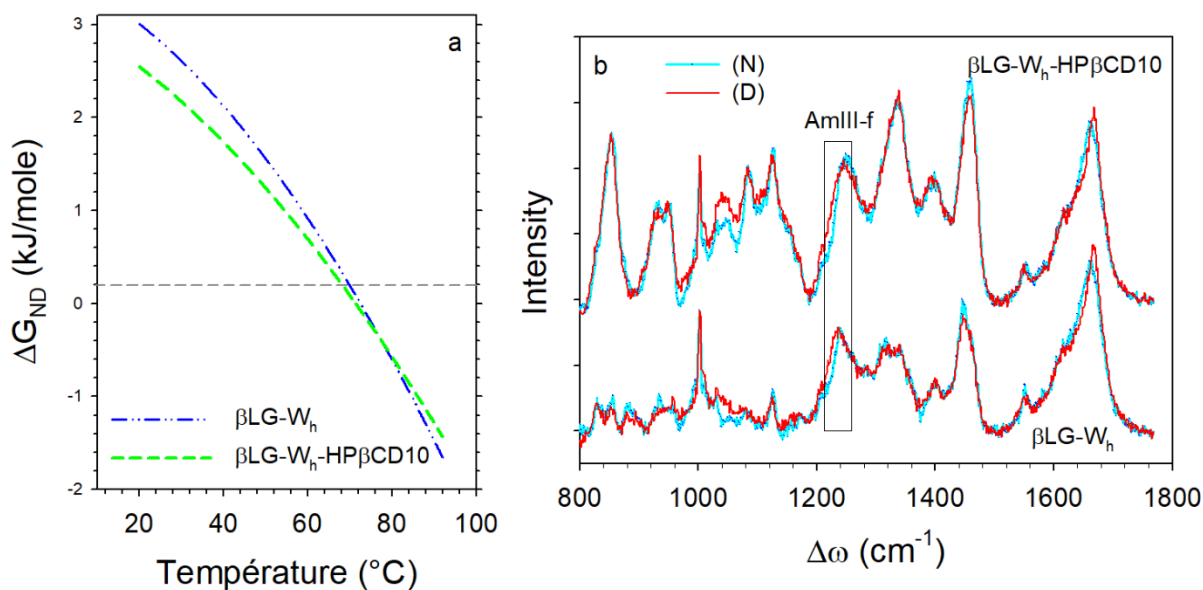


FIGURE 4.12 : (a) Courbes de stabilité du βLG tracées à partir de la relation (4.1) pour les formulations dans lesquelles βLG est dissout dans H_2O , en absence ($\beta LG-W_h$) et en présence de 10 % en masse de $HP\beta CD$ ($\beta LG-W_h-HP\beta CD$). (b) Les spectres de ces deux formulations collectés dans l'état natif (N) à 25 °C et dans l'état dénaturé (D) à 100 °C.

cinétiques sont reportées sur la figure 4.13a. On observe que les sigmoïdes sont très légèrement décalées (~ 1.5 °C) l'une par rapport à l'autre. Ces résultats, reportés dans le tableau 4.7, sont en accord avec ceux obtenus par microcalorimétrie, en considérant que la valeur de T_m^U obtenue par spectroscopie Raman, en utilisant H_2O comme solvant, reflète uniquement le dépliement de la structure secondaire, contrairement à l'analyse calorimétrique.

Pour avoir des informations plus détaillées sur la dénaturation chaude de la βLG , celle-ci a été étudiée lorsque la protéine est dissoute dans D_2O . Les glissements

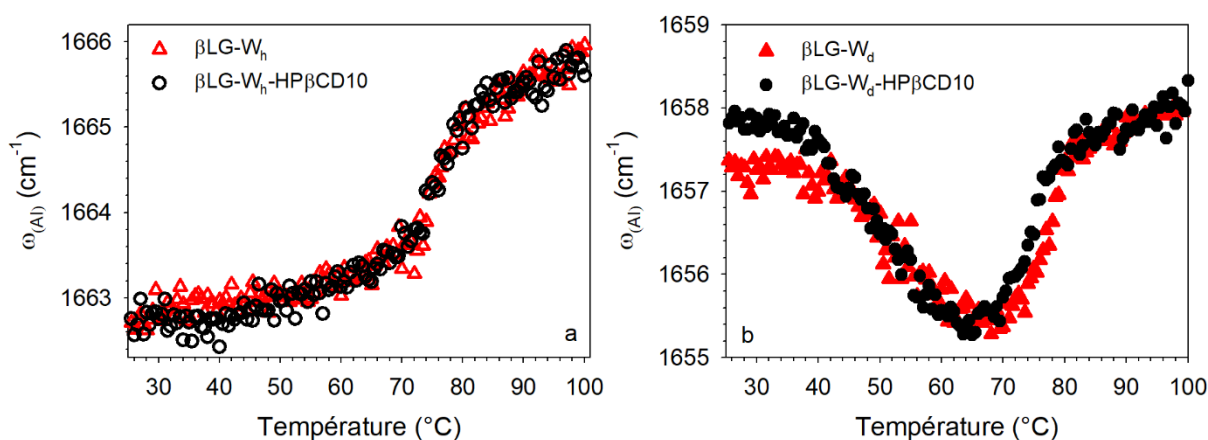


FIGURE 4.13 : Dépendance en température de la position de la bande AI, dans βLG dissout dans H_2O (a) et dans D_2O , en absence ($\beta LG-W_{h/d}$) et présence de 10 % de $HP\beta CD$ ($\beta LG-W_{h/d}-HP\beta CD$). Ces positions ont été déterminées par une procédure d'ajustement décrite dans le chapitre 2 en utilisant le logiciel de traitement des données Wire.

de la bande AI ont été tracées sur la figure 4.13b. On observe que la position de la bande AI, dans l'état (N), est décalée vers les hautes fréquences. Cette observation indique que les échanges isotopiques sont légèrement réduits en présence de CD, probablement à cause d'interactions protéines-CDs. On remarque ensuite un glissement vers les basses fréquences qui débute à plus basses températures en présence de CDs. Ce domaine de température, où la bande AI glisse vers les basses fréquences, correspond à la séparation des dimères puis à la transformation de la structure tertiaire vers l'état (MG). Les courbes de dépliements (glissement de la bande AI vers les hautes fréquences) sont nettement décalées (~ 2.5 °C) principalement parce que le dépliement débute à plus basse température en présence de HP β CD, mais l'état (D) est atteint à peu près à la même température pour les deux échantillons. L'étude de la bande AI montre, donc, l'existence d'interactions protéine-HP β CD à température ambiante, et qu'elle n'a pas un effet trop déstabilisateur de la structure secondaire.

TABLEAU 4.7 : Températures distinctives des deux transformations identifiées par spectroscopie Raman. $T_m^{MG}(\text{°C})$: température à demi-transformation de (N) $\rightarrow$ (MG) identifiée via les échanges isotopiques. $T_m^U(\text{°C})$: température à demi-transformation de (MG) $\rightarrow$ (D) où « U » symbolise l'état déplié de la structure secondaire (Unfolded state)

	$T_m^{MG}(\text{°C})$	$T_m^U(\text{°C})$
βLG-W_h	52.5 ± 0.6	76.2 ± 0.4
βLG-W_h-HPβCD	50.3 ± 0.5	74.6 ± 0.4

Il est intéressant d'analyser l'effet de la CD sur les phénomènes d'agrégation via l'étude de la bande AIII-f à 1240 cm^{-1} . La figure 4.12b montre un glissement significatif de cette bande vers les basses fréquences également observé pour le lysozyme, nettement réduit en présence de HP β CD. Les différents comportements sont matérialisés par intégration de l'intensité Raman sur le domaine spectral situé dans le cadre de la figure 4.12b. Les dépendances en température de cette intensité sont reportées sur la figure 4.14 pour les deux échantillons. On observe clairement une discontinuité en absence de CD, indiquant que de nouvelles interactions entre feuillets se forment via des LHs plus fortes que celles existantes. Cette discontinuité est observée à température correspondant à l'état (MG), c'est-à-dire à la température où la fréquence de la bande AI est la plus basse lorsque D₂O est utilisée comme solvant. L'augmentation d'intensité est observée en présence de HP β CD mais de

manière plus réduite et surtout plus graduelle. Compte tenu que les interactions entre feuillets sont considérées comme un facteur favorisant l'agrégation. Le domaine de température dans lequel les nouvelles interactions sont détectées correspond à celui de l'état MG, état reconnu dans la littérature comme étant précurseur à l'agrégation.

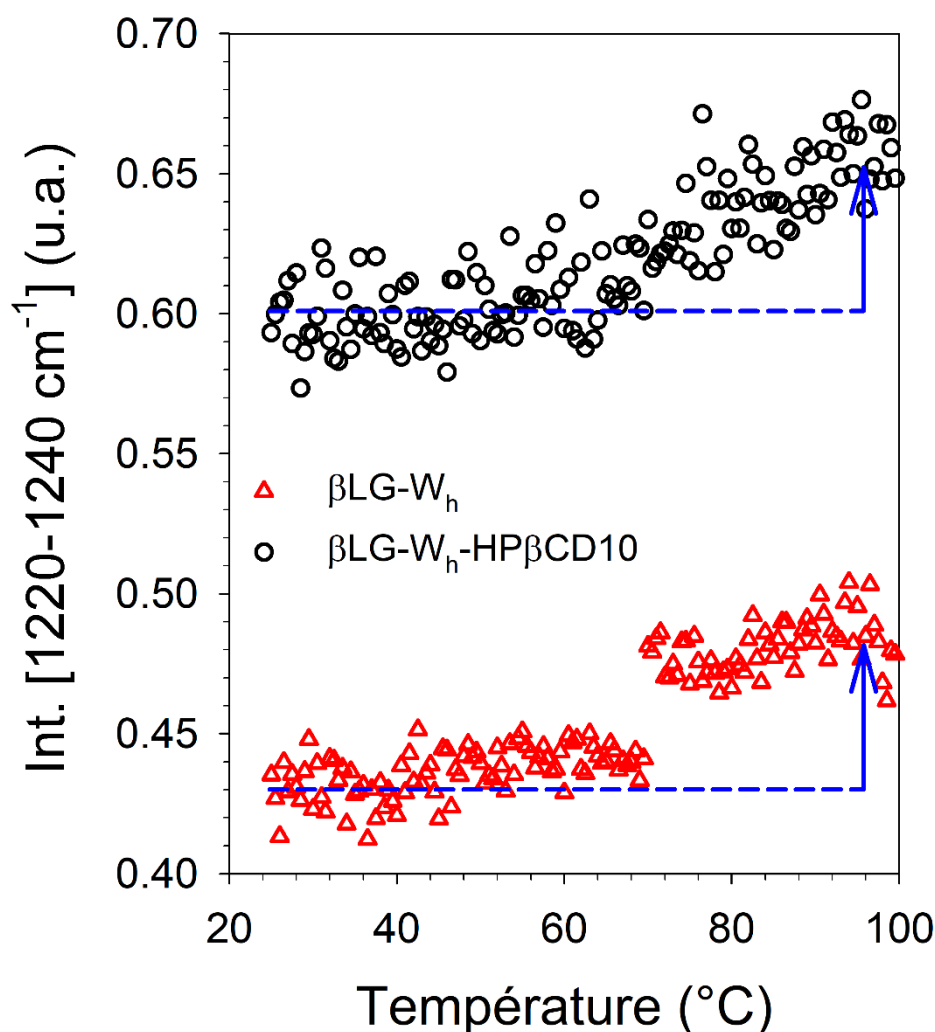


FIGURE 4.14 : Dépendances en température des intensités intégrées déterminées pour les formulations de β LG dissouts dans H_2O en absence de cyclodextrine (β LG- W_h) et en présence de 10 % de HP β CD (β LG- W_h -HP β CD10) dans la zone spectrale 1220-1260 cm^{-1} , où est détectée la bande AIII dans les structures en feuillets β . Les flèches verticales permettent de visualiser l'amplitude de la variation d'intensité. Les traits horizontaux hachés sont des guides pour l'œil afin de visualiser la température à partir de laquelle est détectée une variation significative de l'intensité.

La synthèse des études menées sur deux types de protéines fait ressortir des informations communes. Le principal intérêt de l'ajout de 10 % de HP β CD est de réduire et retarder la formation de nouvelles LHs (fortes) entre feuillets β , et par conséquent de réduire les phénomènes d'agrégation, bien qu'elle déstabilise le

structural supérieur de la protéine (structure tertiaire, ou quaternaire si elle existe). Ce sont probablement des phénomènes de complexation, observés au chauffage dans le cas du lysozyme, qui sont inhibiteurs de formations de LHs entre feuillets et qui limitent la déstabilisation de la structure secondaire.

RÉFÉRENCES

1. Bell, L. N., Hageman, M. J. & Muraoka, L. M. Thermally induced denaturation of lyophilized bovine somatotropin and lysozyme as impacted by moisture and excipients. *J. Pharm. Sci.* **84**, 707–712 (1995).
2. Hédoux, A., Seo, J. A., Guinet, Y. & Paccou, L. Analysis of cold denaturation mechanism of β -lactoglobulin and comparison with thermal denaturation from Raman spectroscopy investigations. *J. Raman Spectrosc.* **43**, 16–23 (2012).
3. Seo, J. A. *et al.* Thermal denaturation of beta-lactoglobulin and stabilization mechanism by trehalose analyzed from Raman spectroscopy investigations. *J. Phys. Chem. B* **114**, 6675–6684 (2010).
4. Hédoux, A. *et al.* Thermostabilization mechanism of bovine serum albumin by trehalose. *J. Phys. Chem. B* **113**, 6119–6126 (2009).
5. Militello, V. *et al.* Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering. *Biophys. Chem.* **107**, 175–187 (2004).
6. Nidhi, K., Indrajeet, S., Khushboo, M., Gauri, K. & Sen, D. J. Hydrotropy: A promising tool for solubility enhancement: A review. *Int. J. Drug Dev. Res.* **3**, 26–33 (2011).
7. Rozema, D. & Gellman, S. H. Artificial chaperone-assisted refolding of denatured-reduced lysozyme: Modulation of the competition between renaturation and aggregation. *Biochemistry* **35**, 15760–15771 (1996).
8. Hédoux, A., Guinet, Y. & Paccou, L. Analysis of the mechanism of lysozyme pressure denaturation from raman spectroscopy investigations, and comparison with thermal denaturation. *J. Phys. Chem. B* **115**, 6740–6748 (2011).
9. Ngarize, S., Herman, H., Adams, A. & Howell, N. Comparison of changes in the secondary structure of unheated, heated, and high-pressure-treated ss-lactoglobulin and ovalbumin proteins using Fourier transform Raman spectroscopy and self-deconvolution. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6470–6477 (2004).
10. Anchordoquy, T. J., Izutsu, K. I., Randolph, T. W. & Carpenter, J. F. Maintenance of quaternary structure in the frozen state stabilizes lactate dehydrogenase during freeze-drying. *Arch. Biochem. Biophys.* **390**, 35–41 (2001).
11. Tavornvipas, S., Hirayama, F., Takeda, S., Arima, H. & Uekama, K. Effects of cyclodextrins on chemically and thermally induced unfolding and aggregation of lysozyme and basic fibroblast growth factor. *J. Pharm. Sci.* **95**, 2722–2729 (2006).
12. Aachmann, F. L., Otzen, D. E., Larsen, K. L. & Wimmer, R. Structural background of cyclodextrin-protein interactions. *Protein Eng* **16**, 905–12 (2003).
13. Serno, T. Inhibition of therapeutic protein aggregation by cyclodextrins. 237 (2010).
14. Tavornvipas, S., Tajiri, S., Hirayama, F., Arima, H. & Uekama, K. Effects of hydrophilic cyclodextrins on aggregation of recombinant human growth hormone. *Pharm. Res.* **21**, 2369–2376 (2004).
15. Szejtli, J. Cyclodextrins. *Drug Investig.* **2**, 11–21 (1990).
16. Serno, T., Geidobler, R. & Winter, G. Protein stabilization by cyclodextrins in the liquid and dried

- state. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 1086–1106 (2011).
17. Lavoine, N., Tabary, N., Desloges, I., Martel, B. & Bras, J. Controlled release of chlorhexidine digluconate using β -cyclodextrin and microfibrillated cellulose. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **121**, 196–205 (2014).
 18. Taha, M. *et al.* Validating the poly-cyclodextrins based local drug delivery system on plasma-sprayed hydroxyapatite coated orthopedic implant with toluidine blue O. *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 2639–2647 (2013).
 19. Blanchemain, N. *et al.* Methyl- β -cyclodextrin modified vascular prosthesis: Influence of the modification level on the drug delivery properties in different media. *Acta Biomater.* **7**, 304–314 (2011).
 20. Otzen, D. & Knudsen, B. Structural basis for cyclodextrins' suppression of human growth hormone aggregation. *Protein ...* 1779–1787 (2002). doi:10.1110/ps.0202702.philic
 21. Rajabzadeh, H. *et al.* Kinetic Stabilization of Lysozyme upon Interactions with beta-Cyclodextrin through Partial Unfolding. *J. Iran. Chem. Soc.* **8**, 553–561 (2011).
 22. Dotsikas, Y. & Loukas, Y. L. Kinetic degradation study of insulin complexed with methyl-beta cyclodextrin. Confirmation of complexation with electrospray mass spectrometry and ¹H NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29**, 487–494 (2002).
 23. Valentini, S. R. *et al.* Insulin complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: Spectroscopic evaluation of molecular inclusion and use of the complex in gel for healing of pressure ulcers. *Int. J. Pharm.* **490**, 229–239 (2015).
 24. Inoue, Y. & Miyata, Y. Formation and Molecular Dynamics of Cycloamylose Inclusion Complexes with Phenylalanine. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **54**, 809–816 (1981).
 25. Belton, P. & Gil, A. M. IR and Raman spectroscopic studies of the interaction of trehalose with hen egg white lysozyme. *Biopolymers* **34**, 957–61 (1994).
 26. Desai, A., Lee, C., Sharma, L. & Sharma, A. Lysozyme refolding with cyclodextrins: structure-activity relationship. *Biochimie* **88**, 1435–1445 (2006).
 27. Pérez-Moral, N., Adnet, C., Noel, T. R. & Parker, R. Characterization of the rate of thermally-induced aggregation of beta-lactoglobulin and its trehalose mixtures in the glass state. *Biomacromolecules* **11**, 2985–2992 (2010).
 28. Hédoux, A. *et al.* Evidence of a two-stage thermal denaturation process in lysozyme: A Raman scattering and differential scanning calorimetry investigation. *J. Chem. Phys.* **124**, (2006).
 29. Zhao, W. & Yang, R. Experimental study on conformational changes of lysozyme in solution induced by pulsed electric field and thermal stresses. *J. Phys. Chem. B* **114**, 503–510 (2010).
 30. Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q. & Wan, X. Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **78**, 1187–1195 (2011).
 31. Miura, T., Takeuchi, H. & Harada, I. Characterization of individual tryptophan side chains in proteins using Raman spectroscopy and hydrogen-deuterium exchange kinetics. *Biochemistry* **27**, 88–94 (1988).
 32. Iwai, J. *et al.* Effects of various cyclodextrins on the stability of freeze-dried lactate dehydrogenase. *J. Pharm. Sci.* **96**, 3140–3143 (2007).
 33. Izutsu, K., Yoshioka, S. & Terao, T. Stabilizing Effect of Amphiphilic Excipients on the Freeze-Thawing and Freeze-Drying of Lactate Dehydrogenase. *Biotechnol. and Bioengineering*. **43**,

- 1102–1107 (1994).
34. Yoshida, A., Arima, H., Uekama, K. & Pitha, J. Pharmaceutical evaluation of hydroxyalkyl ethers of β -cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **46**, 217–222 (1988).
 35. Izutsu, K. & Kojima, S. Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying. *J. Pharm. Pharmacol.* **54**, 1033–1039 (2002).
 36. Wang, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **203**, 1–60 (2000).
 37. Chefson, A., Zhao, J. & Auclair, K. Sugar-mediated lyoprotection of purified human CYP3A4 and CYP2D6. *J. Biotechnol.* **130**, 436–440 (2007).
 38. Millqvist-Fureby, A., Malmsten, M. & Bergenståhl, B. Spray-drying of trypsin - Surface characterisation and activity preservation. *Int. J. Pharm.* **188**, 243–253 (1999).
 39. Barba, C., Eguinoa, A. & Maté, J. I. Preparation and characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes as a tool of a controlled antimicrobial release in whey protein edible films. *LWT - Food Sci. Technol.* **64**, 1362–1369 (2015).
 40. Brewster, M. E., Hora, M. S., Simpkins, J. W. & Bodor, N. Use of 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a Solubilizing and Stabilizing Excipient for Protein Drugs. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* **8**, 792–795 (1991).
 41. Takeuchi, H. & Harada, I. Normal coordinate analysis of the indole ring. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **42**, 1069–1078 (1986).
 42. Milan-Garces, E. A., Kaptan, S. & Puranik, M. Mode-specific reorganization energies and ultrafast solvation dynamics of tryptophan from Raman line-shape analysis. *Biophys. J.* **105**, 211–221 (2013).
 43. Unno, M., Kikuchi, S. & Masuda, S. Structural refinement of a key tryptophan residue in the BLUF photoreceptor AppA by ultraviolet resonance raman spectroscopy. *Biophys. J.* **98**, 1949–1956 (2010).
 44. Siamwiza, M., Lord, R. & Chen, M. Interpretation of the doublet at 850 and 830 cm^{-1} in the Raman spectra of tyrosyl residues in proteins and certain model compounds. *Biochemistry* **14**, 4870–4876 (1975).
 45. Couling, V. W., Fischer, P., Klenerman, D. & Huber, W. Ultraviolet resonance Raman study of drug binding in dihydrofolate reductase, gyrase, and catechol O-methyltransferase. *Biophys. J.* **75**, 1097–106 (1998).
 46. Combs, A. *et al.* Raman signature of the non-hydrogen-bonded tryptophan side chain in proteins: Experimental and ab initio spectra of 3-methylindole in the gas phase. *J. Mol. Struct.* **735–736**, 271–278 (2005).
 47. Herrero, A. M., Carmona, P., Jimenez-Colmenero, F. & Ruiz-Capillas, C. Applications of Vibrational Spectroscopy to Study Protein Structural Changes in Muscle and Meat Batter Systems. *Handb. Vib. Spectrosc.* 315–328 (2010). doi:10.1002/9780470027325.s8949.
 48. van Stokkum, I. H. *et al.* Temperature-induced changes in protein structures studied by Fourier transform infrared spectroscopy and global analysis. *Biochemistry* **34**, 10508–18 (1995).
 49. Hédoux, A., Paccou, L. & Guinet, Y. Relationship between β -relaxation and structural stability of lysozyme: Microscopic insight on thermostabilization mechanism by trehalose from Raman spectroscopy experiments. *J. Chem. Phys.* **140**, (2014).

50. Seo, J. A. *et al.* Thermal denaturation of beta-lactoglobulin and stabilization mechanism by trehalose analyzed from Raman spectroscopy investigations. *J. Phys. Chem. B* **114**, 6675–6684 (2010).
51. Matsubara, K., Irie, T. & Uekama, K. Spectroscopic characterization of the inclusion complex of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist, buserelin acetate, with dimethyl-beta-cyclodextrin. *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 378–383 (1997).
52. Davis, M. E. & Brewster, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 1023–1035 (2004).

CONCLUSION GENERALE

Le travail présenté dans ce mémoire représente une contribution à la compréhension des mécanismes de dénaturation et de stabilisation des protéines soumises à différents types de stress. Le développement des biomédicaments à base de protéines recombinantes, nécessitent souvent le recours à la lyophilisation pendant laquelle plusieurs contraintes s'exercent sur la protéine induisant une perte de ses fonctions. Les études ont focalisé sur des agents bio-protecteurs à base de disaccharides, dont les mécanismes de préservation ont été largement étudiés sur des protéines modèles en solution. Les mécanismes de bioprotection liés à la lyophilisation sont par contre beaucoup moins étudiés, faute d'outils adaptés à l'analyse de la protéine pendant les procédures de lyophilisation. Ainsi, il a été mis en évidence qu'une faible quantité de glycérol ajouté au tréhalose améliorait de manière significative les propriétés bioprotectrices du disaccharide, sans toutefois comprendre comment le glycérol influence les propriétés du tréhalose. En effet, les études menées dans ce but, n'ont été réalisées qu'à la fin de la procédure de lyophilisation, et souvent sur des systèmes ne contenant pas de protéine, ne donnant ainsi qu'une idée approximative des mécanismes impliqués dans l'action du glycérol.

Un premier objectif a consisté à comprendre les mécanismes par lesquels une faible quantité de glycérol exacerbe l'effet bio-protecteur du disaccharide pendant une procédure de lyophilisation. La réalisation d'analyses Raman *in-situ* pendant une procédure de lyophilisation a permis de décrire précisément l'influence du glycérol sur l'effet bioprotecteur du tréhalose pendant les trois étapes de la lyophilisation. Il a été mis en évidence que le glycérol réduisait d'abord l'efficacité du tréhalose, pendant l'étape de séchage primaire, avant de l'améliorer pendant le séchage secondaire. C'est donc l'ensemble de ces effets séquentiels du glycérol sur les propriétés bioprotectrices du tréhalose, inobservés jusqu'à maintenant, qui a permis d'arriver à une description fine de son mécanisme d'action. Le principal résultat a été de montrer, que malgré son effet plastifiant sur la matrice eau-disaccharide (due à sa faible valeur de T_g), le glycérol participait à la rigidification de la matrice hôte vitreuse en renforçant les liaisons H intermoléculaires.

L'étude réalisée de manière conjointe sur le sucrose et le tréhalose, a montré que l'effet du glycérol sur les propriétés bioprotectrices du disaccharide était plus important dans le cas du tréhalose, mais que le système sucrose-glycérol était légèrement meilleur bio-protecteur que le mélange tréhalose-glycérol lors d'un cycle de lyophilisation. Ces études ont également permis de mieux décrypter les mécanismes impliqués dans la préservation des protéines pendant une lyophilisation. Un résultat important qui se dégage est que l'efficacité bioprotectrice des disaccharides pendant une lyophilisation résulte de la combinaison de deux effets. Les propriétés physiques intrinsèques au disaccharide liées à sa vitrification (valeur de T_g) ont un rôle important, mais elles doivent être combinées avec la capacité du disaccharide à former des liaisons H avec l'eau en solution et à renforcer son réseau de liaisons H, donnant ainsi la rigidité nécessaire à la matrice hôte vitreuse pour préserver la conformation de la protéine.

Il existe des produits biopharmaceutiques, tels que certains vaccins, qui sont conservés en solution jusqu'à leur administration chez le patient. Maintenir leur fonction active, nécessite souvent de les placer dans des conditions de température (souvent à température assez basse, $\sim 4 - 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) qui alourdissent le coût du transport et donc du traitement. La recherche d'agents bio-protecteurs efficaces en solution pour réduire les phénomènes de dénaturation et d'agrégation d'une protéine en solution est donc très importante. Un second objectif de la thèse a été d'initier une étude visant à explorer les capacités bioprotectrices des molécules de la famille des cyclodextrines. Certaines de ces molécules présentent la propriété de complexer une partie de protéine et donc de pouvoir être utilisées comme système à libération contrôlée. Combiner à la fois stabilisation et libération contrôlée d'une protéine présente un intérêt important et original. Le travail présenté dans cette thèse a été focalisé sur un dérivé de la β -CD (HP β CD) dont les dimensions de cavité semblent les mieux adaptés au phénomène de complexation. Les résultats obtenus sont originaux par rapport à ceux reportés dans la littérature. Ils montrent en particulier que la CD peut déstabiliser ou stabiliser la protéine lors de la dénaturation chaude suivant la vitesse de chauffage de la solution. Une vitesse de chauffage lente favoriserait le phénomène de complexation par rapport à un chauffage rapide. De même, un cycle de lyophilisation amplifierait la complexation, dans la mesure où la protéine serait plus stable lors du

chauffage d'un lyophilisat réhydraté, que lorsqu'une solution de poudre fraîche de protéine en présence de HP β CD est chauffée.

Les perspectives à ces travaux peuvent se décliner en fonction des deux types d'études développées dans le cadre de cette thèse. Concernant l'amélioration de la stabilité des protéines pendant les procédures de lyophilisation, des analyses plus fines devraient être réalisées pendant l'étape de congélation, sachant que celle-ci conditionne non seulement le mode opératoire du reste du cycle (en particulier la durée de la cinétique de sublimation, mais aussi les caractéristiques physiques du lyophilisat, etc), mais aussi les distributions des espèces chimiques qui composent la formulation. Le vieillissement des états congelés, largement étudié pour optimiser la taille et la distribution des cristaux de glace, est certainement porteur d'informations importantes sur la stabilité des protéines et reste un domaine relativement inexploré dans cet objectif. L'influence d'autres systèmes bio-protecteurs, telles que les molécules de la famille des polyols, les cyclodextrines seront étudiées. Cette dernière classe de molécules, devrait faire l'objet d'investigations plus larges, à la fois :

- au niveau du choix des conditions expérimentales : analyse de leur effet bio-protecteur pendant la lyophilisation (pour différentes concentrations de CD, sur différents types de protéines), et pendant différentes procédures de chauffage de solutions de protéines (vitesses de chauffe, concentrations en CD variables)
- et au niveau des différentes classes et dérivés de CDs.

Des perspectives englobant les différents aspects étudiés dans cette thèse, consisteraient à optimiser des systèmes qui permettent à la fois la stabilisation des protéines et leur libération contrôlée, ce qui aurait un effet crucial sur le coût du traitement thérapeutique. Dans ce contexte, les matrices poreuses à base de silice, pourraient être des systèmes à la fois utilisés comme des nano-containers stabilisant les protéines et comme des systèmes à libération contrôlée en sélectionnant des enrobages adaptés au type de libération.