



HAL
open science

Etude des mécanismes d'interaction entre des porphyrines dendrimériques et des membranes de cellules tumorales : validation d'un modèle artificiel par une approche cellulaire

Katia Daghildjian

► **To cite this version:**

Katia Daghildjian. Etude des mécanismes d'interaction entre des porphyrines dendrimériques et des membranes de cellules tumorales : validation d'un modèle artificiel par une approche cellulaire. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA114842 . tel-01085689

HAL Id: tel-01085689

<https://theses.hal.science/tel-01085689>

Submitted on 21 Nov 2014

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE : PHARMACOTECHNIE ET BIOPHARMACIE

ANNÉE 2013 - 2014

SÉRIE DOCTORAT N° 1252

THÈSE DE DOCTORAT

par

Katia DAGHILDJIAN

Soutenue le 06/12/2013

Etude des mécanismes d'interaction entre des porphyrines dendrimériques et des membranes de cellules tumorales: validation d'un modèle artificiel par une approche cellulaire

Directeur de thèse : Pr Véronique ROSILIO

Composition du jury :

Rapporteurs : Dr Patricia Vicendo
Dr Marcel Garcia
Examineurs : Dr Nathalie Cassoux
Dr Philippe Maillard
Dr Jean-Philippe Michel

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Monsieur le Professeur Elias Fattal, directeur de l'Institut Galien (UMR CNRS 8612) pour m'avoir accueillie dans son son laboratoire.

Je remercie respectueusement madame le Docteur Patricia Vicendo, Directeur de Recherche au CNRS (à l'IRCM) et, le Docteur Marcel Garcia, Directeur de Recherche à l'INSERM (IBMM) d'avoir accepté de rapporter ce travail. Je remercie également le Docteur Nathalie Cassoux, médecin à l'Institut Curie, et le Docteur Philippe Maillard, Directeur de Recherche à l'Institut Curie de participer à ce jury en qualité d'examineurs.

Je remercie sincèrement Véronique Rosilio, Professeur à l'Université Paris-Sud, tout d'abord pour avoir accepté de diriger ma thèse mais aussi pour son aide et son soutien précieux. J'ai beaucoup appris à vos côtés, vos conseils scientifiques ont été très enrichissants et nos échanges resteront de très bons moments.

Merci également à Jean-Philippe Michel, maître de conférences à l'Université Paris Sud, pour avoir pris part à ce travail et m'avoir aidée pendant ces trois années.

Je remercie également les personnes de mon équipe, tout particulièrement le Docteur Elisabeth Briand, qui est avant tout une amie. Ton aide constante et ton soutien sans faille m'ont permis d'arriver jusque ici. Merci de t'être occupée de moi, autant au bureau qu'à l'extérieur, les vacances avec Arnaud et Gabriel ont été une parenthèse inoubliable. Je remercie aussi les Docteurs Catherine Ringard et Michel Deyme ainsi que David Chapron. J'ai également une pensée pour le Docteur Ali Makky qui m'a formée.

Je remercie aussi les personnes de l'équipe « Physico-Chimie des Systèmes Polyphasés ». A mon ami le Docteur François-Xavier Legrand, merci pour tout ce que tu as pu m'apprendre sur le plan scientifique, tu es une ressource inépuisable et passionnée, et sur le plan culinaire ! Je remercie également mes collègues devenues amies Elise, Floriane et Hélène, pour les repas partagés ensemble, les sorties et leur soutien ainsi que les Docteurs Claudie Bourgaux et Vincent Faivre qui m'ont énormément supportée. Enfin je remercie le Docteur Benoit Hilbold et Leila pour les bons moments partagés ensemble.

J'ai eu la chance immense pendant ces trois ans de côtoyer et de collaborer avec un grand nombre de personnes et je souhaite toutes les remercier pour m'avoir formée et énormément aidée.

Je remercie donc Sonia Abreu (nos conversations passionnantes pendant les expériences me manquent beaucoup !), le Docteur Danielle Libong et Monsieur le Professeur Pierre Chaminade pour m'avoir accueillie si chaleureusement dans l'unité 4041. Je remercie également le Docteur Audrey Solgadi (ma partenaire dans la virée toulousaine entre « lipidomistes ») et Stéphanie Nicolaÿ de la plateforme SAMM. Je garde d'excellents souvenirs de l'analyse lipidomique grâce à vous.

Je remercie également le Docteur Hélène Gary et Hugo Tharinger de la plateforme Plaimmo

pour leur accueil et leur gentillesse. Merci à Hugo pour m'avoir aidée, formée et supportée ; ce qui devait être une expérience ponctuelle s'est transformé en véritable épopée, et au final, pas un kobs à l'horizon ! Merci également à Mehdi Ellouze pour son aide autant diurne que nocturne. Grâce à vous tous, j'ai appris les joies de la cytométrie dans la bonne humeur. Je tiens également à remercier Céline Boursier de la plateforme Trans-Prot pour sa gentillesse et son aide. Un grand merci au Docteur Juliette Vergnaud, pour ses conseils si précieux, pour la qualité de nos échanges scientifiques et pour tous les moments très agréables passés en sa compagnie. Merci aussi à Stéphanie Denis, en culture cellulaire pour sa gentillesse et sa disponibilité. Je remercie également le Docteur Athena Kasselouri pour son aide en spectrométrie de fluorescence.

Je remercie toutes les personnes rencontrées pendant cette thèse : les Docteurs Hervé Hillaireau, Sinda Lepêtre, Amélie Bochot, Kawthar Bouchemal et le Professeur Karine Andrieux avec qui j'ai eu la chance de partager mes heures d'enseignements, mes amies « thésardes » et monitrices Nadège (pour tous les fous rires partagés), Ludivine, Giovanna et Naila et tous mes collègues de thèses Chantal, Bénédicte, Felix ... et tout ceux que je ne peux citer ici !

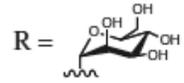
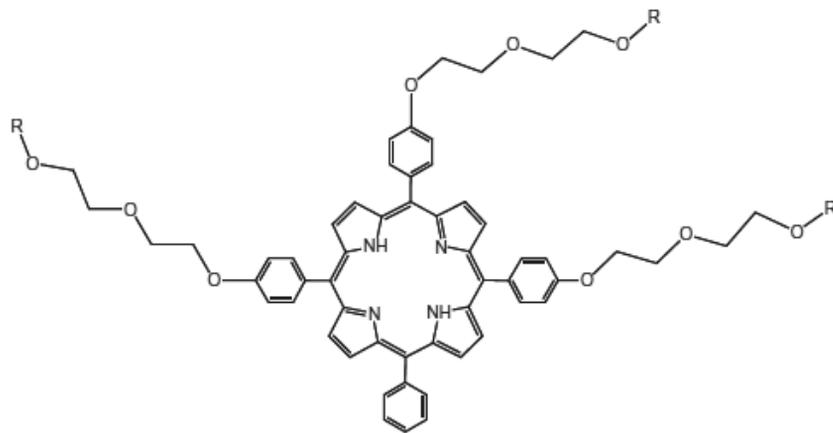
Un grand merci à mes amies pour leur compréhension et leur soutien : Marie, qui aura supporté ces 9 ans d'études et de stress, Mounia (du laboratoire à une complicité et une amitié sans faille, il n'y avait qu'un pas), Lorinne, Vanessa et Margaux. Je remercie aussi chaleureusement mes amis Paul, Vahé, Benjamin-Lionel (pour sa tartiflette si légère) et Quentin ainsi que Guillaume, Aurélien et Julie (et les sushis !).

Je remercie tout particulièrement « les Teyan » : Nicolas pour son support, son immense patience et son aide tant sur le plan personnel qu'infographique, mais aussi Laura et Stéphanie.

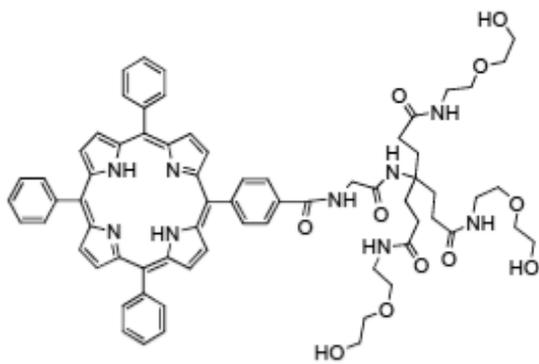
Enfin, je remercie de tout cœur mes parents, pour l'amour et le soutien inconditionnel qu'ils m'offrent chaque jour et ma grand-mère pour tout ce qu'elle a fait pour moi. Je n'en suis là que grâce à vous...

Je tiens à dédier cette thèse à mon grand-père qui aurait sûrement été très heureux d'assister à ce jour.

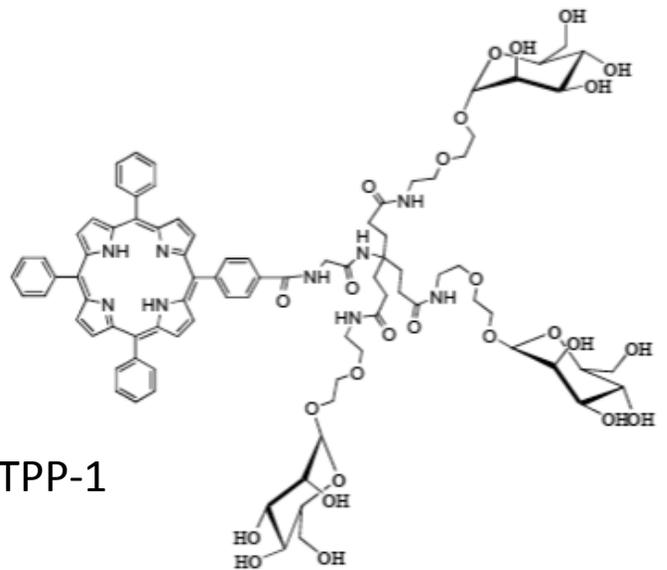
Porphyrines étudiées



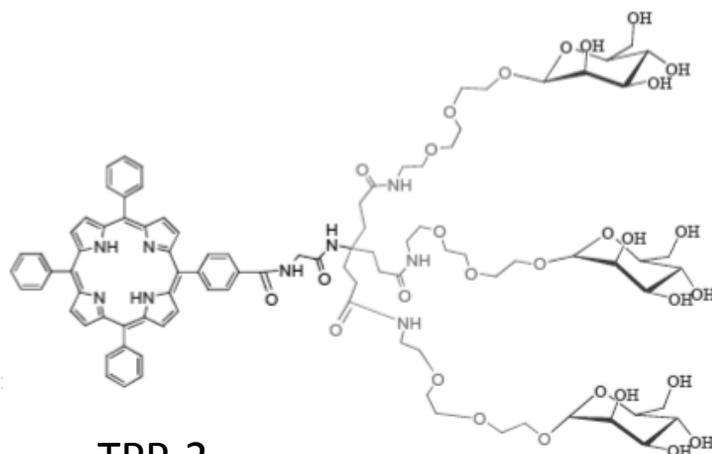
TPP-(DegMan)₃



TPP-1c



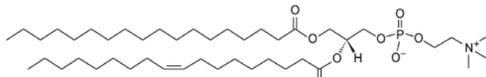
TPP-1



TPP-2

Lipides

PC



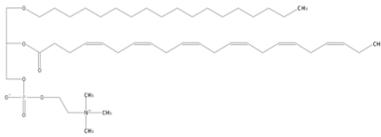
18:0-18:1 PC

1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (SOPC)



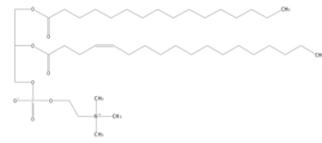
16:0-22:6 PC

1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine



18:0-22:6 alkyl PC

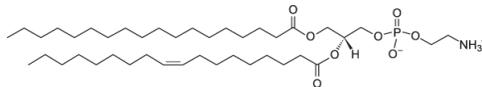
1-octadecanoyl-2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine



16:0-18:1 PC

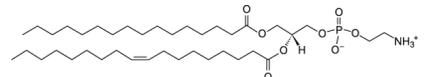
1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

PE



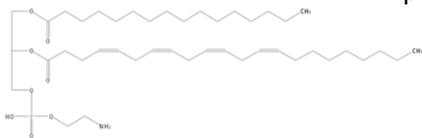
18:0-18:1 PE

1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (SOPE)



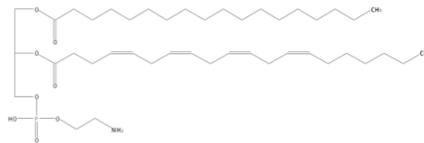
16:0-18:1 PE

1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine



16:0-22:4 PE

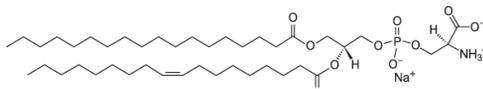
1-palmitoyl-2-adrenoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine



18:0-20:4 PE

1-stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

PS



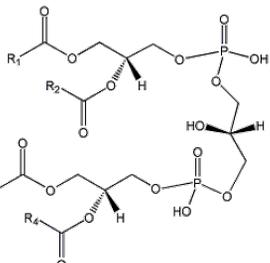
18:0-18:1 PS

1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (SOPS)

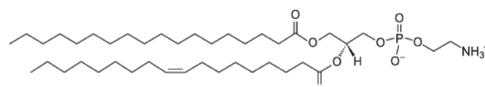


18:0-22:6 PS

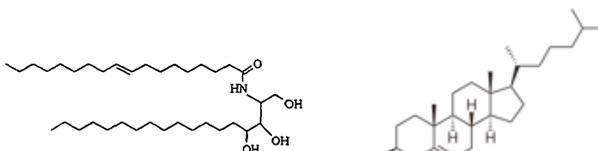
1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine



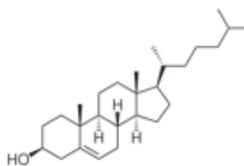
Cardiolipine



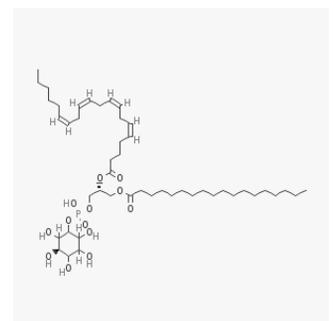
Sphingomyéline (SM)



Ceramide IIIb (Cer IIIb)



Cholestérol (Chol)



18:0-20:4 PI

1-stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphoinositol

Sommaire	Page 1
Table des abréviations	5
Introduction générale	7
<u>Partie bibliographique</u>	
A. La thérapie photodynamique	13
A.1. Historique	13
A.2. Principe de la PDT	13
A.3. Les différentes familles de photosensibilisateurs	16
A.3.1. La première génération de PS	17
A.3.2. La deuxième génération de PS	17
A. 3. 3 La troisième génération de PS	17
B. Les différentes porphyrines étudiées dans le traitement du rétinoblastome	23
B.1. Le rétinoblastome	23
B.2. Les porphyrines glycoconjuguées	24
C. Discriminer les deux types de transport des porphyrines glycoconjuguées	28
C.1 Culture cellulaire	28
C.2 Cytométrie en flux	30
C.3 Autres techniques d'études	31
D. Les modèles membranaires	32
D.1 Composition des membranes cellulaires de mammifères et altérations lors du processus de cancérisation	32
D.2. Les systèmes moléculaires organisés	36
D.3. Principales techniques d'étude des systèmes moléculaires organisés	38
D.3.1. Etude des monocouches par mesure de tension/pression superficielle	38
D.3.2. Etude des liposomes par mesure de leur taille et de leur potentiel Zêta	39
D.3.3. L'étude des bicouches planes par QCM-D	40
D.4. Etablissement d'un modèle membranaire du rétinoblastome	43
D.4.1. Etude avec des modèles simples	43
D.4.1.1. Influence des caractéristiques physico-chimiques des PS sur les interactions avec des modèles simples	43
D.4.1.2. Influence de la fluidité membranaire sur la pénétration et la distribution des PS au sein des membranes	44
D.4.2. Elaboration d'un modèle complexe	45
D.4.2.1. Mise en évidence des interactions non spécifiques	46
D.4.2.2. Modèle membranaire du rétinoblastome greffé avec une lectine	48
D.4.2.2.1. Elaboration du nouveau modèle	48
D.4.2.2.2. Etude des porphyrines dendrimériques avec le nouveau modèle : mise en évidence des interactions spécifiques	49

D.4.2.2.3. Comment valider le modèle ?	50
D.4.2.2.3.1. Interactions spécifiques : identifier les récepteurs surexprimés à la surface des cellules de rétinoblastome	50
D.4.2.2.3.2. Interactions non spécifiques : valider la composition lipidique	55
E. La lipidomique	57

Première partie : culture cellulaire et QCM-D

A. Introduction	72
B. Matériel et méthodes	73
B.1. Conditions de culture cellulaire	73
B.1.1 Cellules Y79	73
B.1.2 Cellules HT 29	73
B.1.3 Test de cytotoxicité et de phototoxicité	74
B.1.4 Liposomes pour culture cellulaire et expérience de QCM-D	76
B.2. Expériences sur microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation (QCM-D)	77
B.2.1 Conditions de travail	77
B.2.2 Formation de la couche de poly-L-lysine (PLL)	77
C. Résultats et discussion	78
C.1 Cytotoxicité et phototoxicité des dérivés porphyriniques libres	78
C.1.1 La référence TPP-(DegMan) ₃	78
C.1.2 Porphyrines dendrimériques	79
C.2. Cytotoxicité et phototoxicité des porphyrines dendrimériques incorporées dans des liposomes de DMPC	82
C.2.1. Cytotoxicité de la DMPC seule	82
C.2.2. Cytotoxicité et phototoxicité des porphyrines dendrimériques sous forme vectorisée	83
C.2.3. Influence du milieu de culture sur les liposomes de DMPC	84
C.3. QCM-D	85
C.3.1. Formation de la couche de poly-L-lysine (PLL)	85
C.3.2. Dépôt des cellules Y79	87
C.3.3. Interaction des liposomes incorporant les porphyrines dendrimériques avec les cellules Y79	90

Deuxième partie : Etude de la capture cellulaire des dérivés porphyriniques par cytométrie en flux

Chapitre 1 : Evaluation des propriétés spectrales des porphyrines par spectrofluorimétrie

A. Introduction	97
B. Matériel et méthode	99
B.1 Solutions de dérivés porphyriniques	99
B.2. Caractéristiques de l'appareil et conditions d'études	100
C. Résultats et discussion	101
C.1. Fluorescence des dérivés porphyriniques dans le méthanol	101

C.2. Fluorescence des dérivés porphyriniques porphyrines en milieu aqueux	103
C.2.1. Spectres du DMSO seul dans du DPBS (blanc)	103
C.2.2. Spectres de fluorescence des dérivés porphyriniques en milieu aqueux (DPBS) à 22°C	104
C.2.3. Spectres de fluorescence des dérivés porphyriniques en milieu aqueux (DPBS) à 4°C	108
Chapitre 2 : Evaluation du mode de capture des dérivés porphyriniques par cytométrie en flux	
A. Introduction	111
B. Matériel et méthodes	112
B.1 Culture cellulaire	112
B.2. Dérivés porphyriniques libres ou incorporés dans des liposomes de DMPC	112
B.3. Etude des microparticules en cytométrie en flux	113
B.4. Principe de l'étude en cinétique par cytométrie en flux	114
C. Résultats	
C.1 TPP-1 et TPP-2	117
C.2 TPP-1c	122
C.3 TPP-(DegMan) ₃	123
<u>Troisième partie : Analyse lipidomique</u>	
A. Introduction	126
B. Matériel et méthodes	127
B.1 Extraction des lipides des membranes de cellules de rétinoblastome Y79 et de xénotreffes Rb 102 et Rb 200	127
B.1.1 Choix de la méthode	127
B.1.2. Protocole adapté à notre étude	128
B.1.3. Adaptation de la méthode à l'extraction des lipides à partir de xénotreffes	129
B.2. Séparation des membranes cellulaires par centrifugation différentielle	129
B.3. Analyse des échantillons en LC-DEDL (Chromatographie Liquide couplée à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière)	131
B.3.1. Conditions opératoires	131
B.3.2. Réalisation des expériences	132
B.3.3. Identification des lipides et reproductibilité des échantillons en LC-DEDL	132
B.4. Analyse des échantillons en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) et en infusion de masse	134
B.4.1. Etude des phospholipides	134
B.4.2. Etude des céramides	134
B.5. Analyse des échantillons en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)	135
B.5.1. Conditions opératoires	135
B.5.2. Réalisation des expériences	136
B.6. Etude du comportement interfacial des différents lipides membranaires extraits à l'interface air-liquide	137
B.6.1. Balance de Langmuir	137

B.6.2. Microscopie à angle de Brewster (Brewster Angle Microscopy, BAM)	139
C. Résultats	139
C.1. Identification et quantification des lipides présents dans les membranes cellulaires de Y79 et de xénogreffes Rb 102 et Rb 200	139
C.2. Validation de l'identification des lipides par LC-MS et infusion de masse	
Hypothèses sur la longueur des chaînes d'acides gras portés par les phospholipides	143
C.2.1. LC-MS mode négatif	144
C.2.1.1. Validation des phospholipides présents dans les membranes cellulaires par infusion de masse	147
C.2.1.1.1. Phosphatidyléthanolamine (PE)	148
C.2.1.1.2. Phosphatidylsérine (PS)	150
C.2.1.1.3. Phosphatidylinositol (PI)	150
C.2.1.1.4. Phosphatidylcholine (PC)	151
C.2.1.2. Analyse des pics non identifiés (NI)	153
C.3. Identification des lipides des différentes membranes cellulaires	157
C.4. Analyse du comportement interfacial des extraits de lipides et formulation d'un nouveau modèle artificiel	160
C.4.1. Comportement interfacial des extraits lipidiques totaux	160
C.4.2. Comportement interfacial des extraits lipidiques issus du fractionnement des membranes des cellules Y79	163
C.4.3. Formulation d'un nouveau modèle artificiel	164
Discussion générale	168
Conclusion générale	178
Annexe : analyse lipidomique	180

Liste des abréviations

PS Photosensibilisateurs
PDT Photodynamic therapy ou photothérapie dynamique
QCM-D Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring
BAM Brewster Angle Microscope
SPR Surface Plasmon Resonance (Biacore®)
DSC Differential Scanning Calorimetry
DLS Diffusion Quasi-élastique de la lumière
 π Pression de surface
 ζ Potentiel Zêta
 K_{\max} Module de compressibilité maximal
 λ_{em} Longueur d'onde d'émission
 λ_{ex} Longueur d'onde d'excitation
TPP Tetraphenylporphyrine
Con A Concanavaline A
DMPC Dimyristoylphosphatidylcholine
DSPC 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
DAPC 1,2-diarachidoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
SOPC 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine
SOPE 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine
SOPS 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylsérine
DHAPC 1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
Chol Cholestérol
MEG Monoéthylèneglycol
DEG Diéthylèneglycol
TEG Triéthylèneglycol
SVF Sérum de veau foetal
PBS Phosphate buffered saline
HEPES Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
SSC-A Side-scattered light-Area
FSC-A Forward-scattered light-Area
SSC-W Side-scattered light-Width
SSC-H Side-scattered light-Height

Introduction générale

La thérapie photodynamique (PDT) constitue une approche prometteuse pour le traitement de tumeurs cancéreuses accessibles à la lumière. Son principe repose sur l'action combinée d'un photosensibilisateur (PS) administré par voie intraveineuse qui se localise de manière spécifique dans les tissus cibles, et de l'illumination de ces derniers par un laser de longueur d'onde définie, correspondant à la bande d'absorption du PS. La molécule illuminée se met alors à produire des espèces réactives de l'oxygène comme l'oxygène singulet, particulièrement cytotoxique. La demi-vie de l'oxygène singulet ainsi que son rayon d'action étant très courts, le photosensibilisateur, pour être efficace, doit se localiser à l'intérieur des cellules ciblées. La PDT est actuellement en plein essor, ses applications étant de plus en plus nombreuses, principalement en oncologie.

Le rétinoblastome est le cancer le plus fréquent chez le jeune enfant (3 à 4 % des cancers pédiatriques dans les pays développés, soit 1/20 000 naissances) (Mac Carthy et al. 2006). Les traitements actuels pour supprimer cette tumeur sont des chimiothérapies, déconseillées pour les enfants à cause du risque de cancers secondaires qu'elles génèrent et, dans certains cas, la chirurgie (énucléation) avec son caractère mutilant et irréversible. La PDT apparaît comme une alternative intéressante. Elle nécessite le développement de nouveaux photosensibilisateurs dont la structure est mieux adaptée aux spécificités des cellules du rétinoblastome. A l'institut Curie d'Orsay, l'équipe de Philippe Maillard a synthétisé plusieurs séries de dérivés porphyriniques destinés au ciblage spécifique de ce cancer. Ces molécules sont constituées d'un macrocycle tétrapyrrolique et de sucres, pouvant être reconnus par des récepteurs aux sucres surexprimés à la surface de ces cellules (Griegel et al. 1989). Les sucres contribuent également à l'augmentation de l'hydrophilie des molécules dans le but de réduire leur agrégation en milieu aqueux et de favoriser leur pénétration intracellulaire. La molécule la plus efficace synthétisée à ce jour est la TPP-(DegMan)₃ (figure 1a). Les porphyrines sur lesquelles nous avons plus particulièrement travaillé dans le cadre de cette thèse ont une structure dendrimérique pour amplifier le caractère amphiphile en créant simultanément un cluster de sucres (Figure 1b). Cette structure pourrait favoriser la reconnaissance de ces molécules par les récepteurs membranaires.

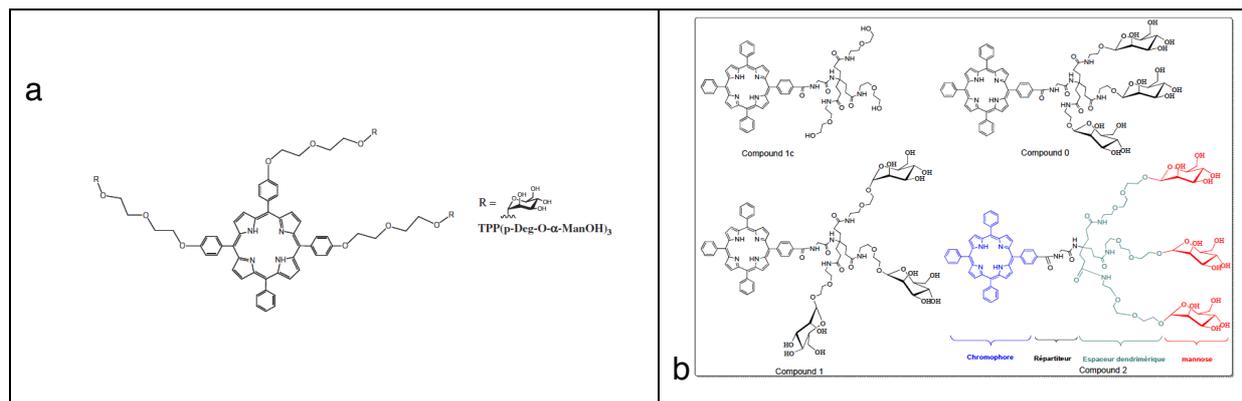


Figure 1 : structure chimique (a) de la porphyrine triglycoconjuguée TPP-(DegMan)₃ (b) des porphyrines glycodendrimériques.

Les méthodes analytiques classiques d'évaluation *in vitro* du passage membranaire, comme la détermination du coefficient de partage (log P) ou de la constante d'ionisation (pKa) sont insuffisantes pour prédire avec exactitude le processus de passage transmembranaire d'une molécule. Kepczynski et al. (2002) ont montré l'utilisation possible mais aussi les limitations de ces paramètres pour la prédiction de l'affinité membranaire. De leur côté, les études menées *in vivo* ou même *in vitro* sur cultures cellulaires sont longues et coûteuses et ne donnent des informations qu'*a posteriori* sur le mécanisme prédominant du transfert intracellulaire.

L'élaboration et la caractérisation de modèles membranaires, formés à partir des constituants de base des membranes naturelles, tels que lipides et protéines, permettent une étude à l'échelle moléculaire des interactions entre une substance active et une membrane cellulaire cible, et constitueraient un réel progrès dans le domaine de la formulation. Pour cela, il faut se replacer dans des conditions qui se rapprochent le plus possible de celles du vivant, c'est-à-dire mimer la composition et la structure de la membrane avec laquelle la substance active doit interagir et avoir une bonne connaissance des propriétés physico-chimiques à la fois du modèle membranaire et des principes actifs à étudier. Dans notre laboratoire, nous avons élaboré un modèle membranaire de rétinoblastome composé de 3 phospholipides (SOPC, SOPE, SOPS) et de cholestérol à des concentrations de 10 à 30% (mol/mol), inspiré de la composition membranaire proposée par Fliesler et Anderson, (1983) pour les membranes rétinienne saines adultes. Ce modèle a été complété

par le greffage d'une lectine modèle, la concanavaleine A (Con A), mimant un récepteur à mannose présent à la surface des cellules, mais non encore identifié au moment où le travail a été entrepris (Makky et al. 2010a et 2010b). Le modèle a été décliné sous forme de monocouches, liposomes et bicouches planes supportées, permettant d'utiliser des méthodes de caractérisation des interactions porphyrine-membrane variées et complémentaires (Ballut et al. 2009, Makky et al. 2010a et 2011).

Les études physico-chimiques réalisées par Ali Makky dans le cadre de sa thèse (2010) ont permis d'évaluer la capacité des différentes porphyrines à pénétrer de manière passive dans la membrane modèle, et de mettre en évidence une interaction spécifique entre les dérivés glycodendrimériques et la Con A.

L'objectif de la présente thèse était double: (a) évaluer la pertinence du modèle précédemment établi, en réalisant une étude sur culture cellulaire permettant de distinguer le transport passif du transport médié et (b) poursuivre l'amélioration du modèle membranaire, en déterminant la composition des membranes de cellules du rétinoblastomes par une analyse lipidomique.

Nous avons donc tout d'abord entrepris de comparer les résultats précédemment obtenus avec le modèle membranaire avec ceux issus de la culture cellulaire classique. Puis, nous avons réalisé une expérience physico-chimique innovante afin de collecter des informations rapides sur les interactions spécifiques entre cellules et molécules en utilisant une microbalance à cristal de quartz (QCM-D). Enfin, nous avons approfondi l'approche biologique par des études de cytométrie en flux qui nous ont permis d'étudier la capture des porphyrines par les cellules et de caractériser plus précisément le mécanisme de transport mis en œuvre. En parallèle, nous avons initié une analyse lipidomique des membranes cellulaires du rétinoblastome, pour identifier et quantifier les lipides de ces membranes et affiner la composition du modèle artificiel.

Après une présentation bibliographique centrée sur notre approche et le détail des méthodologies mises en œuvre pour remplir nos objectifs, je détaillerai dans une première partie la vérification de la validité du modèle membranaire de rétinoblastome par la culture cellulaire, puis je décrirai la technique que nous avons

développée pour étudier les interactions spécifiques entre porphyrines glycodendrimériques et membranes cellulaires par QCM-D.

Dans une deuxième partie, je montrerai l'apport de la cytométrie en flux dans l'étude des interactions spécifiques de nos molécules avec les cellules, après avoir détaillé les propriétés spectrales des porphyrines dendrimériques étudiées.

Dans une troisième partie, je présenterai les résultats que nous avons obtenus par l'analyse lipidomique des membranes de cellules de la lignée de rétinoblastome Y79 et de deux xénogreffes.

Dans la discussion générale, je montrerai comment ces travaux nous ont permis de progresser dans notre connaissance des mécanismes d'interaction entre les molécules étudiées et les cellules et de reconsidérer le modèle lipidique établi lors des travaux précédents.

Références

Fliesler, S.J., Anderson, R.E., Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. Lipid Res.* 22, 79–131 (1983).

Griegel, S., Rajewsky, M. F., Ciesiolka, T. & Gabius, H. J. Endogenous sugar receptor (lectin) profiles of human retinoblastoma and retinoblast cell lines analyzed by cytological markers, affinity chromatography and neoglycoprotein-targeted photolysis. *Anticancer Res.* 9, 723–730, (1989).

Kępczyński, M., Pandian, R.P., Smith, K.M., Ehrenberg B., Do Liposome-binding Constants of Porphyrins Correlate with Their Measured and Predicted Partitioning Between Octanol and Water? *Photochemistry and Photobiology*, vol. 76, no. 2, pp. 127–134, (2002).

MacCarthy, A., Draper, G. J., Steliarova-Foucher, E. & Kingston, J. E. Retinoblastoma incidence and survival in European children (1978-1997). Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur. J. Cancer* 42, 2092–2102 (2006).

Makky, A., Thèse, "Analyse des mécanismes de pénétration intramembranaire de porphyrines glycoconjuguées utilisables en thérapie photodynamique des cancers : modélisation des interactions spécifiques et non-spécifiques." Université Paris-Sud (2010).

Partie bibliographique

A. La Thérapie photodynamique

A.1. Historique

La thérapie photodynamique (PDT) est une approche thérapeutique utilisant un photosensibilisateur (PS) et une lumière de longueur d'onde précise.

Les effets thérapeutiques de la lumière sont connus depuis les époques antiques des civilisations grecque, romaine, égyptienne et indienne. Déjà en 1400 avant J.C en Inde, des extraits de *Psoralea Coryfolia* étaient administrés per os avant exposition au soleil pour le traitement du vitiligo. La PDT moderne quant à elle a débuté au XX^{ème} siècle avec l'observation par O. Raab d'un effet létal de l'acridine sur des paramécies placées dans des boîtes proches de la fenêtre du laboratoire (Raab, 1900). Le premier essai de traitement de cancer par PDT a eu lieu en 1903 : de l'éosine a été appliquée par voie topique avant exposition au soleil pour traiter les cancers de la peau. L'effet spécifique de la PDT a été montré en 1961 par Lipson qui a décrit l'utilisation d'un dérivé d'hématoporphyrine (HpD) pour la détection de tumeurs par fluorescence. En 1975, Dougherty a rapporté la régression de tumeurs transplantées chez l'animal par cette substance après illumination par de la lumière rouge, et ce sans trop endommager les tissus sains alentours, confirmant ainsi la spécificité de la PDT (Dougherty, 1975). Le champ de la PDT s'est par la suite rapidement étendu avec les premiers essais cliniques sur l'Homme. Aujourd'hui, le Photofrin[®], la Visudyne[®] et la prodrogue 5-ALA (acide 5-aminolevulonic) sont utilisés pour le traitement de diverses pathologies (cancers, dégénérescence maculaire liée à l'âge, etc.).

A.2. Principe de la PDT

Le traitement par PDT consiste en l'administration du photosensibilisateur dans l'organisme, le plus souvent par voie intraveineuse. Après un délai allant de quelques heures à quelques jours selon les cas, la tumeur est illuminée avec un laser de longueur d'onde correspondant au spectre d'absorption du photosensibilisateur et adaptée à la profondeur des tissus visés (figure 2). Dans le protocole idéal, la substance administrée ne devrait cibler et pénétrer que les cellules cancéreuses afin que la quantité de photosensibilisateur accumulée dans les tissus tumoraux soit

supérieure à celle dans les tissus sains. Ce cas idéal n'étant pas forcément atteint, il est très important de limiter le plus possible l'illumination aux tissus cancéreux.

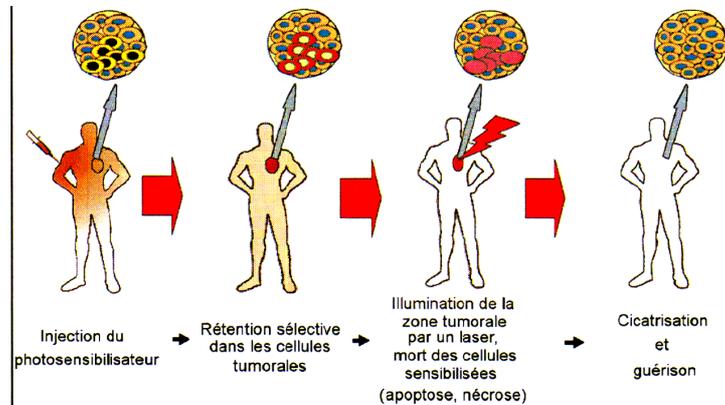


Figure 2 : Principe de la PDT (d'après Croisy et al. 2005).

L'activation du photosensibilisateur par le laser provoque la formation d'espèces radicalaires et d'espèces réactives de l'oxygène. Le photosensibilisateur passe de l'état fondamental (PS^0) à l'état électronique excité de demi-vie courte ($^1PS^*$), par l'absorption de la lumière à une longueur d'onde appropriée. Le retour à l'état fondamental peut se produire de manière directe (fluorescence) ou indirecte, grâce un processus quantique non radiatif faisant passer la molécule d'un état singulet à un état triplet ($^3PS^*$), état très réactif. Le photosensibilisateur peut alors retourner à son état fondamental (phosphorescence) ou bien interagir avec son environnement. Il se produit dans ce dernier cas des réactions de type I ou II selon la concentration en oxygène (figure 3). Dans le cadre de la PDT, ce sont les réactions de type II qui sont le plus désirées car elles génèrent les espèces les plus toxiques.

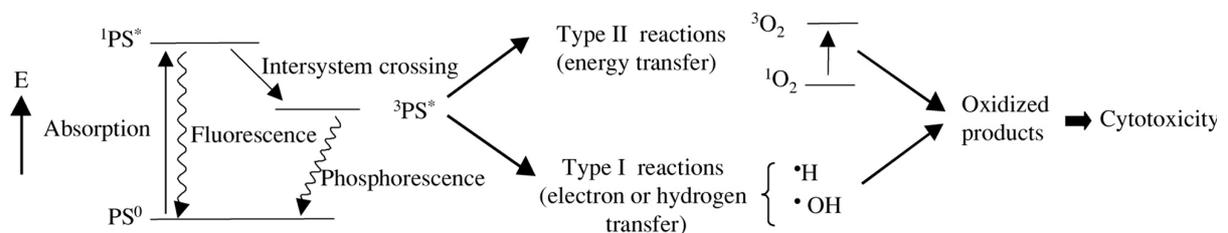


Figure 3 : réactions photophysiques représentées par un diagramme de Jablonski modifié, sans niveau de vibrations (d'après Konan et al. 2002)

Les réactions de type I résultent de l'interaction entre le photosensibilisateur dans son état triplet et des molécules voisines à l'état singulet et produisent des espèces radicalaires telles que $\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot$ et $\cdot\text{O}_2$. Ce type de réaction est favorisé lorsque la concentration en oxygène dans le milieu est faible. Selon l'oxygénation de la tumeur, on peut observer un passage des réactions de type I au type II et vice-versa (figure 4). Une tumeur en hypoxie sera donc moins sensible au traitement par PDT car ce sont les réactions de type I qui seront favorisées.

Les réactions de type II génèrent, à concentration élevée d'oxygène, de l'oxygène singulet. Celui-ci réagit avec les composants des membranes comme les phospholipides ou le cholestérol mais aussi avec les acides aminés. Il possède une durée de vie courte et un faible rayon d'action (Moan et Berg, 1991) : il a été montré par exemple que pour des cellules de peau et de foie de rat Wistar traités par 50 mg/kg d'AlS₄Pc (aluminium phthalocyanine tetrasulphonate) la durée de vie de l'oxygène singulet était d'environ 250 nsec dans le cytoplasme et 100 nsec dans la membrane lipidique, et son rayon d'action d'environ 50 nm (Niedre et al. 2002). Cette observation souligne l'importance pour l'efficacité de la PDT de la localisation intracellulaire du PS qui doit s'accumuler le plus près possible d'un organe vital de la cellule tumorale.

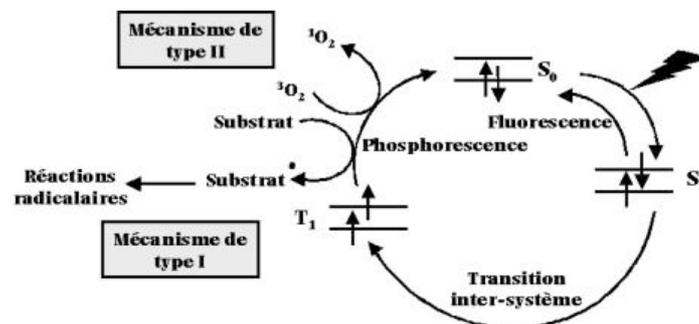


Figure 4 : description des réactions de type I et II (Gachard-Bouty, 2003).

La photodestruction des cellules tumorales se fait par deux mécanismes :

- directement, par apoptose (suicide cellulaire faisant intervenir des signaux intra- et extracellulaires) ou nécrose (dégénérescence cellulaire suite à des dommages effectués par l'oxygène singulet sur les membranes).

- indirectement, par destruction de la vascularisation tumorale, provoquant une mort des tissus tumoraux par hypoxie (Henderson et al. 1984).

La lumière utilisée en PDT est un laser, c'est-à-dire une lumière monochromatique dont la longueur d'onde est déterminée, entre autres, par la nature et la profondeur des tissus ciblés mais aussi par la structure des photosensibilisateurs utilisés. A une longueur d'onde de 800 nm, la lumière passe librement à travers les tissus (Svaasand, 1984). En-dessous de 800 nm, elle est dispersée par les macromolécules présentes.

Pour le choix de la longueur d'onde à utiliser lors de l'illumination, il faut également prendre en compte le coefficient d'atténuation qui représente une décroissance exponentielle de la longueur d'onde lorsque la lumière pénètre dans les tissus. Ce coefficient est différent pour chaque tissu de l'organisme. La dose de lumière à utiliser est régie par des mesures complexes et est souvent approximée par une équation simplifiée faisant intervenir le temps d'illumination, la longueur d'onde de la lumière activatrice, la fluence de la lumière et le coefficient d'atténuation.

A.3. Les différentes familles de photosensibilisateurs

Les photosensibilisateurs sont tous composés d'un macrocycle tétrapyrrolique avec 18 électrons π , ce qui leur confère un fort caractère aromatique. Le spectre d'absorption caractéristique de ces macromolécules est composé d'une bande intense entre 390 et 430 nm, appelée bande de Soret et de quatre bandes entre 500 et 680 nm appelées bandes Q (figure 5).

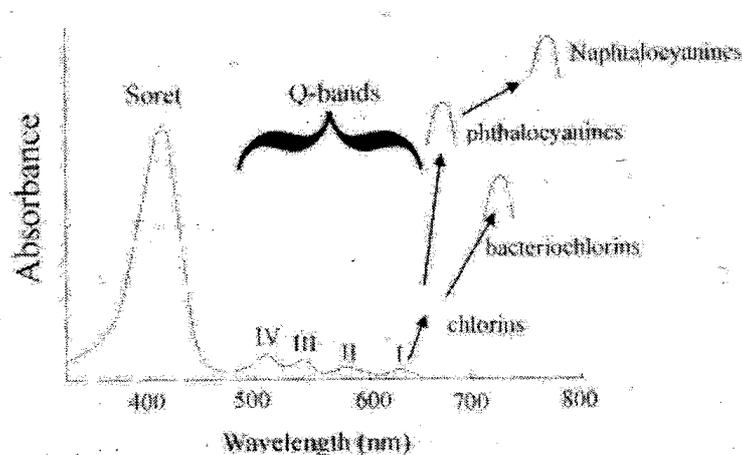


Figure 5 : Spectre UV-visible d'une porphyrine base libre.

De nombreux photosensibilisateurs utilisables en PDT ont été développés à partir de purpurines, benzoporphyrines, texaphyrines et chlorines (Pandey, 2000). Les photosensibilisateurs sont répartis chronologiquement en trois classes.

A.3.1. La première génération de PS

La première génération est principalement représentée par le Photofrin®, mélange très complexe d'hématoporphyrine (HpD), monohydroxyéthylvinyldeutéroporphyrine et protoporphyrine et de leurs formes polymérisées et agrégées. Ayant une distribution dans l'ensemble de l'organisme, sa concentration dans les tissus tumoraux n'est que trois fois supérieure à la concentration dans les tissus sains. Les conséquences indésirables de ce traitement découlent de ce manque de spécificité : une élimination lente du corps humain force les patients à éviter de s'exposer à la lumière pendant plusieurs semaines.

A.3.2. La deuxième génération de PS

Les molécules de la deuxième génération sont des composés purs, avec une faible toxicité dans l'obscurité, de meilleures propriétés photochimiques que les molécules de la première génération et s'accumulent préférentiellement dans les tissus cancéreux afin de limiter les effets indésirables. Le médicament le plus représentatif de cette deuxième génération est le Foscan® (m-THPC ou phénylchlorine) qui, malgré une activité photodynamique plus élevée que les autres molécules reste peu sélectif et présente toujours une toxicité non-négligeable pour la peau et les tissus sains (Laville, 2006), et ce bien que la PDT présente l'avantage de la sélectivité par l'illumination ciblée de la tumeur.

A.3.3. La troisième génération de PS

Prenant en considération la nature généralement hydrophobe des PS et leur tendance à l'agrégation, mais aussi leur cible cellulaire, des efforts considérables ont été développés pour améliorer leur efficacité. Les PS de troisième génération ont été spécifiquement développés dans ce sens (Allen et al. 2002). Diverses stratégies de modification chimique des PS ont été considérées, en tenant compte des

transformations anatomiques, physiologiques et biochimiques des cellules cancéreuses et en les exploitant comme des cibles potentielles pour améliorer l'efficacité de la PDT. Il s'agit, par exemple, d'altérations dans l'expression des récepteurs membranaires, de l'augmentation à la surface des cellules de lipides ou de protéines spécifiques ou encore de modifications du microenvironnement cellulaire. Utiliser ces différentes propriétés en greffant au PS un élément de reconnaissance qui serait identifié par un processus particulier permettrait l'augmentation de la capture du PS par les cellules ou tissus cibles (au détriment des cellules et tissus sains) et éventuellement l'amélioration de la localisation subcellulaire du PS. Diverses cibles ont à ce jour été étudiées :

- Le ciblage immunologique a été mis en oeuvre dans le milieu des années 1980 (Oseroff et al. 1986), par greffage d'anticorps (Ac) monoclonaux dirigés contre des antigènes exprimés spécifiquement sur les cellules tumorales. L'efficacité de cette méthode de couplage a été démontrée à plusieurs reprises, par exemple lorsque Goff et al. (1994) ont montré que la chlorure e6 conjuguée à l'Ac monoclonal Oc 125 s'accumulait deux à trois fois plus que le PS seul dans les cellules murines de cancers ovariens. La même tendance a été observée avec des immunoconjugués de chlorure e6 monoéthylène diamine monoamide couplé à l'Ac monoclonal IG12 spécifique des cellules de mélanome de l'uvée ; ce dernier produit quatre fois plus de dommages que le PS seul à la même concentration. La même chlorure conjuguée avec un Ac non spécifique de ces cellules ne s'est pas avéré efficace (Hu et al. 1995). La cible principale des immunoconjugués est la membrane plasmique : la lyse cellulaire serait causée par les lésions dans la membrane (Thorpe et al. 1995). Alors que les PS couplés aux Ac monoclonaux étaient étudiés avec beaucoup d'attention, des inconvénients ont été révélés pour l'utilisation de ce type de ciblage : (a) la difficulté d'obtention d'Ac spécifiques de la tumeur avec une haute affinité, (b) l'expression hétérogène des antigènes, inconstante au cours du développement tumoral, (c) le poids élevé des Ac, les empêchant de pénétrer la masse tumorale. Enfin, (d) les Ac conjugués aux PS restent souvent à la surface sans être internalisés, ce qui est un réel problème pour la PDT dont l'efficacité est tributaire de l'internalisation (Sharman et al. 2004).

- Le ciblage enzymatique a été développé en utilisant les PS sous forme de prodrogues. Les niveaux anormalement élevés de l'activité et/ou de l'expression de protéases extra/intracellulaires sont la marque de fabrique de beaucoup de tissus cancéreux. Ces enzymes permettent de convertir une prodrogue inactive d'un point de vue pharmacologique en la drogue active correspondante et ce, au niveau même de la tumeur (Han et Amidon. 2000). Dans ce domaine, une approche novatrice a été exploitée : la synthèse d'un PS a été modifiée afin de produire un complexe capable d'agir comme un agent thérapeutique et diagnostique pour le suivi de l'apoptose après initiation de la mort par PDT (Stefflova et al. 2006). Ce PS, le pyropheophorbide-a, est lié à un quencher via une séquence peptidique spécifique de la caspase 3, l'une des enzymes impliquées dans l'apoptose cellulaire. L'espaceur entre le quencher et le PS maintient une distance suffisante permettant le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Avant illumination, le complexe PS-peptide-quencher n'est pas toxique. Lors de l'illumination, le conjugué devient phototoxique, mais le quencher étant délétère sur le rendement d' 1O_2 , la production de ce dernier est inférieure à celle produite par le PS seul (Chen et al. 2004). L'apoptose des cellules tumorales commence toutefois et le clivage de la liaison peptidique, consécutif à l'activation de la caspase 3, provoque une augmentation drastique de la fluorescence au sein des cellules. La prodrogue produit ainsi un agent capable de diagnostiquer son propre mécanisme cytotoxique comme schématisé sur la figure 6.

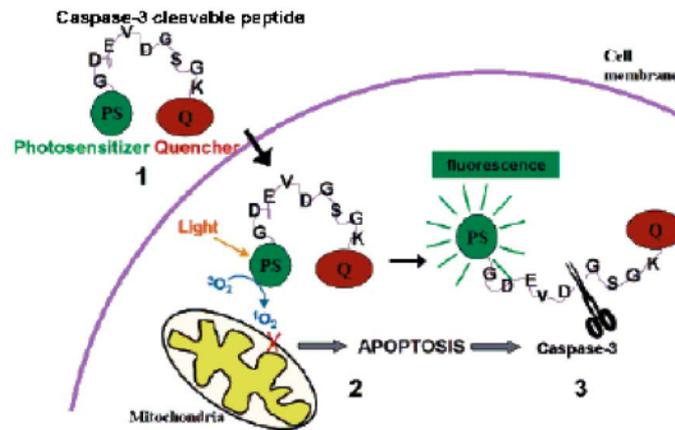


Figure 6 : PS couplé à un quencher via une séquence peptidique spécifique de l'apoptose. Etape 1 : le conjugué s'accumule dans les cellules cancéreuses. Etape 2 : production d' 1O_2 après illumination, déclenchement de l'apoptose. Etape 3 : activation de la caspase 3 qui clive la séquence peptidique, augmentation de la fluorescence (d'après Stefflova et al. 2006).

Un autre exemple de ciblage enzymatique est celui des protéases, en particulier les métalloprotéases MMPs qui sont responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). De par leurs fonctions, ces protéases sont très régulées dans l'environnement des cellules saines. En revanche, elles sont surexprimées au niveau des tissus tumoraux. Elles sont connues pour faciliter l'invasion tumorale et les métastases en dégradant la MEC, permettant ainsi aux cellules cancéreuses d'envahir les vaisseaux. Wojtyk et al. (2006) ont élaboré une stratégie de ciblage dans laquelle un PS lipophile est lié à un composé favorisant la solubilisation en milieu aqueux par une chaîne peptidique. Au contact de la tumeur, les MMPs clivent la séquence peptidique. Le PS exploite alors la surexpression des récepteurs aux LDL à la surface des cellules cancéreuses pour être pris en charge (figure 7).

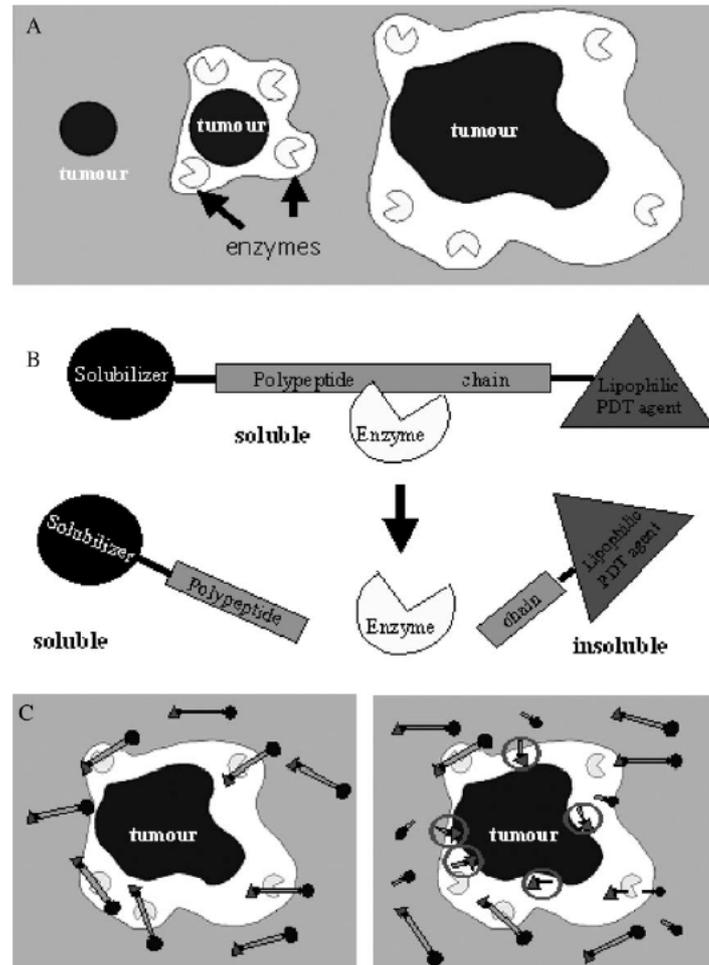


Figure 7 : A : Surexpression et recrutement des MMPs autour de la tumeur pour détruire le tissu normal environnant. B : mécanisme de fonctionnement du composé PS-peptide-solubilisant. C : système de libération du PS médié par les MMPs surexprimées autour de la tumeur et accumulation du PS après clivage de la séquence peptidique par ces enzymes (d'après Wojtyk et al. 2006).

Un avantage important de cette approche est qu'elle diminue la photosensitivité. En effet, les PS illuminés qui ne sont pas au contact de la tumeur sont rapidement éliminés, le complexe étant soluble en milieu aqueux. Il reste encore néanmoins plusieurs challenges à résoudre pour le ciblage enzymatique des tumeurs, comme le caractère ubiquitaire des enzymes ou la difficulté pour trouver une séquence peptidique qui ne cible qu'une enzyme spécifique. De plus, il faut nécessairement s'assurer qu'il n'y ait pas

d'immunogénicité du complexe formé avec le PS et surtout pas de génération de métabolites toxiques.

- Enfin, le ciblage de récepteurs spécifiques à la surface des cellules cancéreuses a été utilisé car, tout comme la production élevée d'enzymes spécifiques dans plusieurs types de tumeurs, il existe un certain nombre de récepteurs surexprimés à la surface des membranes des cellules cancéreuses. La majorité d'entre eux est retrouvée à la surface des cellules saines, mais les processus associés à l'entretien et à la propagation de la tumeur requièrent beaucoup de matériel et de signaux cellulaires pour supporter la sur-régulation du processus intracellulaire. Tout ceci est contrôlé par un vaste panel de récepteurs membranaires dont les fonctions ne sont pas encore toutes complètement identifiées (Allen, 2002). Des travaux sont développés actuellement pour modifier les PS afin de cibler spécifiquement les récepteurs des LDL, celui de l'acide folique et des récepteurs à sucres.

L'expression de récepteurs aux LDL est élevée dans les cellules néoplasiques et dans l'endothélium prolifératif en raison de la forte demande en cholestérol exogène pour la synthèse membranaire (Lombardi et al. 1989). En conséquence, les PS lipophiles profitent d'une localisation favorable dans la tumeur par une liaison aux lipoprotéines du sérum et d'une meilleure rétention que les PS hydrophiles (Jori et al. 1984). En revanche, la faible solubilité en milieu aqueux de ces PS ne permet pas une administration systémique efficace. Des stratégies de vectorisation ont donc été mises en œuvre pour ce type de ciblage, des liposomes aux microsphères, en passant par la conjugaison des PS aux lipoprotéines (Liu et Hamblin 2005) ou à des nanoparticules (Gary-Bobo et al. 2012).

Le ciblage des récepteurs au folate (FR pour Folate Receptor) a aussi été largement étudié, ces récepteurs étant fréquemment surexprimés dans certains cancers, ovariens par exemple, (Garin-Chesa et al. 1993), tout comme le ciblage du récepteur au VIP (Vaso Intestinal Peptide) surexprimé dans certains cancers du sein, du tractus gastro-intestinal, du pancréas ou de la prostate (Reubi, 1996).

Le ciblage des récepteurs aux sucres est basé sur le greffage d'une fonction sucrée au PS pour favoriser son interaction avec les glycoprotéines membranaires. Beaucoup de PS glycoconjugués ont été synthétisés pour cibler spécifiquement les récepteurs lectiniques surexprimés sur certaines cellules cancéreuses. Ces récepteurs sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires fortement sollicités lors de la croissance tumorale (Yang et Liu, 2003), la réponse immunitaire (Rabinovich et al. 2002), l'adhésion cellulaire (Brewer et al. 2002) ou encore l'angiogénèse (Riss et al. 2003). La glycoconjugaison du système tétrapyrrolique est particulièrement intéressante ; elle augmente la balance hydrophile/lipophile, améliorant considérablement la photoactivité des photosensibilisateurs comparée aux analogues non glycoconjugués (Moser et al. 1996). En effet, cette modulation de l'amphiphilie permet de diminuer les phénomènes d'agrégation en solution causés par l'hydrophobie élevée du macrocycle seul. La synthèse de photosensibilisateurs plus hydrophiles et donc partiellement hydrosolubles facilite également l'administration par injection intraveineuse qui restait un facteur limitant.

B. Les différentes porphyrines étudiées dans le traitement du rétinoblastome

B.1. Le rétinoblastome

Le rétinoblastome est une tumeur embryonnaire de la rétine qui représente 3 à 4 % des cancers pédiatriques dans les pays développés (Parkin et al. 1988 et 1998). Il représente ainsi le cancer le plus fréquent chez le jeune enfant (soit 1/20 000 naissances) (Mac Carthy et al. 2006). Plus de 90% des cas de rétinoblastome sont détectés avant l'âge de 5 ans et 60% sont unilatéraux, c'est à dire qu'ils ne touchent qu'un œil (Sanders et al. 1988). Il existe une forme héréditaire qui est à l'origine de tous les cas bilatéraux et de 15% des cas unilatéraux (Lohmann et al. 1996). Cette forme héréditaire est le résultat de mutations de novo (Yandell et al. 1989). Le gène impliqué est le gène RB1, identifié comme suppresseur de tumeur. C'est la perte et/ou la(les) mutation(s) d'allèles qui provoque(nt) le développement du cancer. Le taux de survie est élevé depuis les années 1970 (Sant et al. 2001). Entre 1978 et 1997, le taux de survie à 5 ans a progressé de 89 à 95% (MacCarthy et al. 2006). Ceci est lié au traitement des formes unilatérales par énucléation, suivie ou non

d'une chimiothérapie (Beck et al. 2000). Pour les formes bilatérales, le traitement diffère quelque peu, l'objectif étant de préserver au maximum la vision. Il consiste à passer directement à la chimiothérapie par un ou plusieurs anticancéreux, associée ou non à d'autres traitements tels que la cryothérapie (Honavar et al. 2002). La radiothérapie, quant à elle, est réservée aux enfants avec un rétinoblastome bilatéral qui ont développé une autre maladie secondaire après la chimiothérapie (Shields et al. 2002). Comme pour tous les cancers infantiles, une surveillance à long terme est nécessaire, les mutations du gène RB1 pouvant provoquer d'autres tumeurs dans le cas des formes héréditaires (DiCiommo et al. 2000) et les chimiothérapies provoquant des effets indésirables majeurs dont un risque d'apparition de leucémie. Le caractère mutilant de la chirurgie (énucléation) et le risque accru d'effets secondaires après les traitements par chimiothérapie classique ont poussé les chercheurs à trouver d'autres alternatives pour soigner les enfants atteints de rétinoblastome. La rétine étant facilement accessible par un laser, la PDT pourrait être un traitement plus approprié à ces tumeurs.

La rétine est l'organe responsable de la vision et est constituée de cellules photoréceptrices, les cônes et les bâtonnets. Pour le moment, on ne sait pas quelles cellules sont plus particulièrement touchées par le rétinoblastome.

B.2. Les porphyrines glycoconjuguées

Nous avons vu précédemment que la modification de l'amphiphilie des photosensibilisateurs par greffage chimique de différents sucres a été développée. La glycoconjugaison du cycle tétrapyrrolique est particulièrement intéressante pour cibler le rétinoblastome. Cette technique pourrait être appliquée à d'autres cellules tumorales connues pour surexprimer des récepteurs aux sucres.

Griegel et al. (1989) ont identifié sur plusieurs lignées cellulaires de rétinoblastome, des récepteurs présentant une affinité pour certains sucres, comme le β -D-galactose et le α -D-mannose. A la suite de ces travaux, l'équipe du Dr. Philippe Maillard à l'Institut Curie d'Orsay a synthétisé et étudié le comportement biologique et phototoxique de nombreux PS, dérivés des porphyrines (Desroches et al. 2004,

Laville et al. 2006, Ballut et al. 2012) ou de chlorines (Laville et al. 2003), auxquels ont été greffés diverses structures osidiques.

Laville et al. (2003) ont étudié des dérivés de la chlorine présentés dans la figure 8.

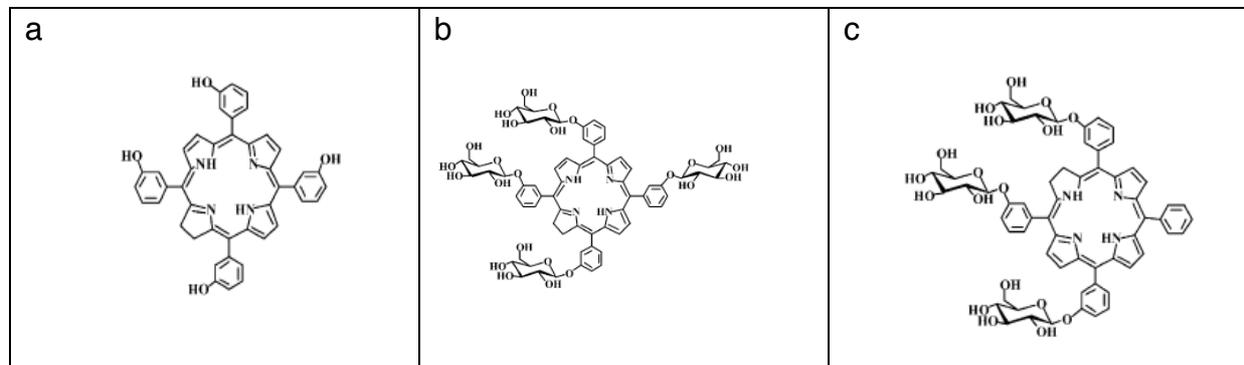


Figure 8 : photosensibilisateurs de base chlorine, ici chlorine *m*-THPC (a), tétraglycoconjuguée (b) et triglycoconjuguée (c), d'après Laville et al. 2003.

Desroches et al. (2004) ont décrit des meso tétraarylporphyrines métabstituées par des glucoses (tri, tetra et non conjuguée), équivalentes aux dérivés chlorines étudiés par Laville (figure 9). La différence entre le noyau chlorine et le noyau porphyrine réside dans la présence d'une double liaison au niveau du cycle tétrapyrrolique qui est saturée dans celui de la chlorine. Les porphyrines sont moins cytotoxiques que les chlorines.

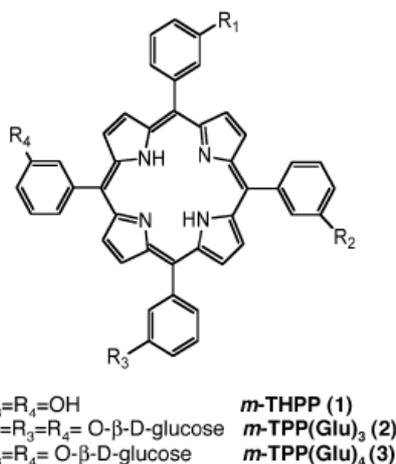


Figure 9 : structure de trois dérivés porphyriniques glucoconjugués (d'après Desroches et al. 2004).

L'équipe de Philippe Maillard s'est ensuite orientée vers une deuxième série de photosensibilisateurs glycoconjugués, axée sur l'amélioration de la mobilité des résidus glycosylés, dans l'objectif d'améliorer l'affinité de la liaison sucre-récepteur. Contrairement aux molécules de la première série, ce deuxième procédé de synthèse a permis le greffage de mannose, permettant ainsi un meilleur ciblage des récepteurs surexprimés sur les cellules de rétinoblastome. Ces dérivés porphyriniques varient par la longueur de leur espaceur, mono- ou di-éthylène glycol (MEG ou DEG), par leurs sucres, mannose ou galactose et la position du carbone anomérique de ces derniers. C'est le dérivé porphyrinique α -mannosylé portant l'espaceur DEG qui s'est révélé, à ce jour, le plus prometteur : il présente la meilleure activité photodynamique (Ballut et al. 2012).

La troisième série de dérivés porphyriniques glycoconjugués a été synthétisée en prenant en considération deux observations majeures qui ont pu être tirées de différentes études sur les composés précédents :

- les photosensibilisateurs asymétriques et amphiphiles présentent une meilleure activité photodynamique.
- la présence de mannose améliore également la photoactivité et favorise le transport médié par des récepteurs lectiniques au mannose surexprimés par les cellules du rétinoblastome.

L'affinité entre un glycoside monovalent et son récepteur est faible (de l'ordre du millimolaire), en revanche, l'effet multivalent (cluster effect) permet d'augmenter significativement cette affinité (de l'ordre du micromolaire) (Fan et al. 1995). Ceci s'appuie sur le fait que nombre de lectines sont des récepteurs multimériques, possédant donc plusieurs sites de reconnaissance aux sucres. Pour mimer un ligand multivalent synthétique, un dendrimère peut être utilisé ; Synthétisés pour la première fois par Tomalia en 1985, les dendrimères sont des structures arborescentes. Les porphyrines glycodendrimériques sont composées de quatre parties :

- le chromophore, ici un macrocycle tétrapyrrolique ;
- le répartiteur, un acide aminé qui assure la distribution des groupes glycosylés. La nature de l'acide aminé permet de jouer sur l'hydrophobicité de la molécule ;

- l'espaceur, de longueur variable, qui permet une plus ou moins grande mobilité des sucres ; et enfin
- les sucres fixés à l'extrémité des espaceurs.

L'ajout d'une branche dendrimérique à un dérivé porphyrinique permet également de renforcer le caractère asymétrique de la molécule et d'augmenter son amphiphilie, laissant supposer une meilleure affinité de ces composés pour les membranes cellulaires.

Dans le cadre de sa thèse, Séverine Ballut (2010) a synthétisé 14 porphyrines glycodendrimériques dont la structure générale est présentée dans la figure 10.

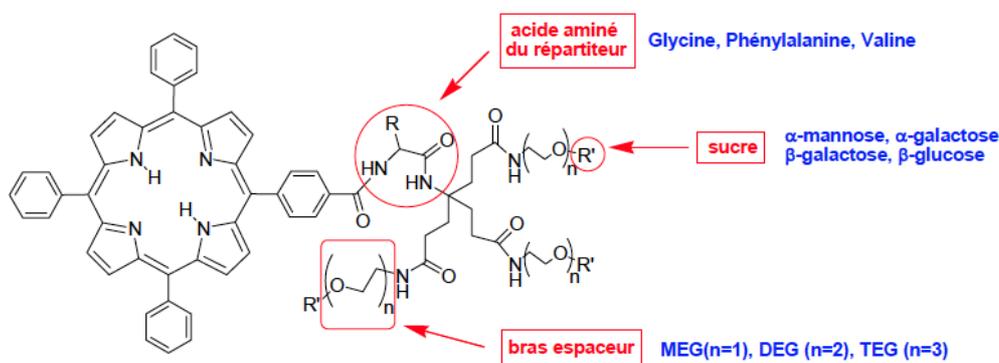


Figure 10 : structure des porphyrines glycodendrimériques synthétisées par Séverine Ballut (d'après sa thèse, 2010)

Ali Makky dans le cadre de sa thèse (2010) en a étudié plus particulièrement quatre (figure 11).

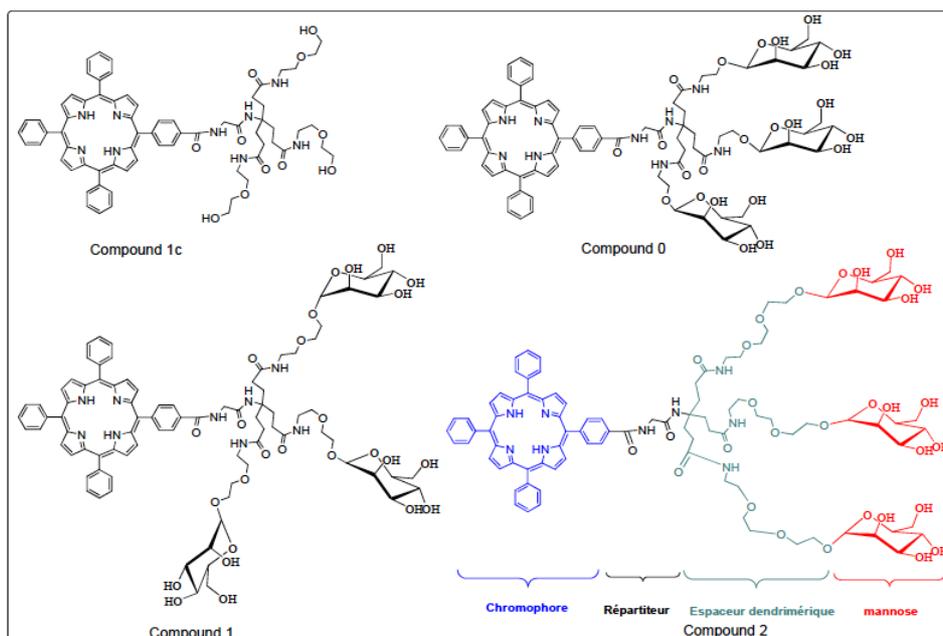


Figure 11 : structure des porphyrines glycodendrimériques étudiées par Ali Makky, (2010). Le composé 1c (TPP-1c) possédant un espaceur DEG, est l'équivalent non mannosylé du composé 1 (TPP-1). Il a servi de témoin. Le composé 0 (TPP-0) possède un espaceur MEG et le composé 2 (TPP-2) un espaceur TEG. Tous ces dérivés ont un répartiteur glycine.

L'objectif des travaux menés sur les porphyrines glycoconjuguées est de comprendre leur mode de transport dans les cellules de rétinoblastome Y79 : est-il passif, médié ou bien les deux?

C. Discriminer les deux types de transport des porphyrines glycoconjuguées

C.1. Culture cellulaire

L'évaluation des propriétés de pénétration des composés étudiés devant être réalisée dans les conditions les plus proches du vivo, la culture cellulaire est une méthode d'étude biologique systématiquement utilisée pour l'obtention d'informations sur l'efficacité des molécules. Elle peut fournir des preuves sur l'existence éventuelle d'un transport médié dépendant des cellules et des principes actifs testés. Dans le cas de la PDT, elle présente également l'avantage de pouvoir mesurer la photoactivité des dérivés porphyriniques, en illuminant les cellules incubées avec ces derniers. C'est la détermination de la concentration inhibitrice à 50%, IC_{50} , qui permet de mesurer le potentiel photocytotoxique des composés photoactivables sur les

cellules tumorales. Le composé idéal serait inactif en l'absence de lumière et cytotoxique sous l'effet de la lumière. Comme nous l'avons vu précédemment, l'équipe de Philippe Maillard à l'Institut Curie d'Orsay a synthétisé de nombreuses molécules, dérivées de porphyrines (Desroches et al. 2004, Laville et al. 2006, Ballut, thèse 2010) ou de chlorines (Laville et al. 2003), greffées avec diverses structures osidiques. Tous ces composés ont été étudiés sur cellules, dans le but de mettre en évidence la relation structure-activité sur la photoactivité, selon la présence ou non de sucres et selon la position de ces sucres au niveau des molécules. Les cellules utilisées appartiennent à la lignée immortalisée de rétinoblastome suspensives Y79. Des cellules d'adénocarcinome du colon adhérentes (HT 29) sont généralement utilisées comme témoin. Les cellules Y79 sont connues pour surexprimer les récepteurs β -galactose et α -mannose (Griegel et al. 1989). Les cellules HT 29 surexpriment essentiellement les récepteurs β -galactose et β -glucose, mais expriment également les récepteurs α -D-mannose. Laville et al. (2003) ont mis en contact de la *m*-THPC et des chlorines tétra et triglycoconjuguées avec des cellules HT 29. Ils ont mis en évidence une modification de l'activité photobiologique de la chlorine sous l'effet de la glycosylation. Zheng et al. (2001) l'avaient également montré pour des chlorines galactosylées. Ces études de culture cellulaire ont permis d'observer que les dérivés tétraglycoconjugués sont moins phototoxiques que les dérivés triglycoconjugués. Ces résultats peuvent être corrélés avec ceux de Momenteau et al. qui ont montré que les composés asymétriques portant trois sucres étaient plus photoactifs que les composés symétriques (Momenteau et al. 1994).

Laville et al. (2006) ont par la suite étudié plusieurs dérivés porphyriniques, variant par la longueur de leur espaceur, mono- ou di-éthylèneglycol (MEG ou DEG), par la nature de leurs sucres (mannose ou galactose) et par la position du carbone anomérique de ces derniers. Ils ont montré que plus l'espaceur était long, plus les composés étaient efficaces. La position du carbone anomérique des sucres a aussi un effet sur la phototoxicité des dérivés porphyriniques, la molécule portant l' α -galactose étant 10 fois plus phototoxique que la molécule portant le β -galactose. Maillard et al. (2007) ont démontré que ces photosensibilisateurs α -mannosylés étaient internalisés dans les cellules tumorales par un mécanisme actif médié par un récepteur membranaire mannose-dépendant. Comme indiqué précédemment, c'est

actuellement le dérivé porphyrinique tri- α -mannosylé portant l'espaceur DEG, TPP-(DegMan)₃ qui présente la meilleure activité photodynamique avec une IC₅₀ de 0,35 μ M pour les cellules Y79 et de 0,45 μ M pour les cellules HT 29.

Dans le cadre de sa thèse, S. Ballut a déterminé la cytotoxicité et la phototoxicité des porphyrines glycodendrimériques qu'elle a synthétisées. Elle a montré que ses molécules n'étaient pas cytotoxiques (IC₅₀ > 7,5 μ M, considérée comme négligeable). Comparé aux valeurs d'IC₅₀ de TPP-(DegMan)₃, les porphyrines glycodendrimères sont au mieux 6 fois moins phototoxiques sur HT29 et dix fois moins phototoxiques sur Y79. Ces résultats décevants, confirmés par la suite par Ali Makky dans sa thèse, n'ont pas montré de lien entre la nature du sucre de la porphyrine glycodendrimère et le type de récepteur membranaire surexprimé par la lignée cellulaire.

C.2. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de réaliser des mesures sensibles et quantitatives des interactions moléculaires avec un haut débit. La mesure de la fluorescence des dérivés porphyriniques lorsque ces derniers sont associés aux cellules permet d'évaluer la capture de ces derniers. Les études par cytométrie en flux ont permis par exemple de mettre en évidence l'existence d'un récepteur pour la molécule TPP-(DegMan)₃. En effet, en étudiant la capture des porphyrines par les cellules Y79 dans un milieu avec et sans glucose, il a été démontré qu'une partie de l'internalisation de ces molécules se faisait via un mécanisme médié, énergie-dépendant, impliquant un transporteur, la capture étant diminuée de 50% lorsque les cinétiques étaient réalisées dans un milieu sans sucre. Ce phénomène n'a pas été observé avec une porphyrine témoin non sucrée. De plus, en incubant au préalable les cellules avec de l'albumine mannosylée, une diminution de la fluorescence de 45-60% a été observée par rapport à la même expérience sans cette pré-incubation (Laville et al. 2006).

Le cytomètre en flux mesure la fluorescence des dérivés porphyriniques associés aux cellules comme nous l'avons dit plus haut, ce qui signifie que les molécules peuvent être soit accrochées à la membrane, à l'extérieur des cellules, soit effectivement internalisées. Pour confirmer que la capture observée lors des expériences de cytométrie en flux pouvait être considérée comme de l'internalisation,

certaines auteurs ont également réalisé une extraction cellulaire pour connaître les concentrations intracellulaires en dérivés porphyriniques par dosage en spectrométrie de fluorescence après lyse cellulaire (Laville et al. 2003, Wang et al. 2012).

Depuis les années 1980, l'étude des liaisons ligands-récepteurs et la mesure de la réponse cellulaire par cytométrie en flux a été étoffée par l'ajout du paramètre *temps*. Martin et al. (1980) ont en effet mesuré le temps en tant que paramètre additionnel afin de suivre la dynamique des réactions pendant plusieurs minutes en se basant sur la capacité des appareils de cytométrie en flux à discriminer les ligands libres des ligands associés aux cellules. A présent que plusieurs auteurs ont mis en évidence le passage de certains dérivés porphyriniques par des transports médiés, ce type d'étude pourrait être complémentaire des protocoles plus classiques et permettrait d'évaluer les cinétiques de liaison des molécules aux cellules et de discriminer les différentes porphyrines selon leur vitesse d'association et leur affinité aux cellules.

C.3. Autres techniques d'études

Laville et al. (2003) ont comparé par microspectrofluorimétrie l'internalisation du composé triglycoconjugué TPP-(DegMan)₃ et celle de *m*-THPC, en relevant la fluorescence du cytoplasme au cours du temps. Contrairement au composé *m*-THPC, pour lequel la diffusion passive est le mécanisme dominant, la porphyrine triglycoconjuguée pénètre dans les cellules par un processus saturable, diminué à 4°C et énergie-dépendant, ce qui laisserait supposer que cette molécule serait prise en charge par un récepteur ou un transporteur médiant l'endocytose. La localisation subcellulaire a été déterminée par épifluorescence. Il a été montré que la molécule triglycoconjuguée serait localisée préférentiellement dans la mitochondrie, *m*-THPC possédant une localisation plus diffuse, dans différents organites. Une étude plus approfondie a montré que la porphyrine glycoconjuguée a une localisation subcellulaire différente selon le temps d'incubation. Quand il est inférieur à 3h, elle serait essentiellement dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries. En revanche après des temps plus longs, elle se retrouverait dans les membranes de tous les organites cellulaires (Laville et al. 2006). Ces conclusions doivent toutefois être nuancées par le fait que les cellules Y79 possèdent une petite taille et un gros

noyau, ce qui limite leur étude en microscopie de fluorescence. La microscopie confocale est plus adaptée, car elle est plus précise et permet une meilleure localisation. Dans sa thèse, Séverine Ballut a étudié la localisation subcellulaire de TPP-(DegMan)₃ mais aussi des porphyrines glycodendrimériques après 24h de contact avec des cellules d'adénocarcinome du colon HT 29. Elle a observé une localisation cytoplasmique diffuse pour TPP-(DegMan)₃ et une localisation ponctuelle pour les porphyrines glycodendrimériques. Aucune de ces porphyrines ne se trouvaient dans les lysosomes, ni dans les mitochondries.

Les techniques classiques de biologie cellulaire permettent d'évaluer la photoactivité des différentes molécules synthétisées mais ne peuvent pas donner d'information précise sur les mécanismes mis en jeu. Les derniers résultats obtenus avec les porphyrines glycodendrimériques ont montré les limites de ces études et la nécessité de trouver d'autres stratégies afin de décomposer les mécanismes d'interaction molécule-membrane d'un point de vue cinétique, et de pouvoir déterminer la partie déterminante des molécules dans l'interaction : le macrocycle ou les sucres.

Les membranes cellulaires de mammifère ont pour structure de base des bicouches lipidiques. Elles résultent d'un assemblage riche de phospholipides, cholestérol et de protéines marquant la frontière entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire. Cette composition complexe ainsi que la nature dynamique des membranes naturelles rend difficile l'analyse de leur interaction avec des molécules actives. Afin de contourner ce problème, une approche consiste à élaborer des modèles membranaires synthétiques au laboratoire.

D. Les modèles membranaires

D.1. Composition des membranes cellulaires de mammifères et altérations lors du processus de cancérisation.

Les membranes cellulaires des mammifères sont des structures perméables séparant le compartiment intracellulaire de l'environnement extérieur (Wolf et Quinn, 2008). Elles ont un rôle de barrière vis-à-vis des mouvements de solutés hydrosolubles et d'ions. Elles sont constituées de lipides assemblés en bicouches qui

subissent régulièrement des réarrangements, comme par exemple, lors de la fusion membranaire. Les lipides de ces membranes sont des phospholipides, des sphingolipides, des glycolipides et des stérols, présents en proportions variables. Dans ce support lipidique sont insérés des protéines, comme des enzymes pouvant modifier les propriétés biochimiques de l'environnement, ou des récepteurs comme les antigènes A,B,O du groupe sanguin présents sur les membranes des globules rouges (Wolf et Quinn, 2008). Les interactions entre les lipides et les protéines membranaires se font par des interactions électrostatiques entre les résidus ioniques aminoacides des protéines et des lipides polaires (Wolf et Quinn, 2008). La figure 12 décrit la localisation des principales catégories de lipides.

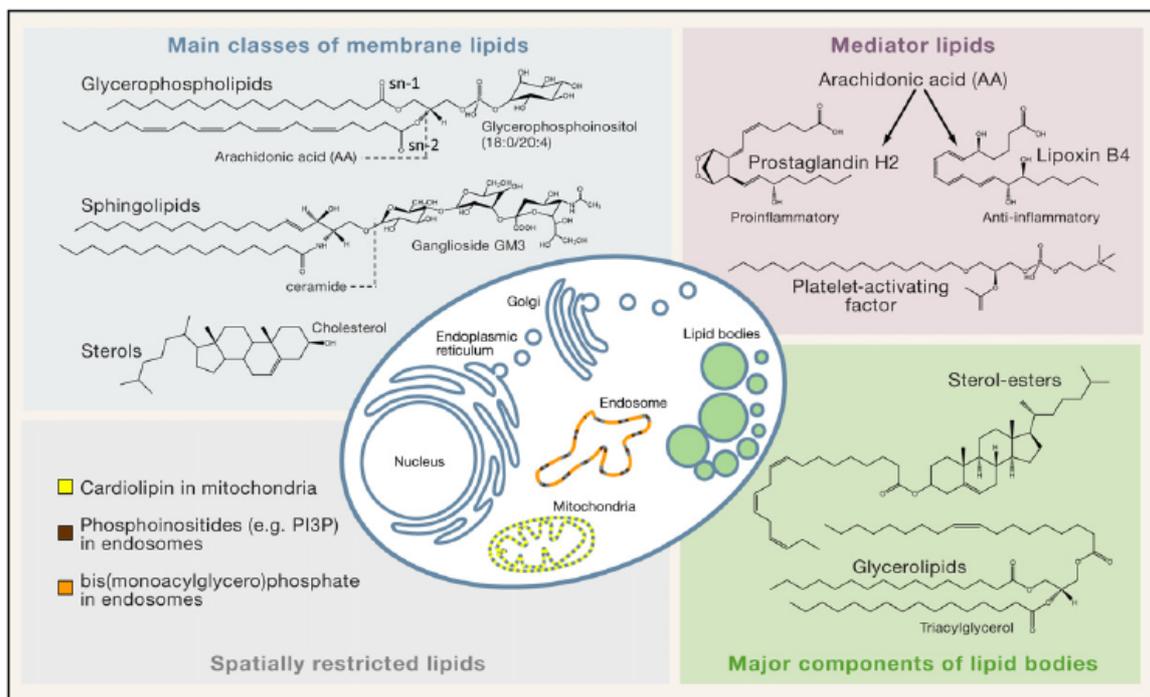


Figure 12 : localisation des lipides dans une cellule de mammifère (d'après Wenk, 2010)

Les principaux lipides membranaires sont les phospholipides (Wolf et Quinn, 2008) ; leur squelette glycérol est acétylé par deux longues chaînes d'acides gras attachés en C₁ et en C₂ par une liaison éther ou vinyl. Les têtes polaires des phospholipides comportent deux groupes différemment chargés : un groupe phosphate chargé négativement et un autre groupe positivement ou négativement chargé, ou encore non chargé (Langner et Kubica, 1999). Les quatre phospholipides majeurs des

membranes cellulaires sont la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine et la sphingomyéline (Alberts et al. 2008). La phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et la sphingomyéline sont zwitterioniques avec un groupe phosphate chargé négativement et un groupement choline ou éthanolamine, chargé positivement. Le phosphatidylglycérol et le phosphatidylinositol portent chacun une seule charge négative associée au groupement phosphate. L'acide phosphatidique contient une charge négative nette, associée à son groupe phosphate. La phosphatidylsérine présente trois charges résiduelles : deux charges négatives associées aux groupements phosphate et carboxyle (cette dernière étant facilement accessible depuis la phase aqueuse) et une charge positive dans le groupement ammonium.

Les chaînes acyl des phospholipides sont globalement linéaires, de longueur généralement comprise entre 14 et 26 atomes de carbone. La présence de chaînes insaturées modifie la géométrie des molécules en induisant une inclinaison au niveau de la double liaison. Elle a donc une forte influence sur l'organisation de chaînes appartenant à des phospholipides différents lorsqu'elles interagissent entre elles, puisque la conformation des molécules insaturées diminue les interactions hydrophobes entre les phospholipides et augmente l'aire moléculaire moyenne par un phénomène d'encombrement stérique (Demel, 1974). En fonction de la température, les lipides peuvent être en phase lamellaire ordonnée dite phase gel L_{β} (chaînes d'acides gras plutôt ordonnées) ou en phase lamellaire fluide désordonnée L_{α} (chaînes d'acides gras mobiles). La température de fusion des chaînes acyl correspond à la transition entre les phases L_{α} et L_{β} . Cette température, dépendante de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes acyl (De Kruijff, 1975), est caractéristique de chaque lipide et par conséquent, à une même température, des lipides différents peuvent se trouver dans des phases différentes. Les interactions entre les lipides dépendent donc de la phase dans laquelle ils se trouvent dans les membranes.

Le cholestérol est une petite molécule rigide capable de s'insérer entre les lipides membranaires au niveau des chaînes acyl hydrophobes. Il est très abondant dans les membranes plasmiques (sa concentration molaire peut aller jusqu'à 30%

molaire), mais peu dans les membranes des compartiments intracellulaires (Bach et al. 2003). La molécule de cholestérol possède un groupement hydroxyle interagissant avec les têtes polaires des phospholipides et un groupement stéroïde rigide interagissant avec les chaînes acyl hydrophobes des phospholipides.

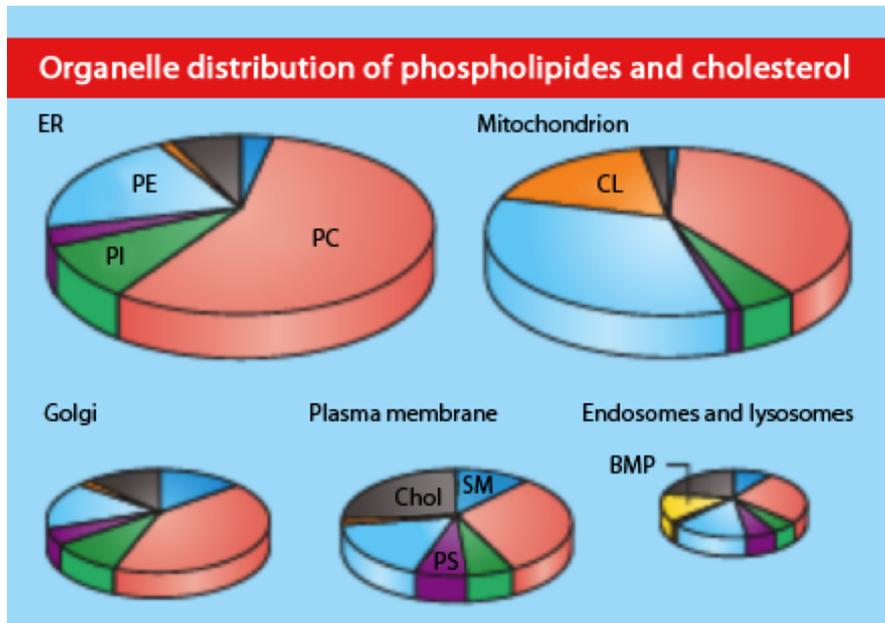


Figure 13 : Distribution des différents lipides dans les différentes membranes cellulaires (d'après Van Meer, 2011)

Les lipides sont connus pour être impliqués dans un nombre important de pathologies, dont le cancer (Zheng et al. 2006). Par exemple, l'acide lysophosphatidique (LPA), le phospholipide le plus simple, est significativement augmenté dans le fluide ascitique de patientes souffrant de cancer ovarien (Goto, 2004). Il a également été montré que la proportion des sphingolipides était altérée dans plusieurs types de tumeurs (Wenk, 2005). La composition lipidique des membranes cellulaires peut être modifiée lors du processus de cancérisation et peut même potentiellement influencer sur l'agressivité de la tumeur. Par exemple, Mountford et al. (1984) ont montré une forte variation du rapport phospholipides/cholestérol dans les membranes de lignées d'adénocarcinome métastatiques ou non. Il était de 0,29 pour les lignées non métastatiques et de 0,4 pour les lignées métastatiques. Il a également été rapporté que la concentration en cholestérol dans les adénomes prostatiques était augmentée par rapport à la concentration dans les cellules

prostatiques saines, cela étant lié à une possible dérégulation de l'homéostasie du cholestérol (Hager et al. 2006). Freeman et Solomon (2004) ont même émis l'hypothèse que le cholestérol pourrait être responsable de la prolifération cellulaire.

D.2. Les systèmes moléculaires organisés

Les membranes cellulaires peuvent être représentées sous forme de systèmes moléculaires organisés, dont le but est de mimer la composition et l'organisation moléculaire des membranes naturelles. Nous distinguerons ici trois types de systèmes : les bicouches planes (Richter et al. 2006), les liposomes (Delattre et al. 1993) et les monocouches (Brookman, 1999, Maget-Dana, 1999) (Figure 14). Des techniques d'analyse physico-chimique spécifiques permettent leur caractérisation et l'analyse des interactions entre leurs constituants et des molécules actives d'intérêt (Peetla et al. 2009).

En plus de posséder les mêmes nature, composition et propriété de compaction des lipides, ces modèles peuvent reproduire les éventuelles inhomogénéités des membranes biologiques. En effet, la présence de cholestérol, par exemple, peut induire une ségrégation moléculaire résultant en la formation de nanodomains qui jouent un rôle important dans l'organisation moléculaire et la fluidité des membranes (Escriba et al. 2008) et qui sont, par ailleurs, impliquées dans de nombreux processus cellulaires.

Le tableau 1 regroupe les trois types de modèles membranaires avec, pour chacun, leurs principaux avantages et inconvénients.

Système	Description	Avantages	Inconvénients
Bicouche plane	<ul style="list-style-type: none"> - Système composé de 2 couches monomoléculaires se faisant face et interagissant par leurs chaînes apolaires. Les têtes polaires sont orientées vers l'extérieur. - Bicouches supportées sur support solide (silice, mica, etc), obtenues par fusion spontanée de vésicules 	<ul style="list-style-type: none"> - Mime la structure en bicouche des membranes biologiques. - Contrôle fin de la composition de chaque feuillet de la bicouche par transfert LB : permet de reproduire l'asymétrie membranaire. - Nature et température de la phase aqueuse bien 	<ul style="list-style-type: none"> - Le feuillet inférieur de la bicouche est contraint en raison de l'interaction avec la surface solide : il faut « découpler » la bicouche du support. - Pas de possibilité de faire varier le degré d'ordre des molécules. - La caractérisation nécessite des techniques

	<p>lipidiques sur le support solide ou par transfert Langmuir-Blodgett (LB) de monocouches préalablement étalées à l'interface air/liquide.</p> <p>- Bicouche suspendue (<i>Black Lipid Membrane</i>) entre deux milieux liquides.</p>	<p>contrôlées.</p> <p>- Possibilité d'analyse rhéologique du système.</p>	<p>spécifiques : mesures de fréquence de résonance et dissipation (QCM-D), spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), ellipsométrie, microscopie de force atomique (AFM), diffraction des RX, diffusion des neutrons...</p> <p>- Caractérisation des bicouches suspendues délicate (essentiellement électrochimique).</p>
Liposome	<p>- Vésicule sphérique formée de lipides organisés en bicouche exposant les têtes polaires vers le milieu aqueux externe et interne.</p>	<p>- Structure en bicouche.</p> <p>- Facilité d'obtention : nombreuses méthodes de préparation.</p> <p>- Permet l'étude de la perméabilité des molécules actives.</p> <p>- Etude en volume.</p> <p>- Analyse thermodynamique possible (analyse calorimétrique différentielle).</p> <p>- Etude par spectrométrie de fluorescence possible (adaptée à l'étude des photosensibilisateurs).</p>	<p>- Composition des feuilletts identiques : pas d'asymétrie membranaire possible.</p> <p>- Organisation de la bicouche variable selon le mode de préparation.</p> <p>- Etat de compaction des lipides non modifiable.</p> <p>- Régime dilué.</p> <p>- Risque d'agrégation et/ou coalescence : stabilité limitée</p>
Monocouche	<p>- Formation d'une couche monomoléculaire par dépôt d'une solution lipidique à l'interface air/tampon sur une balance de Langmuir.</p> <p>- Mesure de la tension de surface par la méthode de Wilhelmy.</p>	<p>- Composition et concentration en lipides finement contrôlées.</p> <p>- Compaction et densité des molécules modifiables.</p> <p>- Nature et température de la sous-phase bien contrôlées</p> <p>- Analyse cinétique, thermodynamique, électrochimique et rhéologique possibles</p> <p>- Microscopies: fluorescence, m. à l'angle de Brewster, AFM</p>	<p>- un seul feuillet ne permet pas de modéliser complètement la membrane ni d'analyser le transport des molécules</p> <p>- Dénaturation irréversible des protéines lors de leur adsorption</p>

		- Structure analysable par diffraction des RX à incidence rasante.	
--	--	--	--

Tableau 1 : Comparaison des différents modèles membranaires

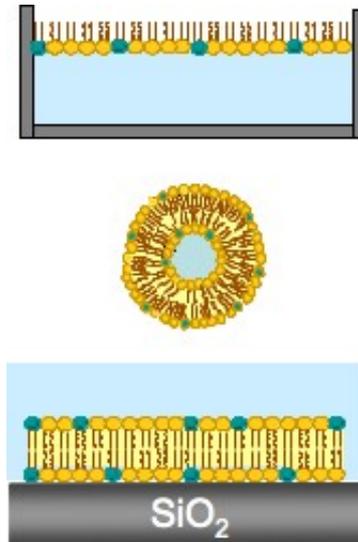


Figure 14 : Trois types de modèles membranaires : monocouche, liposome et bicouche plane supportée.

D.3. Principales techniques d'étude des systèmes moléculaires organisés

D.3.1. Etude des monocouches par mesure de tension/pression superficielle

L'étude de monocouches peut être réalisée par mesure de la tension superficielle à surface constante, à l'aide d'un tensiomètre. Dans la méthode de Wilhelmy, une lame en platine reliée à un capteur de force est happée par la surface du liquide. La tension superficielle γ est reliée à la force exercée sur la lame par la relation $F = p\gamma\cos\theta$ où p représente le périmètre de la lame et θ l'angle de contact entre le liquide et la lame (Figure 15). La différence entre la tension superficielle mesurée à l'interface libre et celle mesurée en présence d'une monocouche adsorbée est appelée pression superficielle et notée π .

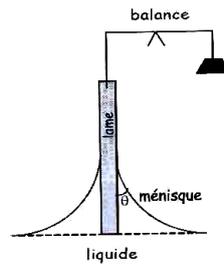


Figure 15 : principe de mesure de tension superficielle par la méthode de la lame de Wilhelmy.

Les balances de Langmuir disponibles dans le commerce fonctionnent sur le même principe que le tensiomètre, mais elles sont plus particulièrement adaptées à l'analyse des monocouches de molécules amphiphiles insolubles. Une barrière mobile affleure la surface du liquide et permet de comprimer les molécules latéralement. Il est possible d'enregistrer une isotherme de compression qui montre l'évolution de la pression superficielle en fonction de l'aire occupée par les molécules selon l'état de condensation de la monocouche. L'analyse de ces isothermes permet une meilleure compréhension des interactions entre molécules qui déterminent leur organisation à l'interface.

Les mesures de pression de surface peuvent être couplées à des mesures de potentiel de surface (Taylor, 2000) qui donnent des informations complémentaires sur l'orientation des molécules à l'interface et sur les propriétés électrochimiques des monocouches, à la microscopie à l'angle de Brewster qui permet de visualiser des domaines organisés (Hénon et al. 1991), à la microscopie de fluorescence, ou encore à la diffraction des rayons X à incidence rasante (Goldmann et al. 1998) qui fournit des informations d'ordre structural sur ces monocouches.

D.3.2. Etude des liposomes par mesure de leur taille et de leur potentiel zêta

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique qui permet d'estimer la taille de populations de liposomes en solution aqueuse en régime dilué, en mesurant la lumière diffusée par effet Doppler de macromolécules dissoutes ou de particules en suspension. La DLS est utilisée pour mesurer le diamètre hydrodynamique, la polydispersité et les effets d'agrégation de suspensions colloïdales. Ces mesures peuvent être couplées à celle du potentiel zêta (ζ) qui fournit des informations sur la

charge globale portée par les liposomes et permet d'anticiper des phénomènes d'agrégation.

D.3.3. L'étude des bicouches planes par QCM-D

La technique de la microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation (QCM-D) est basée sur deux principes différents, dérivés des propriétés piézoélectriques d'un cristal de quartz. D'une part, il est possible, sous certaines conditions d'évaluer la masse d'une couche adsorbée à la surface du cristal, d'autre part, cette technique permet de prendre en compte la modification des propriétés viscoélastique cette couche adsorbée

Les propriétés piézoélectriques d'un cristal de quartz peuvent être décrites de la manière suivante : lorsqu'une contrainte mécanique est appliquée à la surface de ce matériau, celui-ci va se polariser électriquement et générer un courant.

Réciproquement, une tension électrique appliquée à un cristal de quartz induit une déformation mécanique du cristal dépendante du courant appliqué et de l'orientation cristalline du quartz : c'est l'effet piézoélectrique inverse. Un quartz peut être coupé selon différents axes cristallographiques, qui déterminent ses caractéristiques fréquence-température, ainsi que son mode de déformation dominant. Il existe trois modes principaux de déformations : flexion, extension et cisaillement. La géométrie de découpe la plus utilisée par la technologie des QCM est celle dite « AT-cut » , car idéalement, il n'y pas de dérive de la fréquence due à une variation de température si celle-ci est comprise entre 0 et 50 °C. Dans ce cas, le mode de vibration induit par le courant électrique sinusoïdal appliqué est le cisaillement.

Les propriétés piézoélectriques d'un cristal de quartz ont été utilisées pour déterminer la masse d'une couche déposée à la surface, depuis que Sauerbrey, en 1959, a montré que la variation de fréquence de résonance d'un cristal de quartz est proportionnelle à la quantité de matière adsorbée à sa surface, selon la relation suivante :

$$\Delta f = -[2 \times f_0^2 \times \Delta m] / [A \times (\rho_q \times \mu_q)^{1/2}]$$

Avec :

Δf : variation de fréquence mesurée (Hz)

f_0 : fréquence de résonance propre du cristal (Hz)

Δm : variation de la masse par unité d'aire (g/ cm²)

A : aire active de la surface piézoélectrique (cm²)

ρ_q : densité du quartz (2,648 g/cm³)

μ_q : module de cisaillement du quartz (2,947 x 10¹¹ g/cm x s²)

Cette relation est valide sous certaines conditions :

- La masse adsorbée est parfaitement liée à l'électrode et ne glisse pas à la surface du quartz.
- Elle est idéalement élastique, c'est-à-dire que la couche adsorbée n'a pas de composante visqueuse et ne dissipe donc pas d'énergie.
- La masse déposée forme une couche uniforme

Dans les années 1980, des travaux ont montré qu'un quartz immergé dans un liquide peut être excité avec une oscillation stable (Nomura et Lijima, 1981) et que la variation de fréquence due au liquide est quantifiable (Kanazawa et al. 1985). A partir de ce moment, cette technique a servi à quantifier *in situ* les dépôts de matière organique, comme l'adsorption de protéines (Muratsugu et al. 1993) ou les interactions molécules/molécules, par exemple la détection d'antigènes par des anticorps (Avela et al. 2007).

Pour les couches organiques déposées en milieu liquide, l'eau couplée aux molécules adsorbées alourdit artificiellement la masse adsorbée et calculée par Sauerbrey : on parle ainsi de masse hydratée. De plus, la présence de composante visqueuse pour un matériau, ce qui est typiquement le cas pour les couches molles épaisses type polymères ou liposomes, atténue la vibration du quartz, et dans ce cas, la proportionnalité entre variation de fréquence de résonance et masse adsorbée ne peut plus être considérée comme valable. C'est pourquoi la mesure de la dissipation du signal, c'est à dire sa perte d'énergie au cours du temps a été couplée à la technique de QCM. Initialement mesurée par impédance en la combinant avec la QCM, le couplage de ces deux approches sur un même appareil a été proposé à la fin des années 90 par l'équipe du Pr Kasemo à Göteborg (Suède). L'approche est différente de l'impédance classique, puisque dans ce cas, on mesure l'atténuation de la vibration au cours du temps une fois que le signal d'excitation

électrique est coupé. L'atténuation de l'onde mécanique dépend alors des propriétés viscoélastiques des couches adsorbées dans lesquelles elle se propage : celles ayant une composante visqueuse élevée atténuant beaucoup plus l'oscillation mécanique que des couches rigides. La QCM-D est l'appareil commercial issu de ces travaux.

Les harmoniques, c'est-à-dire les composantes de la vibration principale du cristal de quartz, dont les fréquences associées sont des multiples entiers impairs de la fréquence fondamentale peuvent être mesurées. A un numéro d'harmonique élevé correspond une aire sensible plus étroite, une amplitude de la vibration plus faible et un amortissement rapide. Les différentes harmoniques permettent de sonder le système adsorbé à différentes profondeurs et fournissent des informations sur son homogénéité. L'appareil permet ainsi de mesurer la variation de fréquence d'oscillation du quartz en fonction du temps jusqu'à la 13^{ème} harmonique. Le profil de vibration du quartz dépend de l'harmonique considérée : à la fréquence fondamentale, la surface soumise au cisaillement et l'amplitude de cisaillement sont maximales, cependant, des effets de bords peuvent survenir et perturber la mesure, ce qui diminue la sensibilité de l'appareil. Généralement, seuls les enregistrements obtenus à partir de la troisième ou de la cinquième harmonique sont pris en compte, pour éviter un artefact dû au joint ou au serrage de l'appareil. Quand l'estimation de la masse n'est pas réalisable (cas d'une couche discontinue ou qui glisse par rapport à la surface par exemple) l'utilisation de différentes harmoniques sur une même mesure n'est pas nécessaire.

La QCM-D permet de former des bicouches lipidiques sur une surface de quartz par rupture spontanée de liposomes ou transfert Langmuir-Blodgett de monocouches (Richter et al. 2006). Par exemple, un film homogène et rigide telle qu'une bicouche phospholipidique donnera un abaissement de la fréquence de vibration de -25/-26 Hz (-12/-13 Hz par feuillet) et une faible dissipation de 0,1 à $0,3 \times 10^{-6}$.

Comme la résonance plasmonique de surface (SPR), la QCM-D peut être utilisée pour mettre en évidence des interactions récepteur/ligand. Dans ce cas, le récepteur est fixé ou adsorbé à la surface (Briand et al. 2007) et le ligand est introduit dans le flux aqueux. Ceci a été exploité par A. Makky dans sa thèse pour analyser les

interactions porphyrines glycoconjuguées/lectine (Makky et al. 2010b et 2011). Ces travaux seront présentés plus loin.

D.4. Etablissement d'un modèle membranaire du rétinoblastome

D.4.1. Etude avec des modèles simples

Plusieurs modèles lipidiques ont été proposés pour étudier l'interaction des photosensibilisateurs avec la membrane cellulaire. Les premiers essais ont été réalisés sur des micelles et des liposomes (Ricchelli, 1995), mais rapidement ces derniers ont pris l'avantage, leur structure compartimentée mimant mieux les situations spécifiques qui se produisent dans les cellules et les tissus (Hoebeke, 1995). Les liposomes étaient constitués d'un ou deux phospholipides avec ou sans cholestérol mimant la membrane plasmique, avec éventuellement de la cardiolipine, principal constituant de la membrane mitochondriale interne (Ricchelli et al. 1991). La plupart des études avec des modèles a été réalisée à un pH inférieur au pH physiologique ; en effet, la réserve en oxygène est généralement insuffisante pour subvenir aux besoins nutritionnels élevés des tumeurs solides en phase de croissance intense. L'énergie supplémentaire est en partie fournie par du glucose métabolisé via la voie anaérobie, entraînant ainsi la production d'acide lactique dans les cellules, la production et la consommation de proton n'étant pas équilibré pendant ce processus. L'excès d'acide produit au sein des cellules est transporté par la suite vers le milieu extérieur, réduisant ainsi le pH des fluides interstitiels environnants (Brault, 1990). Le pH des tumeurs peut varier de 5,8 à 7,6 (Wike-Hooley et al. 1984).

D.4.1.1. Influence des caractéristiques physico-chimiques des PS sur les interactions avec des modèles simples

Les analyses sur les modèles membranaires ont montré que les modifications de structure des PS pouvaient en améliorer l'efficacité. En effet, elles influent sur les caractéristiques physico-chimiques du PS, jouant ainsi sur l'interaction des molécules avec les membranes, mais aussi sur la profondeur de pénétration dans la bicouche. Les interactions entre PS et membranes sont favorisées lorsque les molécules sont à l'état de monomères. Or, nous savons que les PS ont tendance à s'agréger en milieu aqueux à cause de leur caractère hydrophobe. L'hydrophobicité des PS est d'ailleurs

un paramètre majeur qui influe également sur la profondeur de pénétration des molécules. Des mesures de fluorescence à l'aide d'un quencher comme le methylviologen (Ricchelli et al. 1990) ou l'iodure I⁻ (Lavi et al. 2002, Bronshtein et al. 2004), mais aussi par des mesures d'anisotropie (Lavi et al. 2002) ont permis de mettre en évidence les différences de localisation des molécules en fonction de leur hydrophobicité. A titre d'exemple, les mesures de profondeur de pénétration de l'haematoporphyrine HP et la protoporphyrine PP, respectivement modérément et hautement hydrophobes, dans des liposomes unilamellaires de DDPC ont montré qu'à faible concentration (0,5 μM), les deux porphyrines se retrouvaient dans le feuillet interne, mais que l'HP se localisait au voisinage des têtes polaires. Lorsque la concentration est augmentée, les porphyrines se placent également dans le feuillet externe (Ricchelli et al. 1990). Un autre exemple plus récent, tiré de l'étude d'Ibrahim et al. en 2011 sur des porphyrines tétra- et triglycoconjuguées a aussi permis de souligner l'influence de l'hydrophobicité des PS sur leur pénétration dans les membranes : ils ont en effet observé que la tétraphénylporphyrine (TPP) triglycoconjuguée s'inséraient plus profondément que la molécule tétraglycoconjuguée, dont le cycle TPP, entouré de 4 sucres, ne pouvait pas facilement pénétrer au sein des chaînes aliphatiques et restait localisé au niveau des cholines. Une conclusion analogue avait été tirée par Desroches et al. (2004) après des études en monocouches.

D.4.1.2. Influence de la fluidité membranaire sur la pénétration et la distribution des PS au sein des membranes

L'augmentation de la microviscosité des membranes peut jouer un rôle majeur dans la pénétration des PS.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'équipe de Philippe Maillard à l'Institut Curie d'Orsay a synthétisé de nombreuses molécules, dérivées de tétraphénylporphyrines (Desroches et al. 2004, Laville et al. 2006, Ballut et al. 2010) ou de tétraphénylchlorines (Laville et al. 2003), sur lesquelles sont greffées diverses structures osidiques. Afin d'évaluer les interactions spécifiques et non spécifiques de ces photosensibilisateurs avec les membranes cellulaires, des études de physico-chimie aux interfaces ont été menées.

Des expériences sur balance de Langmuir et par diffraction des rayons X à incidence rasante sur 3 meso tétraarylporphyrines métabstituées par des glucoses (tri, tetra et non glycoconjuguée) ont montré que la porphyrine tétraglucoconjuguée interagissait peu avec les molécules de phospholipides, se mélangeant mal et s'insérant peu profondément dans la monocouche. En revanche, les dérivés non glucococonjugué et tri-glucoconjugué étaient capables de déstructurer complètement des monocouches de DSPC (18:0). Ces molécules étaient donc susceptibles de pénétrer plus profondément dans la membrane biologique que la molécule tétraglucoconjuguée. L'effet était moins spectaculaire avec la DAPC (20:0) dont les longues chaînes interagissaient préférentiellement entre elles (Desroches et al. 2004).

Dans ce travail, l'interaction entre les porphyrines et les phospholipides n'a été étudiée qu'en prenant les phospholipides séparément et sans ajouter de cholestérol. Le choix des phospholipides à longues chaînes saturées (en phase gel à la température d'expérience) était dicté par les mesures de diffraction des rayons X à incidence rasante, qui ne permettaient pas de d'enregistrer des spectres de diffraction sur des monocouches de phospholipides fluides. Or, cela ne correspond pas à la réalité.

D.4.2. Elaboration d'un modèle complexe

Ali Makky a développé, dans le cadre de son travail de thèse, les premiers modèles artificiels de la membrane du rétinoblastome. Les seules données disponibles dans la littérature concernent la composition en phospholipides et en cholestérol de la membrane rétinienne saine de vertébrés. Les phospholipides majeurs des membranes du segment extérieur des bâtonnets (ROS, Rod Outer Segment) de la rétine saine sont la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine dans des proportions molaires respectives d'environ 4/4/1 (Fliesler et Anderson, 1983).

Pour mimer la membrane des cellules du rétinoblastome, Ali Makky est parti de l'hypothèse que la fraction molaire en phospholipides restait la même que dans le

cas d'une rétine saine. Les phospholipides SOPC, SOPE et SOPS ont donc été choisis pour mimer la membrane des cellules de rétine en proportion (4/4/1). Les chaînes SO (18:1-18:0) ont été sélectionnées pour mimer les chaînes longues et insaturées présentes dans les membranes rétiniennes.

En ce qui concerne le cholestérol, sa concentration molaire varie selon la nature et la fonction des cellules ainsi qu'en fonction de l'âge de l'organisme vivant : il est admis qu'un jeune enfant possède une proportion plus élevée de cholestérol dans ses membranes qu'un adulte. Dans le cadre de notre étude, il est aussi important de préciser que les cellules tumorales possèdent souvent des concentrations de cholestérol plus élevées que les cellules saines (Garcia et al. 1997). Dans le cas du rétinoblastome, des études ont montré une concentration molaire en cholestérol dans les membranes pouvant varier entre 20 et 30% de la composition lipidique totale, alors que les cellules rétiniennes saines n'en contiennent que 10% (Fliesler et Anderson, 1983).

Du cholestérol a donc été ajouté au mélange de phospholipides. Trois modèles ont ainsi été créés, nommés M0, M1, M2 et M3, sous forme de monocouches, liposomes et/ou bicouches planes, avec des proportions molaires croissantes en cholestérol : 0, 10, 20 et 30% respectivement. Le modèle M1 représentait la membrane de rétine saine, alors que M2 et M3 étaient des modèles de la membrane du rétinoblastome.

Makky a d'abord étudié l'influence du cholestérol sur l'organisation des modèles membranaires sous forme de monocouches à l'aide d'une balance de Langmuir. Il a montré, en comparant les isothermes de compression des monocouches de M0, M1, M2 et M3, que le cholestérol a un effet condensant sur l'organisation des phospholipides dans la monocouche : quand la proportion de cholestérol varie entre 0 et 30%, la variation d'aire associée aux molécules de phospholipides atteint -36%.

D.4.2.1. Mise en évidence des interactions non spécifiques

Makky a ensuite étudié les interactions non spécifiques des 3 porphyrines dendrimériques synthétisées par l'équipe de Ph. Maillard (Figure 11) avec les différentes compositions modèles de la membrane du rétinoblastome sous forme de monocouches, liposomes et bicouche plane.

L'injection des porphyrines dendrimériques sous les monocouches SOPC/SOPE/SOPS/CHOL (M1, M2 et M3) a révélé que ces molécules sont capables d'interagir et de pénétrer dans les monocouches de lipides, même lorsque celles-ci sont fortement condensées. Cependant, il a été noté une différence entre la porphyrine dendrimérique non glycoconjuguée (TPP-1c) qui ne pénètre dans la monocouche que jusqu'à la pression initiale de 28 mN/m et les porphyrines glycodendrimériques (TPP-1 et TPP-2) qui sont capables d'augmenter la pression de surface même lorsque la pression initiale de la monocouche est de 35 (TPP-1) ou 42 mN/m (TPP-2). La présence de sucre renforce apparemment l'interaction entre la porphyrine et la monocouche. L'interprétation qui a été proposée est que jusqu'à 28 mN/m, le macrocycle de la TPP peut pénétrer dans les monocouches, mais qu'au delà, l'élévation de pression de surface observée pour les porphyrines glycodendrimériques résulterait d'une interaction entre les sucres et les têtes polaires des phospholipides avec la formation de liaisons hydrogènes, interaction qui modifierait l'orientation des molécules de phospholipides et conduirait à un incrément de pression (Makky et al. 2010a).

Les résultats en monocouche montrent aussi qu'une proportion croissante de cholestérol de 10 à 30% (mol) n'a pas d'effet sur l'interaction entre les porphyrines dendrimériques et les monocouches (Makky et al. 2010a). L'interaction des porphyrines dendrimériques avec des liposomes de composition M1, M2 et M3 a été également étudiée par spectroscopie de fluorescence. Les résultats indiquent que le taux de cholestérol n'a, là encore, pas d'influence sur le partage des porphyrines dans les liposomes modèles.

Ceci va à l'encontre de plusieurs travaux. Ricchelli et al. (1990) ont étudié les propriétés de pénétration et de distribution de l'hématoporphyrine (HP) et de la protoporphyrine (PP), dans des liposomes unilamellaires de DPPC. La distribution de ces porphyrines dans la membrane liposomiale a été examinée par spectroscopie de fluorescence avec quenching. Leurs résultats montrent que les deux porphyrines se localisent principalement dans le feuillet interne du liposome de DPPC, avec une préférence de la HP pour les zones polaires. Lorsque du cholestérol est ajouté dans la composition du liposome (20% en masse), la fluidité membranaire est modifiée, et les auteurs observent une redistribution des molécules : les molécules de HP

préfèrent rester dans les zones riches en DPPC, alors que celles de PP s'intègrent dans les domaines apolaires riches en cholestérol. Il est à noter toutefois que la nature des phospholipides est différente dans les deux études : la température de transition de phase de la DPPC est de 41°C, tandis que celle des mélanges de SOPC, SOPE et SOPS est comprise entre -6 et +5°C (Makky et al. 2010a). Or, le cholestérol peut ne pas montrer d'effet significatif sur des phospholipides en phase fluide, alors qu'il en a un sur ceux en phase gel, comme la DPPC (Sabatini et al. 2008). D'autres études montrent qu'un effet peut exister dans les deux cas, mais qu'il est inverse. Ce point sera évoqué plus loin, dans le paragraphe consacré à la lipidomique.

Kerdous et al. qui ont étudié en 2011 l'affinité d'une chlorine (Ce6) pour des membranes modèles de DPPC ou de DOPC avec ou sans cholestérol ont montré que l'affinité du PS pour les membranes était multipliée par 2,5 lorsque la proportion en cholestérol passait de 0 à 50%. Cet aspect de l'interaction des porphyrines dendrimériques avec le cholestérol mériterait une étude plus approfondie.

Les mesures de quenching à l'iodure de potassium ont révélé une profondeur de pénétration de la porphyrine non glycodendrimérique dans la membrane liposomiale légèrement supérieure à celle des dérivés glycoconjugués qui, eux, ont des profondeurs de pénétration similaires (Makky et al. 2010a). Néanmoins, en raison de leur caractère hydrophile, les porphyrines glycodendrimériques (TPP-1 et TPP-2) possèdent de meilleures propriétés de surface que la porphyrine non glycodendrimérique (TPP-1c) et sont capables de pénétrer de manière passive dans les couches lipidiques même à des taux de lipide/porphyrine faibles. Enfin, l'interaction entre le modèle M3 sous forme de bicouche plane supportée et les porphyrines dendrimériques a été examinée par QCM-D (Makky et al. 2011). Les mesures montrent l'absence d'interaction non spécifique (et donc de pénétration) entre les porphyrines dendrimériques et la bicouche lipidique modèle.

D.4.2.2. Modèle membranaire du rétinoblastome greffé avec une lectine

D.4.2.2.1. Elaboration du nouveau modèle

Pour aller plus loin et étudier les interactions spécifiques entre les porphyrines dendrimériques et les cellules de rétinoblastome, Makky a fonctionnalisé ses

modèles membranaires à 4 composants avec de la concanavaline A. Il s'agit d'une lectine spécifique du mannose, choisie comme modèle du récepteur exprimé par les membranes du rétinoblastome, qui a été utilisée, libre ou greffée à la surface des modèles (liposomes et bicouches planes). La caractérisation du nouveau modèle membranaire (lipide + protéine) a été réalisée par spectrométrie de fluorescence et des expériences de QCM-D (Makky et al. 2011).

D.4.2.2.2. Etude des porphyrines dendrimériques avec le nouveau modèle : mise en évidence des interactions spécifiques

Les porphyrines dendrimériques sont peu solubles en milieu aqueux et forment des agrégats. Par ailleurs leur faible masse est difficilement détectable par QCM-D. Profitant de leurs propriétés de surface et de leur interaction favorable avec les phospholipides, Makky a incorporé ces porphyrines dans la membrane de liposomes de DMPC. Cette stratégie permet de « solubiliser » les molécules de porphyrine, avec un macrocycle incorporé dans la zone apolaire de la membrane du liposome, réduisant ainsi les interactions non spécifiques, et des sucres exposés vers l'extérieur, permettant à la Con A de les reconnaître. Elle permet aussi d'améliorer le signal de la QCM-D.

L'interaction entre ces liposomes portant les porphyrines dendrimériques et la concanavaline A libre ou greffée à la surface de vésicules de SOPC/SOPE/SOPS/CHOL a été étudiée par diffusion de lumière (Makky et al. 2010b et 2011). Les résultats montrent une absence d'interaction entre les liposomes blancs ou portant la porphyrine non glycoconjuguée (TPP-1c) et la lectine libre ou les liposomes modèles greffés de Con A. En revanche, l'addition de concanavaline A, libre ou greffée sur les liposomes modèles, aux vésicules portant les porphyrines glycodendrimériques (TPP-1 et TPP-2) génère la formation d'agrégats. L'interaction spécifique est renforcée pour la porphyrine portant l'espaceur le plus long (Makky 2011). Ces résultats ont été confirmés par des expériences menées avec la QCM-D sur une couche de lectine directement greffée à la surface du capteur (Makky et al. 2010b) ou à une bicouche plane de composition M1 préformée sur le capteur de QCM-D (Makky et al. 2011). L'utilisation d'un compétiteur de liaison à la Con A a permis de confirmer le caractère spécifique de l'interaction mannose-Con A.

D.4.2.2.3. Comment valider le modèle ?

D.4.2.2.3.1. Interactions spécifiques : identifier les récepteurs surexprimés à la surface des cellules de rétinoblastome

La reconnaissance sucre-lectine a été démontrée sur un modèle de membrane cellulaire (Ballut et al. 2009, Makky et al. 2010, 2011), alors qu'elle n'avait pas pu être mise en évidence par les études de culture cellulaire. Pourtant récemment, l'équipe du Dr Marcel Garcia à Montpellier a confirmé la présence de plusieurs récepteurs à mannose à la surface des cellules Y79.

La famille des récepteurs au mannose est un sous-groupe de la super famille des lectines de type C, protéines transmembranaires également appelées CLEC, C signifiant la présence nécessaire de calcium pour la liaison du ligand au récepteur. Elle comprend plusieurs glycoprotéines, chacune d'entre elle étant un récepteur transmembranaire de type I, toutes avec une structure commune :

- Une extrémité N-terminale riche en cystéine (CR, Cystein-Rich).
- Un seul domaine de fibronectine (FnII), domaine extracellulaire le plus conservé avec 44 à 63% de similitude dans les séquences des différents récepteurs de cette famille.
- 8 à 10 domaines de CTLD (C-type Lectin-Like Domain).

En 2006, East et Isacke relevaient quatre glycoprotéines appartenant à la famille des récepteurs au mannose :

- MRC-1
- DC 205 ou DEC 205
- PLA₂R
- Endo 180 ou uPARAP

Grâce aux domaines présents dans leur partie cytoplasmique, tous les récepteurs de cette famille ont la capacité d'être rapidement internalisés de la membrane plasmique vers l'intérieur de la cellule par des vésicules recouvertes de clathrines, pour être par la suite délivrés au système endosomal, puis recyclés à la surface de la membrane plasmique. A l'état d'équilibre, 10 à 30% des récepteurs sont exprimés à la surface de la membrane plasmique. Il a également été estimé que les récepteurs médiant l'endocytose sont internalisée et recyclés à la surface de la membrane plasmique au

moins 10 fois par heure (Steinman et al. 1983). L'internalisation des récepteurs par les vésicules de clathrines nécessite un signal au sein du domaine cytoplasmique, permettant l'association aux protéines transmembranaires. Cela se produit grâce aux protéines adaptatrices qui, non seulement, lient les récepteurs aux molécules de clathrines, mais aussi recrutent les protéines transmembranaires aux puits recouverts de clathrines (Mellman et al. 1996). Une fois pris en charge par les puits de clathrines, les récepteurs sont internalisés dans des endosomes précoces et à ce stade, soit :

- les récepteurs sont isolés et recrutés à la surface grâce à des vésicules dédiées qui fusionnent avec la membrane plasmique ; soit
- ils sont délivrés aux endosomes tardifs, contenant des hydrolases lysosomales, puis aux lysosomes, compartiment intracellulaire final de la dégradation.

En 2000, Mahnke et al. ont observé que la plupart des récepteurs au mannose sont localisés dans des endosomes précoces lors de leur internalisation. Le résidu tyrosine (Tyr) du domaine cytoplasmique serait indispensable pour l'endocytose et les résidus Tyr-Phe nécessaires pour le recyclage du récepteur à partir de vésicules après les endosomes précoces. DEC 205, ayant un domaine cytoplasmique tronqué, a une destination intracellulaire différente des autres récepteurs au mannose, étant pris en charge par l'endosome tardif. Néanmoins, ces récepteurs sont tout de même recyclés à la membrane. La figure 16 résume leur parcours:

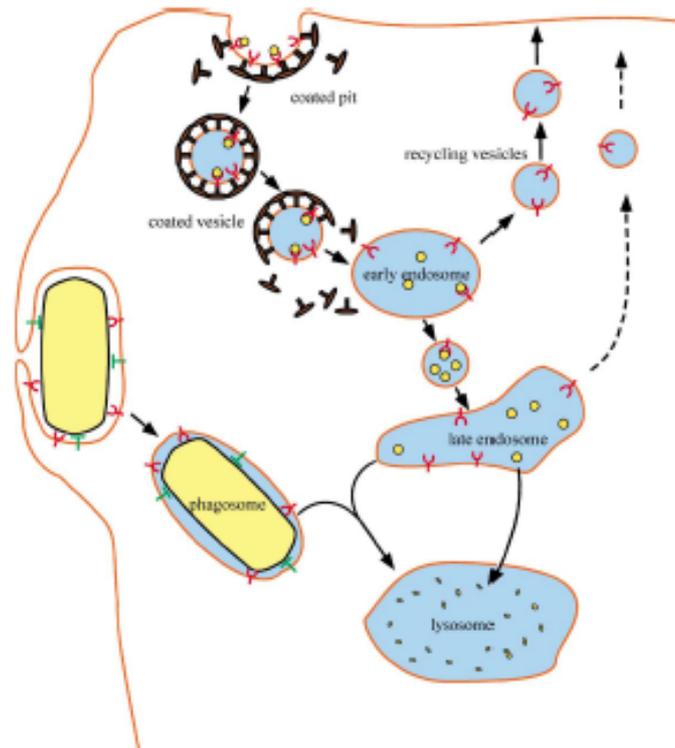


Figure 16 : endocytose des récepteurs au mannose (cercle jaune : ligand) d'après East et Isacke, 2002

Récemment, Marcel Garcia et son équipe ont initié une étude d'identification par Western-Blot des récepteurs aux sucres/mannose des cellules de rétinoblastome Y79 et WERI Rb1. Ils ont montré que les cellules exprimaient à leur surface des lectines de type C des groupes VI (MRC-1 et LY 75, East et Isacke, 2002) et II (DC 209).

- Les lectines de type C du groupe VI possèdent, en plus des propriétés communes à toutes les lectines de type C énoncées plus haut, une queue cytoplasmique courte (Jiang et al. 1995). MRC 1, protéine de 175 kDa (Lennartz et al. 1987) est codée par le gène MRC-1 localisé sur la chromosome 10 et se lie avec une haute affinité à ses ligands, les internalisant par un mécanisme d'endocytose (RefSeq, Apr 2011). Elle possède 8 domaines de reconnaissance des sucres (Figure 17). MRC-1 est principalement retrouvé sur les cellules du système immunitaire.

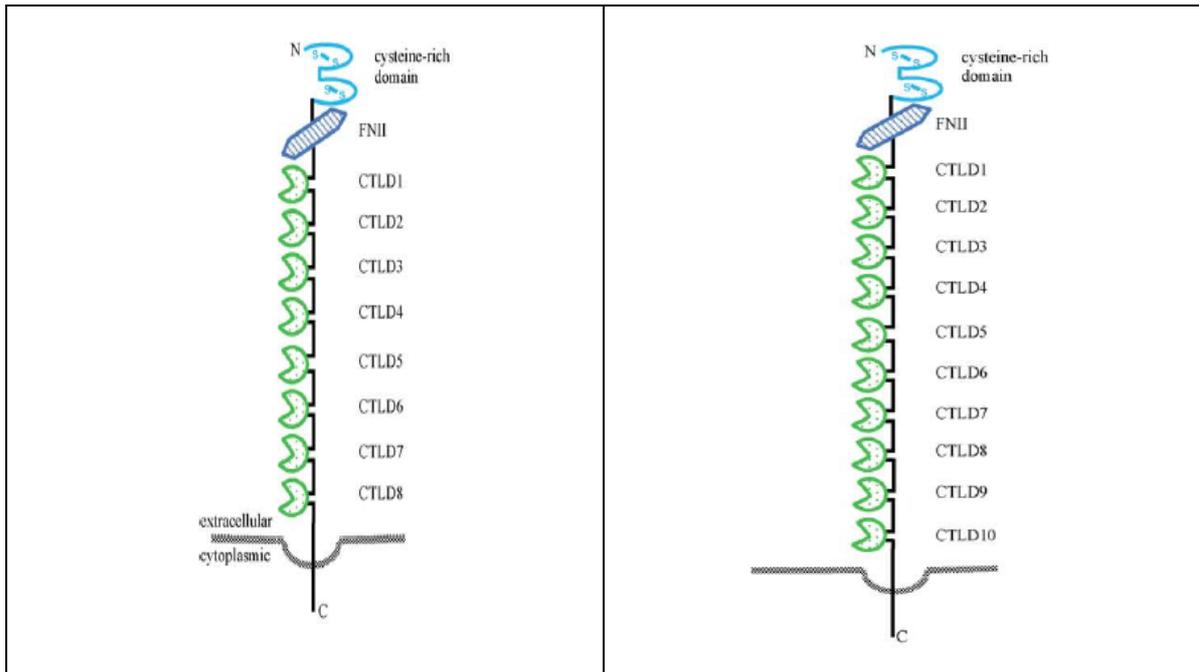


Figure 17 : structure du récepteur MRC-1 (à gauche) et structure du récepteur LY 75 (à droite)

LY 75, appelé initialement DEC 205 (Figure 17) quand il a été découvert à la surface de cellules dendritiques de souris (Kraal et al. 1986), est une glycoprotéine de 200 kDa (d'où son nom gp 200-MR6, puis CD 205) codée par le gène LY75 situé sur le chromosome 2. La spécificité vis-à-vis du ligand reste méconnue (Kato et al. 2000). Il possède 10 domaines de reconnaissance des sucres. DEC 205 est exprimé à la surface des cellules dendritiques mais il a aussi été détecté à la surface de certains épithéliums, de cellules B, de cellules de moelle osseuse et de cellules endothéliales (Witmer-Pack et al. 1995). Il est intéressant de noter que l'expression de DEC 205 est liée à la différenciation et à l'inhibition de la maturation cellulaire : certaines lignées colorectales hautement différenciées expriment fortement DEC 205 contrairement à des lignées plus faiblement différenciées où l'expression de DEC 205 est faible (Al-Tubuly et al. 1997). La perte de l'expression de DEC 205 serait dans certains cas (carcinomes invasifs du sein et du rectum) associée au caractère malin de tumeur (Al-Tubuly et al. 1996). Ce phénomène n'apparaît pas dans le cas des cancers de la vessie (Tungekar et al. 1996). DEC 205 pourrait avoir un rôle suppresseur de tumeur en inhibant la division cellulaire et en favorisant la différenciation ce qui se ferait via l'interaction entre DEC 205 et le récepteur de l'IL-

4. DEC 205 modulerait en effet ce récepteur. Concernant le rétinoblastome, nous n'avons pas d'informations sur le rôle de DEC 205.

- Les lectines de type C du groupe II (asiaglycoprotéines ou récepteurs spécifiques des cellules dendritiques) comme DC SIGN (Dendritic Cell-Specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) également nommée CD 209 (Figure 18), codée par le gène CD 209 sur le chromosome 19.

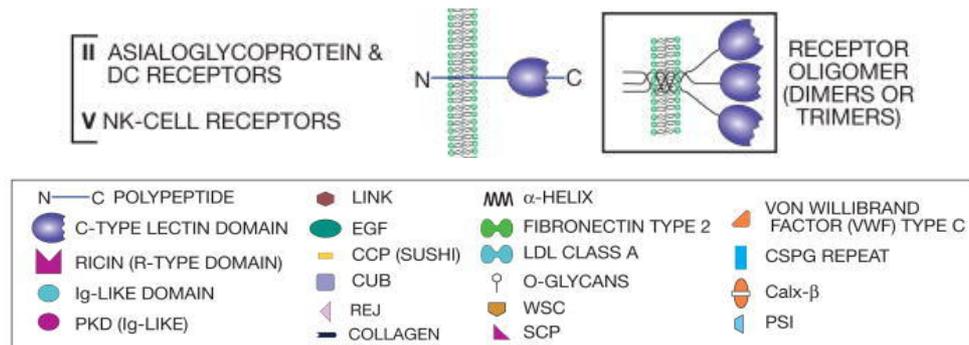


Figure 18 : structure des lectine de type C du groupe II (d'après Varki et al. 2009)

DC SIGN est également une protéine transmembranaire avec mécanisme d'endocytose se liant préférentiellement aux glycanes mannosylés ou fucosylés (van Liempt et al. 2006). La liaison du CTLD au glycane dépend de la nature et de la conformation spatiale du monosaccharide, comme le montre la figure 19;

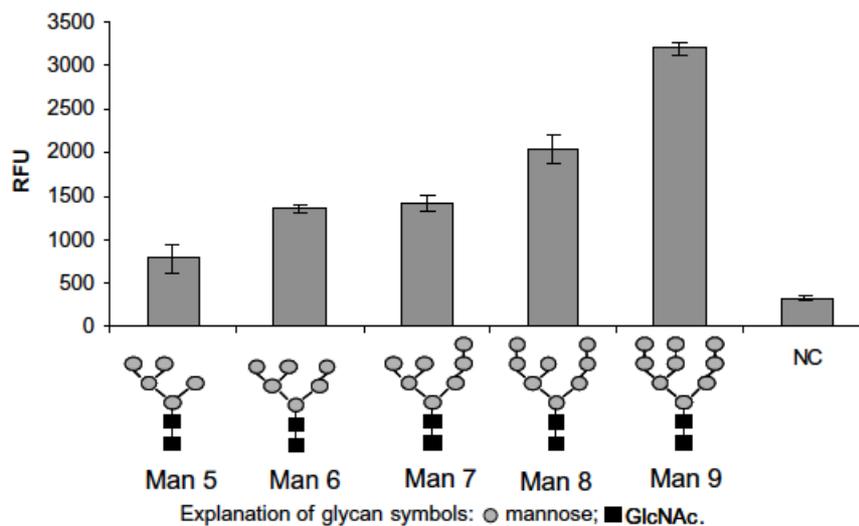


Figure 19 : liaison de divers N-glycanes-oligomannosylés à DC SIGN évalué par fluorescence (d'après van Liempt et al. 2006)

En conclusion, l'endocytose des ligands par les lectines de type C peut mener à l'accumulation puis à la dégradation des récepteurs par les phagolysosomes ou par un recyclage de ces derniers à la surface des cellules. La voie d'endocytose dépend du ligand. Utiliser un cluster visant les domaines CR permet de déterminer l'affinité et la spécificité des lectines pour leur ligand, chaque domaine se liant indépendamment au sucre (Varki et al. 2009).

Il existe au moins 3 récepteurs différents au mannose à la surface des cellules Y79, tous avec des affinités propres pour leur ligands. Nous ne savons pas si les molécules étudiées par Ali Makky sont prises en charge par un, deux ou les 3 récepteurs.

D.4.2.2.3.2. Interactions non spécifiques : valider la composition lipidique

Pour valider le modèle membranaire et le rendre le plus mimétique possible de la membrane cellulaire en s'axant sur les paramètres essentiels influant sur la pénétration des molécules dans les membranes cellulaires, il faut principalement s'assurer de:

- la composition en phospholipides (nature de la tête polaire et longueur des chaînes carbonées) ; et de
- la présence ou non de cholestérol et de sa concentration.

La nature des têtes polaires des phospholipides ainsi que la concentration en cholestérol dans les membranes sont effectivement des paramètres importants : la composition du mélange influencera les interactions entre les dérivés porphyriniques et le modèle membranaire. Par ailleurs, ainsi qu'il a été évoqué plus haut, il est bien connu que la présence de cholestérol a un effet sur l'organisation des phospholipides. Il se mélange différemment avec les phospholipides en fonction de la longueur et du degré de saturation de leurs chaînes d'hydrocarbures, ainsi que de la nature de leur tête polaire. Il possède une fonction complexe de condensation ou d'expansion selon le lipide avec lequel il interagit. On sait par exemple que l'état physique des phospholipides est un paramètre important à considérer : le cholestérol condense les lipides lorsqu'ils sont en phase lamellaire fluide (augmentation de

l'ordre des lipides et donc de la rigidité de la membrane) et réduit au contraire le degré d'ordre des lipides lorsqu'ils sont en phase lamellaire gel (Filippov et al. 2003, Leathes, 1925). Cheetham et al. (1989) ont montré de plus que la solubilité du cholestérol est plus faible dans les domaines composés d' amino-phospholipides que dans ceux de phosphatidylcholines. Cela a été confirmé par McMullen et al. (1999) qui ont attribué la miscibilité latérale limitée du cholestérol dans des bicouches de phosphatidyléthanolamine par rapport aux bicouches de phosphatidylcholine aux liaisons hydrogène entre groupements polaires et aux interactions électrostatiques entre molécules de phosphatidyléthanolamine, favorisant les contacts entre phospholipides plutôt que les interactions cholestérol-phospholipides. Le cholestérol a aussi montré une solubilité limitée dans les phosphatidylsérines, induisant une séparation de phase dans les monocouches et formant des cristallites à des fractions molaires supérieures à 0,3 (Bach et al. 1992 et 2003, Epanand et al, 2001). Pour SOPS (1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine), des cristallites ont même été observées à partir de la fraction molaire 0,2 (Makky et al. 2010a).

Dynarowicz et Hac-Wydro (2004) ont étudié les mélanges PC/cholestérol en analysant les isothermes de compression de leurs monocouches. Leurs résultats montrent que les mélanges les plus stables sont obtenus avec les PC ayant les chaînes complètement saturées ; de plus, lorsque la nature de la tête polaire est changée de PC à PE, le mélange devient instable.

La longueur des chaînes carbonées est également à prendre en compte. Les membranes rétiniennes, comme toutes les membranes neurales, sont particulièrement riches en phospholipides à très longues chaînes et à plusieurs insaturations, en particulier en acide docosahexanoïque (22 : 6), représentant entre 20 à 50% des acides gras liés aux phospholipides dans les membranes rétiniennes (Fliesler et Anderson, 1983). Des études ayant montré que des concentrations inadéquates de cet acide gras pouvait mener à des troubles de la vision (Leaf et al. 1996), il est donc tout particulièrement intéressant de s'intéresser aux longueurs et insaturations des chaînes présentes dans le cas du rétinoblastome.

E. La lipidomique

Pour valider et compléter le modèle membranaire, il est donc nécessaire de confronter le modèle membranaire précédemment établi à la composition réelle en lipides des membranes cellulaires de rétinoblastome. Cela est depuis quelques années possible grâce à l'émergence d'une nouvelle discipline, l'analyse lipidomique, permettant de déterminer la composition et la proportion des différents lipides membranaires. Comme le montre le graphe de la figure 20, le développement de la lipidomique est récent. Les premières références sur les aspects fonctionnels de la lipidomique sont apparues en 2003 avec Lagarde et 2005 avec Feng. L'analyse lipidomique est portée par la technologie, en particulier la spectrométrie de masse mais aussi par des approches complémentaires pour la détection et la caractérisation des lipides et des enzymes.

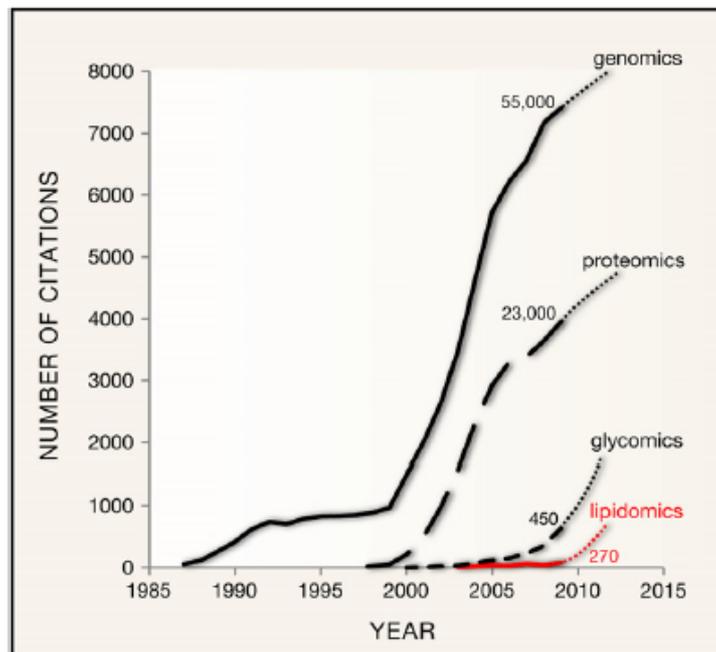


Figure 20 : Importance de la lipidomique dans les publications ces dernières années (d'après Wenk, 2010).

La lipidomique définit un nouveau champ d'analyse systématique des lipides et des facteurs interagissant avec ces derniers (Wenk, 2005). L'engouement qu'elle suscite est lié aux récentes découvertes sur le rôle des lipides, trop souvent considérés comme simple matériel de construction des membranes et source d'énergie. Désormais il est connu qu'ils possèdent aussi des rôles cruciaux dans le métabolisme cellulaire, ce qui justifie alors la grande variété d'espèces lipidiques

(estimée entre 10 000 et 100 000 espèces) présente dans l'organisme (Wenk, 2010). C'est le cas des céramides, en particulier. Certains sont des réservoirs de production des seconds messagers comme les sphingolipides qui sont impliqués dans la synthèse de régulateurs de la réponse immunitaire. Les céramides sont impliqués dans la prolifération, la migration et la mort cellulaire : ils sont responsables de l'apoptose des cellules lorsque leur proportion augmente. Ils sont aussi des précurseurs, par exemple de la sphingosine 1-P synthétisée par l'enzyme SK1 (sphingosine 1 kinase), qui est un médiateur lipidique interagissant avec les facteurs de croissance responsables de l'angiogénèse (Liu et al. 2001). La surexpression de l'enzyme SK1 provoque ainsi la formation de tumeur chez les souris (Xia et al. 2000). Les lipides analysés dans les milieux biologiques en lipidomique peuvent être des lipides circulants ou des lipides membranaires. Ces derniers sont également impliqués dans des interactions protéines-lipides (par exemple les phosphoinositides, dérivés phosphorylés des phosphatidylinositols qui sont des lipides signaux: ils phosphorylent ou déphosphorylent certaines protéines, mécanisme majeur dans la signalisation cellulaire) (Wenk, 2005). Le tableau 3 montre quelques exemples de lipides impliqués dans les processus de cancérisation :

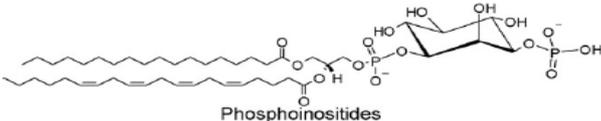
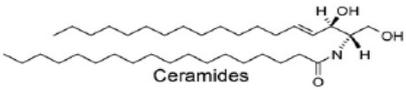
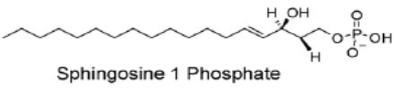
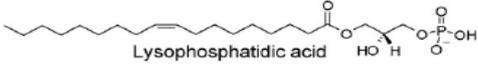
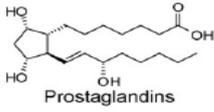
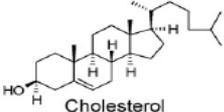
Lipid/structures	Link to cancer	Functions	
 <p>Phosphoinositides</p>	Increased levels in breast, prostate, ovarian, gastric and lung cancer tissues [22-25]	Signaling function for cell growth, proliferation and motility	Glycerophospholipids
 <p>Ceramides</p>	Decreased levels in breast, ovarian, prostate cancer tissues [27]	Cell cycle arrest, apoptosis and senescence	
 <p>Sphingosine 1 Phosphate</p>	Released from cancerous tissues [36-39]	Potent tumorigenic and angiogenic properties	Sphingolipids
 <p>Lysophosphatidic acid</p>	Increased in serum of patients with ovarian cancer [42-45]	Increases metastasis	Lypo lipids
 <p>Prostaglandins</p>	Secreted by tumor cells; autocrine functions [50]	Angiogenesis, invasion and inhibition of apoptosis	Oxidized fatty acids
 <p>Cholesterol</p>	Alteration in membrane structure and morphology	Regulate membrane structure and microdomains	Sterol

Tableau 3 : Implication des lipides dans la cancérisation (d'après Fernandis et Wenk, 2009)

En cancérologie, l'analyse lipidomique peut avoir plusieurs objectifs. Comme nous l'avons évoqué précédemment dans quelques exemples, elle peut être mise en œuvre pour identifier des lipides marqueurs potentiels des tumeurs, dans le but d'identifier les voies métaboliques et les enzymes qui modifient et perturbent les lipides. Les lipides étant générés et métabolisés par des enzymes, la lipidomique peut être utilisée pour étudier l'influence de l'environnement d'un système biologique donné, la température ou un régime alimentaire spécifique par exemple, sur la composition lipidique (Wenk, 2010). C'est le cas de Yorek en 1985, qui a étudié la composition de la membrane rétinienne saine avec et sans supplémentation alimentaire en acide gras ω -3. Elle peut aussi être utilisée pour analyser la composition lipidique membranaire des cellules cancéreuses pour la comparer à la composition membranaire des cellules saines. C'est cette optique que nous allons suivre dans le cadre de cette thèse.

La lipidomique est limitée par les techniques analytiques disponibles et par la complexité des mélanges de lipides. La technique d'analyse la plus fréquente est la spectrométrie de masse par ionisation douce qui permet d'analyser les mélanges complexes. Les techniques chromatographiques sont également très utilisées pour séparer les différents lipides en présence dans un mélange, ainsi que la spectroscopie RMN qui permet d'étudier la structure moléculaire et la dynamique des lipides membranaires (Wenk, 2005). Un des principaux challenges dans l'analyse lipidomique réside dans la préparation des échantillon de lipides : il faut extraire les lipides seuls des cellules, sans protéines, s'assurer de les avoir tous récoltés et il faut que cette préparation soit contrôlée et standardisée. Toutes les classes de lipides ne peuvent pas être analysées en même temps : les protocoles d'extraction diffèrent selon la nature des lipides et les méthodes d'analyse sont également différentes.

Mon travail de thèse a débuté avec des expériences de cytotoxicité et phototoxicité réalisées sur des cultures cellulaires de rétinoblastome (Y79) et témoins (HT29, adénocarcinome du colon) incubées avec les porphyrines dendrimériques de la

figure 11. Nous avons alors confronté ces résultats avec ceux obtenus avec les modèles membranaires.

Par la suite, nous avons étudié les interactions porphyrines-membrane par QCM-D, en remplaçant le modèle membranaire par les cellules de rétinoblastome Y79, dans le but d'étudier plus particulièrement les interactions spécifiques molécules-membrane cellulaire. Nous avons ensuite réalisé des expériences de cytométrie en flux pour compléter ces résultats et mieux comprendre le mode de capture de ces porphyrines dans les cellules de rétinoblastome Y79.

Afin de vérifier les premiers résultats obtenus avec le modèle membranaire établi par Ali Makky, nous avons mené une analyse lipidomique des membranes des cellules Y79, mais aussi de deux xénogreffes (Rb 101 et Rb 200) de rétinoblastome afin de déterminer leur composition en phospholipides et en cholestérol.

Références :

Al-Tubuly, A. A., Luqmani, Y. A., Shousha, S., Melcher, D. & Ritter, M. A. Differential expression of gp200-MR6 molecule in benign hyperplasia and down-regulation in invasive carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer* 74, 1005–1011 (1996).

Al-Tubuly, A. A., Spijker, R., Pignatelli, M., Kirkland, S. C. & Ritter, M. A. Inhibition of growth and enhancement of differentiation of colorectal carcinoma cell lines by MAb MR6 and IL-4. *Int. J. Cancer* 71, 605–611 (1997).

Alberts B., J. A. L. J., Raff M., Roberts K., Walter P. Membrane structure, In *Molecular biology of the cell* (Alberts, B., Ed.) 5th reference ed ed., pp 617-629 (2008) .

Allen, C. M., Sharman, W. M. & Lier, J. E. van. in *Tumor Targeting in Cancer Therapy* (Pagé, M.) 329–361 Humana Press, (2002).

Ayela C, Roquet F, Valera L, Granier C, Nicu L, Antibody-antigenic peptide interactions monitored by SPR and QCM-D. A model for SPR detection of IA-2 autoantibodies in human serum. *Biosens Bioelectron* 22, 3113–3119 (2007).

Bach, D. & Wachtel, E. Phospholipid/cholesterol model membranes: formation of cholesterol crystallites. *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 187–197 (2003).

Bach, D., Wachtel, E., Borochoy, N., Senisterra, G., Epand, R. M. Phase behaviour of heteroacid phosphatidylserines and cholesterol. *Chem. Phys. Lipids* 63: 105-113 (1992).

Ballut, S. Thèse "Synthèse et études photophysiques et photobiologiques de photosensibilisateurs porphyriques glycodendrimères : application en thérapie photodynamique (PDT)", Université Paris-Sud (2010).

Ballut, S., Makky, A., Chauvin, B., Michel, J-P., Kasselouri, A., Maillard, Ph., Rosilio, V., Tumor targeting in photodynamic therapy. From glycoconjugated photosensitizers to glycodendrimeric one. Concept, design and properties. *Org. Biomol. Chem.* 10, 4485–4495 (2012).

Ballut, S., Makky, A., Loock, B., Michel, JP., Maillard, Ph., Rosilio, V., New strategy for targeting of photosensitizers. Synthesis of glycodendrimeric phenylporphyrins, incorporation into a liposome membrane and interaction with a specific lectin. *Chem. Commun. (Camb.)* 224–226 (2009).

Ballut, S., Naud-Martin, D., Loock, B. & Maillard, P. A strategy for the targeting of photosensitizers. Synthesis, characterization, and photobiological property of porphyrins bearing glycodendrimeric moieties. *J. Org. Chem.* 76, 2010–2028 (2011).

Beck, M. N., Balmer, A., Dessing, C., Pica, A. & Munier, F. First-Line Chemotherapy With Local Treatment Can Prevent External-Beam Irradiation and Enucleation in Low-Stage Intraocular Retinoblastoma. *JCO* 18, 2881–2887 (2000).

Brewer, C. F., Miceli, M. C. & Baum, L. G. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 616–623 (2002).

Brockman, H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 438–443 (1999).

Cheetham JJ, Wachtel E., Bach D., Epand RM., Role of the stereo chemistry of the hydroxyl group of cholesterol and the formation of nonbilayer structures in phosphatidylethanolamines, *Biochemistry* 28:8928–8934 (1989).

Chen, J., Stefflova, K., Niedre, M., Wilson, BC., Chance, B., Glickson, JD., Zheng, G., Protease-triggered photosensitizing beacon based on singlet oxygen quenching and activation. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 11450–11451 (2004).

De Kruijff, P., Cullis PR., Radda, GK., Differential scanning calorimetry and ³¹P NMR studies on sonicated and unsonicated phosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, Volume 406: 6-20 (1975).

Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot JR, Schubert F, *Les liposomes*, Ed INSERM, (1993).

Demel, R. A. in *Methods in Enzymology* (Sidney Fleischer, L. P.) Volume 32, 539–544 Academic Press, (1974).

Desroches, M.-C., Kasselouri A., Meyniel, M., Fontaine, Ph., Goldmann, M., Prognon, P., Maillard, Ph., Rosilio, V., Incorporation of glycoconjugated porphyrin derivatives into phospholipid monolayers: a screening method for the evaluation of their interaction with a cell membrane. *Langmuir* 20, 11698–11705 (2004).

DiCiommo, D., Gallie, B. L. & Bremner, R. Retinoblastoma: the disease, gene and protein provide critical leads to understand cancer. *Semin. Cancer Biol.* 10, 255–269 (2000).

Dougherty, T., Grindey, G., Fiel, R., Weishaupt, K. & Boyle, D. Photoradiation Therapy .2. Cure of Animal Tumors with Hematoporphyrin and Light. *J. Natl. Cancer Inst.* 55, 115–121 (1975).

Dynarowicz-Łątka, P., Hąc-Wydro, K., Interactions between phosphatidylcholines and cholesterol in monolayers at the air/water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 37, 21–25 (2004).

East L, Isacke C. M. The mannose receptor family. *Biochimica et biophysica acta* 1572, 364–86 (2002).

Epand, R. M., Bain, A. D., Sayer, B. G., Bach, D. & Wachtel, E. Properties of mixtures of cholesterol with phosphatidylcholine or with phosphatidylserine studied by ¹³C magic angle spinning nuclear magnetic resonance. *Biophys. J.* 83, 2053–2063 (2002).

Escribá, P. V., Gonzalez-Ros, JM., Goni, FM., Kinnunen PKJ., Vigh, L., Sanchez-Magraner, L., Fernandez, AM., Busquets, X., Horvath, I., Barcelo-Coblijn, G., Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 829–875 (2008).

Fan, JQ., Quesenberry, MS., Takegawa, K., Iwahara, S., Kondo, A., Kata, I., Lee, YC., Synthesis of neoglycoconjugates by transglycosylation with *Arthrobacter protophormiae* endo-beta-N-acetylglucosaminidase. Demonstration of a macro-cluster effect for mannose-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 17730–17735 (1995).

Feng L., Prestwich G.D. Prestwich, editors, *Functional Lipidomics*, CRC Press/Taylor & Francis, New York (2006).

Fernandis, A. Z., Wenk, M. R. Lipid-based biomarkers for cancer. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 2830–2835 (2009).

Filippov, A., Oradd, G., Lindblom, G., The Effect of Cholesterol on the Lateral Diffusion of Phospholipids in Oriented Bilayers. *Biophys J* 84, 3079–3086 (2003).

Fliesler, S. J. & Anderson, R. E. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. Lipid Res.* 22, 79–131 (1983).

Fradin, C., Daillant, J., Luzet, D., Alba, M., Goldmann, M., Microscopic measurement of the linear compressibilities of two-dimensional fatty acid mesophases, *Eur. Phys. J. B* , 1, 57-69, 1998.

Freeman, M. R. & Solomon, K. R. Cholesterol and prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* 91, 54–69 (2004).

Gachard-Bouty, L., Thèse "Utilisation de la métathèse des alcènes pour la synthèse des porphyrines O-et C- glycoconjuguées éthyléniques : application à la photothérapie dynamique", Université de Limoges (2003).

Garcia, M. L. Egea, MA., Valero, J., Valls, O., Alsina, MA., Interaction of flurbiprofen sodium with cornea model monolayers at the air–water interface. *Thin Solid Films* 301, 169–174 (1997).

Garin-Chesa, P., Campbell, I., Saigo, PE., Lewis, JL., Old, LJ., Rettig, WJ., Trophoblast and ovarian cancer antigen LK26. Sensitivity and specificity in immunopathology and molecular identification as a folate-binding protein. *Am J Pathol* 142, 557–567 (1993).

Gary-Bobo, M., Mir, Y., Rouxel, C., Brevet, D., Hocine, O., Maynadier, M., Gallud, A., Da Silva, A., Mongin, O., Blanchard-Desce, M., Richeter, S., Looock, B., Morère, A., Garcia, A., Raehm, L., Durand, J-O., Multifunctionalized mesoporous silica nanoparticles for the in vitro treatment of retinoblastoma: Drug delivery, one and two-photon photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics* 432, 99–104 (2012).

Goff, BA., Hermanto, U., Rumbaugh, J., Blake, J., Bamberg, M., Hasant, T., Photoimmunotherapy and biodistribution with an OC125-chlorin immunoconjugate in an in vivo murine ovarian cancer model. *Br. J. Cancer* 70, 474–480 (1994).

Griegel, S., Rajewsky, M. F., Ciesiolka, T. & Gabius, H. J. Endogenous sugar receptor (lectin) profiles of human retinoblastoma and retinoblast cell lines analyzed by cytological markers, affinity chromatography and neoglycoprotein-targeted photolysis. *Anticancer Res.* 9, 723–730 (1989).

Hager, M. H., Solomon, K. R. & Freeman, M. R. The role of cholesterol in prostate cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9, 379–385 (2006).

Han, H. K. & Amidon, G. L. Targeted prodrug design to optimize drug delivery. *AAPS PharmSci* 2, E6 (2000).

Henderson, B., Dougherty, T.J., Malone, P. Studies on the mechanism of tumor destruction by photoirradiation therapy. Porphyrin localization and treatment of tumors. *Doiron D.R., Gomer C.J. New-York*, 301-314 (1984).

Henon, S., Meunie, J., Microscope at the Brewster angle - Direct observation of first order phase transitions in monolayers, *Review of scientific instruments* [0034-6748] Vol. :62 :936 - 939 (1991).

Hoebeke, M., The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 28, 189–196 (1995).

Honavar, S.G., Singh, AD., Shields, CL., Meadows, AT., Demirci, H., Cater, J., Shields, JA., Postenucleation adjuvant therapy in high-risk retinoblastoma. *Arch. Ophthalmol.* 120, 923–931 (2002).

Hu, KL., Hasan, T., Gragoudas, ES., Young, LHY., Photoimmunotherapy of human uveal melanoma cells. *Experimental Eye Research* 61, 385–391 (1995).

Isacke, C. M., van der Geer, P., Hunter, T. & Trowbridge, I. S. p180, a novel recycling transmembrane glycoprotein with restricted cell type expression. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2606–2618 (1990).

Jiang, W., Swiggard, WJ., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinmann, RM., Nussenzweig, M., The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375, 151–155 (1995).

Jori, G., Beltramini, M., Reddi, E., Salvato, B., Pagnan, A., Ziron, L., Tomio., L, Tsanov, T., Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers in vivo. *Cancer Lett.* 24, 291–297 (1984).

Kanazawa, K.K. and Gordon II, J.G., The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid. *Analytica Chimica Acta*, 175: p. 99-105 (1985).

Kato, M., Neil, TK., Fearnly, DB., McLellan, A., Vuckovic, S., Hart, DNJ., Expression of multilectin receptors and comparative FITC–dextran uptake by human dendritic cells. *Int. Immunol.* 12, 1511–1519 (2000).

Kępczyński, M., Pandian, RP., Smith, KM., Ehrenberg B., Do Liposome-binding Constants of Porphyrins Correlate with Their Measured and Predicted Partitioning Between Octanol and Water? *Photochemistry and Photobiology*, vol. 76, no. 2, pp. 127–134, (2002).

Kerdous, R., Heuvingh, J. & Bonneau, S. Photo-dynamic induction of oxidative stress within cholesterol-containing membranes: Shape transitions and permeabilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808, 2965–2972 (2011).

Kessel, D. Effects of photoactivated porphyrins at the cell surface of leukemia L1210 cells. *Biochemistry* 16, 3443–3449 (1977).

Konan, Y. N., Gurny, R. & Allémann, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 66, 89–106 (2002).

Kraal, G., Breel, M., Janse, M., Bruin G., Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody, *J. Exp. Med.* 163, 981– 997 (1986).

Lagarde, M., Gélöën, A., Record, M., Vance, D., Spener, F. Lipidomics is emerging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1634, 61 (2003).

Langner, M., Kubica, K. The electrostatics of lipid surfaces. *Chem. Phys. Lipids* 101, 3–35 (1999).

Laville, I., Figueiredo, T., Loock, B., Pigaglio, S., Maillard, Ph., Grierson, DS., Carrez, D., Croisy, A., Blais, J. Synthesis, cellular internalization and photodynamic activity of glucoconjugated derivatives of tri and tetra(meta-hydroxyphenyl)chlorins. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 1643–1652 (2003).

Laville, I., Pigaglio, S., Blais, JC., Doz, F., Loock, B., Maillard, Ph., Grierson, DS., Blais, J. Photodynamic efficiency of diethylene glycol-linked glycoconjugated porphyrins in human retinoblastoma cells. *J. Med. Chem.* 49, 2558–2567 (2006).

Leaf, A., Gosbell, A., McKenzie, L., Sinclair, A. & Favilla, I. Long chain polyunsaturated fatty acids and visual function in preterm infants. *Early Hum. Dev.* 45, 35–53 (1996).

Leathes, JB., *The Role of Fats in Vital Phenomena*, *The Lancet* 1, 1853 (1925).

Lennartz, MR., Cole, FS., Shepherd, VL., Wileman, TE., Stahl, PD., Isolation and characterization of a mannose-specific endocytosis receptor from human placenta. *J. Biol. Chem.* 262, 9942–9944 (1987).

Liu, Q., Hamblin, M. R. Macrophage-targeted photodynamic therapy: scavenger receptor expression and activation state. *Int J Immunopathol Pharmacol* 18, 391–402 (2005).

Lohmann, DR., Brandt, B., Hopping, W., Passarge, E., Horsthemke, B. The spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 58, 940–949 (1996).

Lombardi, P. Norata, G., Magi, FM., canti, G., Franco, P., Nicolin, A., Catapano, AL., Assimilation of LDL by experimental tumours in mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1003, 301–306 (1989).

MacCarthy, A., Draper, G. J., Steliarova-Foucher, E., Kingston, J. E. Retinoblastoma incidence and survival in European children (1978-1997). Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur. J. Cancer* 42, 2092–2102 (2006).

Maget-Dana, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1462, 109–140 (1999).

Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S.L., Nussenzweig, M., Steinmann, R.M., The Dendritic Cell Receptor for Endocytosis, Dec-205, Can Recycle and Enhance Antigen Presentation via Major Histocompatibility Complex Class II-Positive Lysosomal Compartments. *J Cell Biol* 151, 673–684 (2000).

Maillard, Ph., Loock, B., Grierson, D.S., Laville, I., Blais, J., Doz, F., Desjardins, L., Carrez, D., Guerquin-Kern, J.L., Croisy, A., In vitro phototoxicity of glycoconjugated porphyrins and chlorins in colorectal adenocarcinoma (HT29) and retinoblastoma (Y79) cell lines. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 4, 261–268 (2007).

Makky, A. Thèse, "Analyse des mécanismes de pénétration intramembranaire de porphyrines glycoconjuguées utilisables en thérapie photodynamique des cancers : modélisation des interactions spécifiques et non-spécifiques." Université Paris-Sud (2010).

Makky, A., Michel, J-P., Ballut, S., Kasselouri, A., Briand, E., Maillard, Ph., Rosilio, V., Evaluation of the specific interactions between glycodendrimeric porphyrins, free or incorporated into liposomes, and concanavalin A by fluorescence spectroscopy, surface pressure, and QCM-D measurements. *Langmuir* 26, 12761–12768 (2010).

Makky, A., Michel, J-P., Ballut, S., Kasselouri, A., Maillard, Ph., Rosilio, V., Effect of cholesterol and sugar on the penetration of glycodendrimeric phenylporphyrins into biomimetic models of retinoblastoma cells membranes. *Langmuir* 26, 11145–11156 (2010).

Makky, A., Michel, J-P., Maillard, P. & Rosilio, V. Biomimetic liposomes and planar supported bilayers for the assessment of glycodendrimeric porphyrins interaction with an immobilized lectin. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 656–666 (2011).

Martin, J.C., Swartzendruber, D.E. Time: a new parameter for kinetic measurements in flow cytometry. *Science* 207, 199–201 (1980).

McMullen, T.P., Lewis, R.N., McElhaney, R.N., Calorimetric and spectroscopic studies of the effects of cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of a homologous series of linear saturated phosphatidylethanolamine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1416, 119–134 (1999).

Mellman, I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 575–625 (1996).

Moan, J., Berg, C., The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 53 :549-553 (1991).

Momenteau, M., Reed, CA., Synthetic heme dioxygen complexes, *Chem. Rev.* 94, 659–698 (1994).

Moser, JG. Montforts, FP., Kusch, D., Vervoorts, A., Kirsch, D., Berghahn, M., Akgün, N., Rueck, A., Andrees, S., Wagner, B., *Proc. SPIE. Int. Soc. Opt. Eng.*, 2924, 22 (1996).

Mountford, CE., Wright, LC., Holmes, KT., Mackinnon, WB., Gregory, P., Fox, RM., High-resolution proton nuclear magnetic resonance analysis of metastatic cancer cells. *Science* 226, 1415–1418 (1984).

Muratsugu, M., Ohta, F., Miya, Y., Hosokawa, T., Kurosawa, S., Kamo, N. and Ikeda, H., Quartz crystal microbalance for the detection of microgram quantities of human serum albumin: relationship between the frequency change and the mass of protein adsorbed. *Analytical Chemistry*, 65: p. 2933-2937 (1993).

Niedre, M., Patterson, M. S. & Wilson, B. C. Direct Near-infrared Luminescence Detection of Singlet Oxygen Generated by Photodynamic Therapy in Cells In Vitro and Tissues In Vivo. *Photochemistry and Photobiology* 75, 382–391 (2002).

Nomura, T., Lijima, M., Electrolytic determination of nanomolar concentrations of silver in solution with a piezoelectric quartz crystal *Analytica Chimica Acta*, 131: p. 97-102 (1981).

Oseroff, AR., Ara, G., Ohuoha, D., Aprille, J., Bommer, JC., M.L.Yarmush, ML., Foley, J., Cincotta, L., Strategies for selective cancer photochemotherapy: antibody-targeted and selective carcinoma cell photolysis, *Photochem. Photobiol.*, 46 83-96 (1987).

Raab, O., Bei die wirkung fluorescinder stoffen auf infosurien, *Z. Biol.* 39:524-526 (1900).

Rabinovich, GA., Baum, LG., Tinari, N., Paganelli, R., Natolli, C., Liu, FT., Iacobelli, S., Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol.* 23, 313–320 (2002).

Reubi, J. C. In Vitro Identification of VIP Receptors in Human Tumors: Potential Clinical Implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 805, 753–759 (1996).

Ricchelli, F., Jori, G., Gobbo, S., and Tronchin, M., Liposomes as models to study the distribution of porphyrins in cell membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1065, 42–48 (1991).

Ricchelli, F., Jori, G., Moreno, G., Vinzens, F., Salet, C. Factors influencing the distribution pattern of porphyrins in cell membranes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 6, 69–77 (1990).

Richter RP, Berat R., Brisson AR, Formation of solid-supported bilayers : an integrated view, *Langmuir* 22 3497-3505 (2006).

Riss, D., Jin, L., Qian, X., Bayliss, J., Scheithauer, BW, Young, WF., Vidal S., Kovacs, K., Raz, A., Lloyd, RV., Differential Expression of Galectin-3 in Pituitary Tumors. *Cancer Res* 63, 2251–2255 (2003).

Sabatini, K., Mattila, J-P., Kinnunen, PKJ., Interfacial behavior of cholesterol, ergosterol, and lanosterol in mixtures with DPPC and DMPC, *Biophys. J.* 95, 2340-2355 (2008).

Sanders, BM., Draper, GJ., Kingston, JE., Retinoblastoma in Great Britain 1969-80: incidence, treatment, and survival. *Br J Ophthalmol* 72, 576–583 (1988).

Sant, M., Capocaccia, R., Coleman, RP., Berrino, F., Gatta, G., Michelli, A., Verdecchia, A., Faivre, J., Hakulinen, T., Coebergh, JWW., Martinez, C., Forman, D., Zappone, A., Cancer survival increases in Europe, but international differences remain wide. *European Journal of Cancer* 37, 1659–1667 (2001).

Sauerbrey, G., Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik*, 155: p. 206-222(1959).

Sharman, WM., van Lier, JE., Allen, CM. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 53–76 (2004).

Shields, CL., Naseripour, M., Shields, JA. Topical mitomycin C for extensive, recurrent conjunctival-corneal squamous cell carcinoma. *American Journal of Ophthalmology* 133, 601–606 (2002).

Stefflova, K., Chen, J., Marotta, D., Li, H., Zheng, G., Photodynamic Therapy Agent with a Built-In Apoptosis Sensor for Evaluating Its Own Therapeutic Outcome in Situ. *Journal of Medicinal Chemistry* 49, 3850–3856 (2006).

Steinman, RM., Mellman, IS., Muller, WA., Cohn, ZA., Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell Biol.* 96, 1–27 (1983).

Svaasand, L. Optical dosimetry for direct and interstitial photoirradiation therapy of malignant tumors. Porphyrin localization and treatment of tumors. Doiron D.R., Gomer C.J. New-York, 369-385 (1984).

Taylor, DM., *Advances in Colloid and Interface Science*, 87, 183-203, (2000).

Thorpe, WP., Toner, M., Ezzell, RM., Tompkins, RG., Yarmush, ML., Dynamics of photoinduced cell plasma membrane injury. *Biophys. J.* 68, 2198-2206 (1995).

Tungekar, MF., Gatter, KC. Ritter, MA. Bladder carcinomas and normal urothelium universally express gp200-MR6, a molecule functionally associated with the interleukin 4 receptor (CD 124). *Br. J. Cancer* 73, 429–432 (1996).

Umez-Goto, M., Tanyi, J., Lahad, J., Liu, S., Yu, S., Lapushin, R., Hasegawa, Y., Lu, Y., Trost, R., Bevers, T., Jonasch, E., Aldape, K., Lie, J., James, RD., Ferguson, CG., Xu, Y., Prestwich, GD., Mills, GD., Lysophosphatidic acid production and action: Validated targets in cancer? *Journal of Cellular Biochemistry* 92, 1115–1140, (2004).

Van Liempt, E., Bank, CMC., Mehta, P., Garcia-Vallejo, J., Kawar, Z., Geyer, R., Alvarez, RA., Cummings, R., Kooyk, Y., Van Die, I., Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS Letters* 580, 6123–6131 (2006).

Van Meer, G., Leeftang, B. R., Liebisch, G., Schmitz, G. & Goñi, F. M. in *Lipidomics and Bioactive Lipids: Mass-Spectrometry–Based Lipid Analysis Volume 432*, 213–232 Academic Press, (2007).

Varki, *Essentials of Glycobiology*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).

Wang, ZJ., Chauvin, B., Maillard, Ph., Hammerer, F., Carez, D., Croisy, A., Sandré, C., Chollet-Martin, S., Prognon, P., Paul, JL., Blais, J., Kasselouri, A., Glycodendrimeric phenylporphyrins as new candidates for retinoblastoma PDT: blood carriers and photodynamic activity in cells. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 115, 16–24 (2012).

Wenk, M. R. Lipidomics: new tools and applications. *Cell* 143, 888–895 (2010).

Wenk, M. R. The emerging field of lipidomics. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 594–610 (2005).

Witmer-Pack, MD., Swiggard, W J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, RM., Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Cell. Immunol.* 163, 157–162 (1995).

Wojtyk, JTC., Goyan, R., Gudgin-Dickson, E., Pottier, R., Exploiting tumour biology to develop novel drug delivery strategies for PDT. *Medical Laser Application* 21, 225–238 (2006).

Wolf, C., Quinn, PJ., Lipidomics in diagnosis of lipidoses. *Subcell. Biochem.* 49, 567–588 (2008).

Yandell, DW., Campbell, TA., Dayton, SH., Petersen, R., Walton, D., Little, JB., McConkie-Rosell, A., Buckley, EG., Dryja, TP., Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counseling. *N. Engl. J. Med.* 321, 1689–1695 (1989).

Yang, RY., Liu, FT., Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 267–276 (2003).

Yorek, MA., Figard, PH., Kaduce, TL., Spector, AA., A comparison of lipid metabolism in two human retinoblastoma cell lines. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26, 1148–1154 (1985).

Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Allegood, JC., Liu, Y., Peng, Q., Ramaraju, H., Sullards, MC., Cabot, H., Merrill, AH., Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1864–1884 (2006).

Première partie :
Culture cellulaire et QCM-D

A. Introduction

L'étude en culture cellulaire des porphyrines glycoconjuguées a suggéré la présence de récepteurs au mannose et au galactose à la surface des cellules de rétinoblastome (Laville et al. 2006). Si la présence de ces récepteurs est avérée, leur identification est encore en cours (Marcel Garcia, communication personnelle). Les études en culture cellulaire ont également montré que ces molécules pénètrent par diffusion passive, mais aussi par un transport médié par des protéines qui peuvent être, justement, ces récepteurs. Dans le cadre de sa thèse au sein de l'UMR CNRS 8612, Ali Makky a étudié les porphyrines dendrimériques mannosylées décrites dans le paragraphe B.2 de la partie bibliographique (figure 11) en utilisant des modèles membranaires plans (monocouches et bicouches supportées) et en volume (liposomes). Il a montré grâce à ses travaux que les porphyrines glycodendrimériques sont des molécules amphiphiles, très faiblement solubles en milieu aqueux, capables de s'insérer dans la bicouche de vésicules lipidiques (Ballut et al. 2009) et d'exposer à leur surface leurs extrémités sucrés. Elles peuvent ainsi interagir avec une lectine spécifique du mannose, la concanavaleine A, libre dans le milieu (Ballut et al. 2009), greffée sur des liposomes (Makky et al. 2010b), ou encore fixée sur un capteur de microbalance à cristal de quartz. La fixation peut être réalisée soit directement à la surface du capteur (Makky et al. 2010b) soit à la surface d'une bicouche lipidique préalablement adsorbée sur ce capteur (Makky et al. 2011). L'interaction spécifique est dépendante de la longueur de l'espaceur séparant les sucres du répartiteur de la branche du dendrimère (Ballut et al. 2012). Devant ces résultats prometteurs, nous avons décidé de les confronter à ceux d'expériences de cytotoxicité et phototoxicité réalisées sur des cultures cellulaires. De premières études avaient été réalisées par Séverine Ballut et Ali Makky au cours de leurs thèses respectives, mais les résultats avaient été décevants, par comparaison avec la molécule de référence, TPP(DegMan)₃ (figure 1a). Nous avons décidé de réaliser de nouvelles expériences pour comprendre la raison de la faible efficacité apparente des porphyrines glycodendrimériques.

B. Matériel et méthodes

B.1. Conditions de culture cellulaire

B.1.1. Cellules Y79

Les cellules suspensives Y79 sont des cellules disponibles dans le commerce qui ont été isolées, à l'origine, par Reid et al. (1974) à partir d'une tumeur primaire extraite de l'œil d'une petite fille de deux ans et demi. L'American Type Culture Collection (ATCC) fournit ces cellules qui peuvent ensuite être cultivées dans du DMEM Hi-Glucose dans lequel est ajouté 20% de sérum de veau fœtal (SVF) (v/v), 1% de Na-Pyruvate, 1% de L-Glutamine, 50 IU/mL de streptomycine et 5 IU/mL de pénicilline. Les cellules sont incubées à 37°C et sous 5% de CO₂ (figure 21).

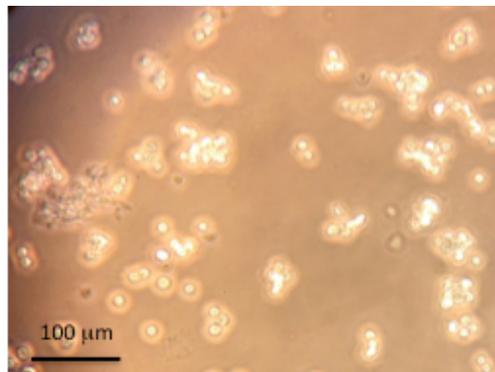


Figure 21 : cellules Y79 en culture, présence d'amas (grappes), microscope optique (optique x10, grossissement x20)

B.1.2. Cellules HT 29

Les cellules adhérentes HT 29 sont des cellules d'adénocarcinome du colon isolées à partir de la tumeur primaire d'une femme caucasienne de 44 ans. Ces cellules, également fournies par l'ATCC sont cultivées dans le même milieu que les cellules Y79, mais avec seulement 10% de SVF (v/v). Elles sont incubées dans les mêmes conditions que les cellules de rétinoblastome (figure 22).

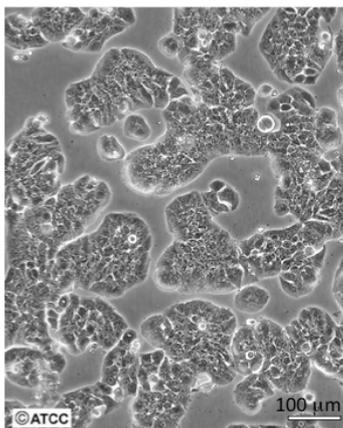


Figure 22 : cellules HT 29 (ATCC®)

B.1.3. Test de cytotoxicité et de phototoxicité

Les protocoles des tests de cytotoxicité et phototoxicité ont été élaborés par D. Carrez et A. Croisy à l'Institut Curie d'Orsay. Dans ces protocoles, les cellules Y79 sont récoltées, centrifugées à 1000g à 4°C pendant 5 min et le culot de cellules est ensuite suspendu à la concentration de 6000 cellules/ μ L dans le milieu de culture décrit plus haut, mais ne contenant cette fois que 10% de SVF. Les cellules HT 29 sont lavées par du DPBS, trypsinées, centrifugées à 1000g pendant 5 min, suspendues dans le même milieu à la concentration de 25 cellules/ μ L. Après ensemencement de plaques 96 puits avec 100 μ L de suspension cellulaire par puits, les cellules sont incubées pendant 24h dans les conditions indiquées précédemment. Les molécules ou systèmes à tester (porphyrines libres, liposomes de DMPC, liposomes incorporant les porphyrines) sont déposés dans les puits à une concentration en lipide croissante (0, 150, 300, 700, 1000 et 2000 nM). Les plaques sont ensuite remises à incuber pendant 24h. Après 24h, pour le test de phototoxicité, le milieu des cellules HT 29 est aspiré (les cellules étant adhérentes) et remplacé par du milieu neuf. Pour les cellules Y79, le milieu ne peut être aspiré, car les cellules sont en suspension ; les porphyrines restent donc, dans ce cas, au contact des cellules tout le reste de l'expérience. Les cellules sont ensuite illuminées par une lumière orange de longueur d'onde comprise entre 590 et 640 nm à une fluence de 2J/cm² pendant 14 minutes. Le milieu des cellules HT 29 est ensuite à nouveau aspiré et renouvelé par du milieu neuf identique, tandis que pour les cellules suspensives Y79 du SVF est ajouté dans chaque puits de telle sorte qu'il atteigne

une concentration finale de 20%. Pour le test de cytotoxicité, seule cette dernière étape est réalisée, les cellules n'étant pas illuminées. Les cellules sont ensuite laissées dans l'incubateur pendant 72h, le temps qu'elles puissent potentiellement doubler. La cytotoxicité s'évalue, pour les cellules HT 29 par un test MTT (diméthyl-4,5-thiazol-2-yl) diphényl-2,5 tétrazolium) et pour les cellules Y79, par un test MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium). L'ion tétrazolium présent dans ces molécules est réduit par une enzyme mitochondriale des cellules vivantes, la succinate déshydrogénase, le transformant ainsi en formazan. Ce dernier précipite dans la mitochondrie en formant des cristaux violets pour le test MTT qui sont solubilisés par ajout de DMSO. La quantité de cristaux est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Le test MTS est utilisé pour les cellules Y79 afin d'éviter l'étape de centrifugation des cellules dans chaque puits, nécessaire dans le test MTT pour obtenir le culot de cellules auquel est ensuite ajouté le DMSO. Dans le cas du test MTS, les cristaux de formazan formés sont donc directement solubilisés dans la suspension cellulaire. La mesure de l'absorbance au spectrophotomètre se fait immédiatement à 490 nm pour le test MTS et à 550 nm après 1h de réaction pour le test MTT (figures 23 et 24).

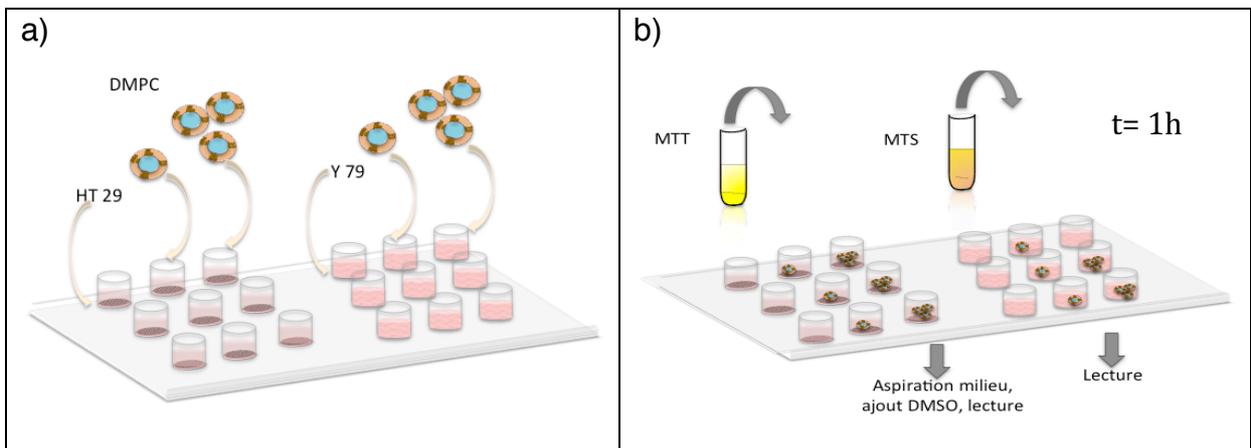


Figure 23 : exemple d'étude de la cytotoxicité : essai avec des liposomes de DMPC sur les cellules HT 29 et Y79 (a) et réalisation d'un test MTT sur les cellules HT29 et d'un test MTS sur les cellules Y79 après 72h d'incubation

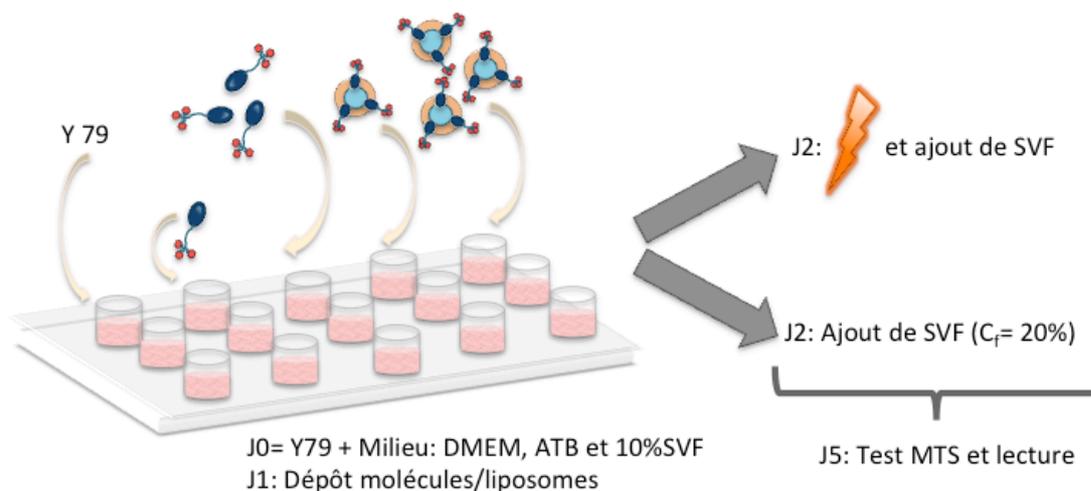


Figure 24 : étude de la phototoxicité sur les cellules Y79, des porphyrines sous forme libre ou incorporées dans des liposomes

B.1.4. Liposomes pour culture cellulaire et expérience de QCM-D

Des liposomes à 10 mM de DMPC, ou de DMPC incorporant dans leur bicouche les porphyrines TPP-1c, TPP-1 et TPP-2 à un ratio de 500 molécules de DMPC pour 1 molécule de porphyrine ont été préparés selon la méthode de Bangham. La DMPC avec ou sans porphyrine est introduite dans un ballon d'évaporation et dissoute dans 3 mL d'un mélange chloroforme-méthanol en proportion 9 :1 (v/v). Après évaporation totale du solvant par évaporation rotative à pression réduite, un film lipidique sec est obtenu. Ce film est réhydraté par du DPBS. Des billes de verre sont ajoutées et un passage au vortex de la suspension est réalisé pour aider au détachement total du film des parois du ballon. La suspension lipidique est ensuite extrudée 15 fois à travers une membrane de polycarbonate d'un diamètre de 200 nm, à 50°C, dans un mini-extrudeur (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA). La taille des liposomes ainsi réalisés est vérifiée par la mesure du diamètre hydrodynamique par diffusion quasi-élastique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering) à 25°C et après dilution de la suspension liposomiale au $1/20^{\text{ème}}$ par le tampon identique à celui utilisé lors de la préparation. Les liposomes préparés dans ces conditions ont tous un diamètre moyen de 190 nm +/- 10nm.

B.2. Expériences sur microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation (QCM-D)

B.2.1. Conditions de travail

Les expériences ont été réalisées sur une microbalance Q-Sense QCM-D E4 (Göteborg, Suède), à 30°C en utilisant un cristal de quartz ayant une fréquence de résonance intrinsèque de 5 MHz, recouvert de SiO₂.

La température optimale de fonctionnement du cristal AT étant de 25°C, travailler à 30°C permet de s'approcher de la température corporelle tout en évitant de trop s'éloigner de la température idéale de fonctionnement du quartz. Bien que taillé sous l'axe cristallographique AT, les quartz commerciaux que nous avons utilisés ont montré des variations de fréquences élevées lors d'une augmentation de la température de 25°C à 37°C, ces variations étant bien moins sensibles à 30°C.

Avant utilisation, le cristal subit un rinçage avec de l'eau ultrapure, suivi d'un séchage sous un léger flux d'azote et d'un traitement dans une chambre UV-ozone pendant 20 min. Cette procédure est appliquée deux fois de suite.

B.2.2. Formation de la couche de poly-L-lysine (PLL)

Les membranes cellulaires sont chargées négativement et la surface du capteur du QCM-D l'est également. Le recouvrement de cette dernière par un polymère cationique comme la poly-L-lysine (PLL) peut permettre de favoriser l'adhésion des cellules Y79. Cela a été réalisé dans des conditions particulières : les cellules en suspension dans leur milieu de culture complet contenant 20% de SVF sont centrifugées à 1000g pendant 5 min et resuspendues dans du DMEM seul à la concentration de 500 000 cellules/mL. Cette suspension est conservée dans un bain à 30°C sous agitation douce pour éviter la précipitation des cellules.

Après stabilisation de la fréquence et de la dissipation dans le DPBS, une solution de PLL dans le DPBS à la concentration de 0,5 mg/mL (pH 7,0) est injectée dans la cellule de mesure du QCM-D. La PLL est un homopolymère naturel avec un pKa de 9,42. A pH 7,0, la PLL est totalement dissociée et chargée positivement tandis que la surface du capteur est chargée négativement. L'adsorption de la couche polycationique sur la surface du capteur de silice est principalement favorisée par des interactions électrostatiques et peut être mesurée par les variations de fréquence

et les changements de dissipation du capteur au cours du temps. L'adsorption des cellules qui suit est, elle aussi, contrôlée par l'abaissement de la fréquence de résonance et l'augmentation de la dissipation. Après une heure d'équilibrage, un rinçage au DMEM est effectué pour assurer la bonne stabilité du système avant l'injection des liposomes incorporant les dérivés porphyriniques.

C. Résultats et discussion

C.1. Cytotoxicité et phototoxicité des dérivés porphyriniques libres

C.1.1. La référence : TPP-(DegMan)₃

Les premières expériences ont été réalisées sur les cellules HT 29 et Y79 avec la porphyrine de « référence » TPP-(DegMan)₃ et une gamme de concentration de 0 à 2 μM . Les résultats sont représentés dans les figures 25 et 26.

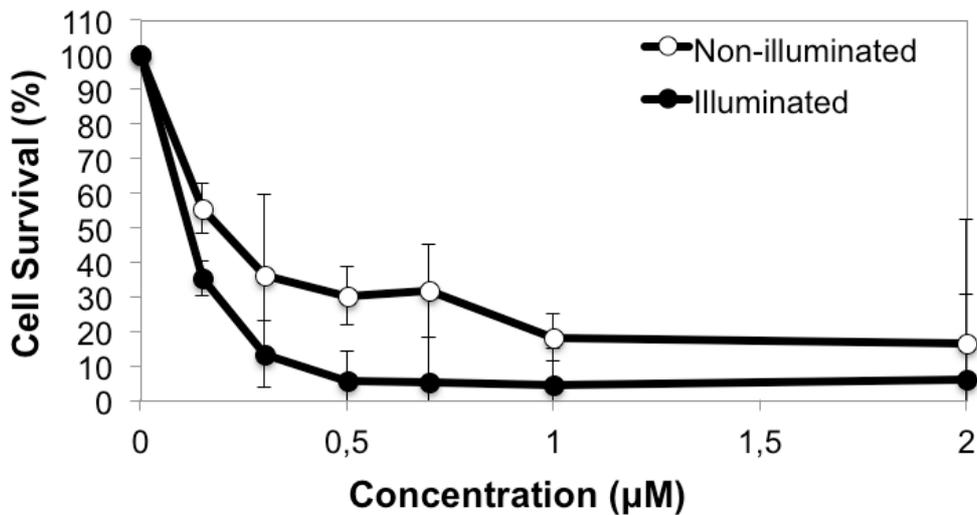


Figure 25: courbe de cytotoxicité (symboles blancs) et de phototoxicité (symboles noirs) de TPP-(DegMan)₃ sur les cellules HT 29.

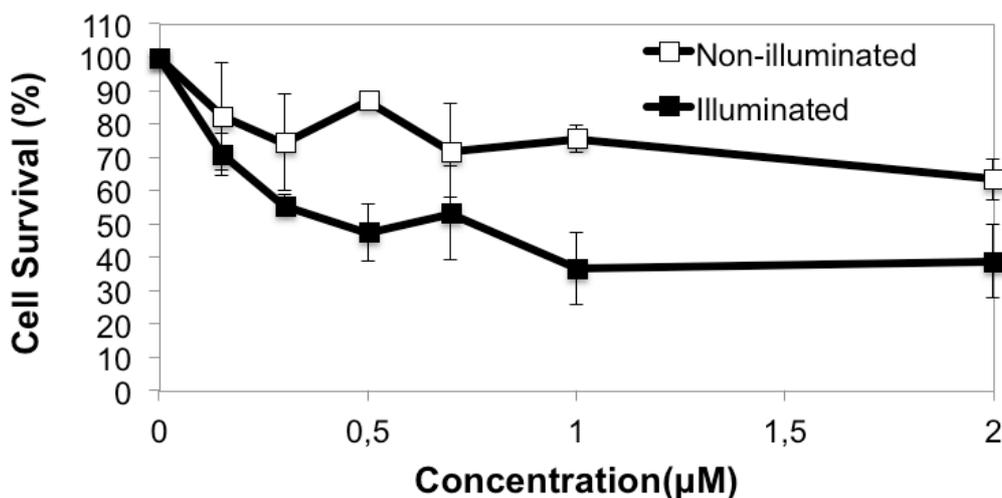


Figure 26: courbe de cytotoxicité (symboles blancs) et de phototoxicité (symboles noirs) de TPP-(DegMan)₃ sur les cellules Y79.

Pour les cellules HT 29, nous obtenons une IC₅₀ de 0,20 µM lorsqu'elles ne sont pas illuminées et de 0,11 µM lorsqu'elles le sont. Pour les cellules Y79, nous n'observons pas d'IC₅₀ en l'absence d'illumination, aux concentrations de TPP-(DegMan)₃ testées. En revanche pour les cellules illuminées, l'IC₅₀ est de 0,35 µM. Laville et al. (2006) ainsi que S. Ballut (Ballut et al. 2012) ont obtenu des IC₅₀ similaires pour cette molécule (0,4 µM après illumination des cellules Y79 et 0,43 µM pour les cellules HT 29).

C.1.2. Porphyrines dendrimériques

Lors de leurs thèses respectives, A. Makky (2010) et S. Ballut (2010) ont étudié la cytotoxicité et la phototoxicité des porphyrines glycodendrimériques sur les deux lignées cellulaires HT 29 et Y79 (tableau 4).

	IC50 (μM) \pm 10%			
	Cytotoxicité		Phototoxicité	
Porphyrines	Y79	HT29	Y79	HT29
TPP-1c	-	-	2,0	2,1
TPP-1	-	-	2,9	2,3
TPP-2	-	-	5,2	3,7

Tableau 4 : IC₅₀ de la porphyrine dendrimérique témoin 1c et des 2 porphyrines glycodendrimériques 1 et 2 à l'obscurité (cytotoxicité) et après illumination (phototoxicité) des cellules.

Les porphyrines glycodendrimériques se sont avérées non cytotoxiques à l'obscurité et dans les gammes de concentration étudiées (0-7,5 μM) sur les deux lignées cellulaires. Après illumination, ces molécules ont démontré des phototoxicités inférieures à celles obtenues avec la molécule TPP-(DegMan)₃ (10 fois inférieures pour les cellules Y79 et 6 fois pour les cellules HT 29). De plus, il n'a pas été observé de différence significative entre les molécules portant des sucres et la porphyrine dendrimérique témoin non sucrée.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ces résultats comme, par exemple, une localisation intracellulaire différente pour la molécule de référence TPP-(DegMan)₃ et les porphyrines glycodendrimériques, voire une absence d'internalisation de ces dernières qui pourraient rester accrochées au récepteur à la surface de la cellule. En outre, Benoit Chauvin a montré dans sa thèse (2011) que les porphyrines glycodendrimériques se lient fortement aux protéines du sérum, principalement aux lipoprotéines responsables du transport du cholestérol (HDL, LDL), contrairement aux porphyrines triglycoconjuguées comme TPP-(DegMan)₃ qui se lient préférentiellement à l'albumine (Wang et al. 2012). Les lipoprotéines ayant une masse moléculaire plus élevée (HDL : 175 000-360 000 g/mol et LDL 240 000-390 000 g/mol, contre 65 000 g/mol pour l'albumine humaine), il serait plus difficile aux porphyrines glycodendrimériques liées à ces lipoprotéines de pénétrer dans les amas de cellules Y79 (figure 1) (B. Chauvin, 2011).

Comme nous l'avons vu précédemment avec l'étude du coefficient de partage, tous les dérivés porphyriniques s'agrègent en milieu aqueux. Bien que cela n'empêche pas d'obtenir une faible IC_{50} après illumination en présence de la molécule de référence, cela pourrait être un frein à l'interaction des photosensibilisateurs avec les cellules et ainsi en limiter l'efficacité. Les porphyrines dendrimériques, grâce à leur structure asymétrique, séparant le noyau hydrophobe de la partie sucrée hydrophile, peuvent être incorporées dans des liposomes. Le macrocycle est alors inséré dans la bicouche lipidique du liposome et la partie hydrophile se retrouve exposée dans le milieu aqueux. Ceci n'est pas possible avec le dérivé TPP-(DegMan)₃ qui ne permet pas l'obtention de liposomes stables. La « vectorisation » des porphyrines dendrimériques apporte plusieurs avantages essentiels pour notre étude (Ballut et al. 2009) :

- elle limite l'agrégation des porphyrines dendrimériques dans le milieu de culture cellulaire en les « solubilisant » dans la membrane liposomiale ;
- les noyaux TPP insérés dans la bicouche lipidique interagissent moins de manière aspécifique avec le milieu environnant et notamment avec les protéines du sérum ;
- les interactions spécifiques entre les sucres et les récepteurs de ces sucres sont favorisées, les extrémités mannosylées des molécules étant seules exposées vers l'extérieur;
- par DLS et de QCM-D, l'incorporation des porphyrines dendrimériques dans les liposomes permet d'augmenter le signal et de voir des effets impossibles à observer avec les porphyrines libres (Ballut et al. 2009, Makky et al. 2010b, 2011 et 2012).

Nous avons donc étudié la cytotoxicité et la phototoxicité des composés incorporés dans des liposomes, afin, notamment de discriminer les porphyrines selon qu'elles portent ou non des sucres.

C.2. Cytotoxicité et phototoxicité des porphyrines dendrimériques incorporées dans des liposomes de DMPC

C.2.1. Cytotoxicité de la DMPC seule

Les phospholipides étant toxiques vis-à-vis des cellules, il fallait d'abord déterminer l' IC_{50} spécifique de la DMPC. Des liposomes blancs à différentes concentrations de DMPC ont été préparés et testés sur les cellules Y79 et HT 29. Les résultats de ces essais sont présentés dans les figures 27 et 28. Nous avons déduit de ces expériences que l' IC_{50} de la DMPC pour les cellules HT 29 est de $5,9 \mu M$ et pour les cellules Y79, de $170 \mu M$. Les cellules Y79 sont apparemment plus résistantes que les cellules HT29. Il a donc été décidé de travailler à des concentrations de DMPC variant entre 25 et $150 \mu M$.

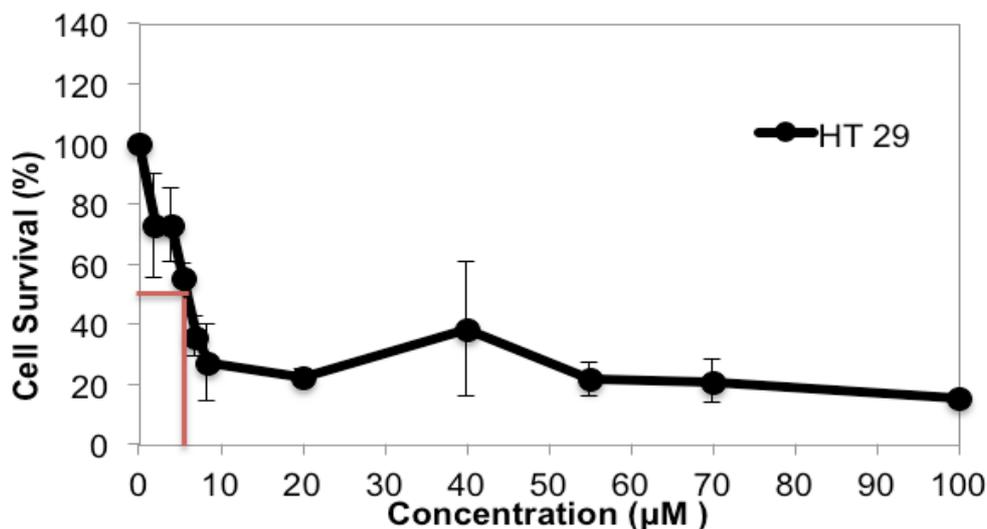


Figure 27 : courbe de toxicité des liposomes de DMPC vis-à-vis des cellules HT 29.

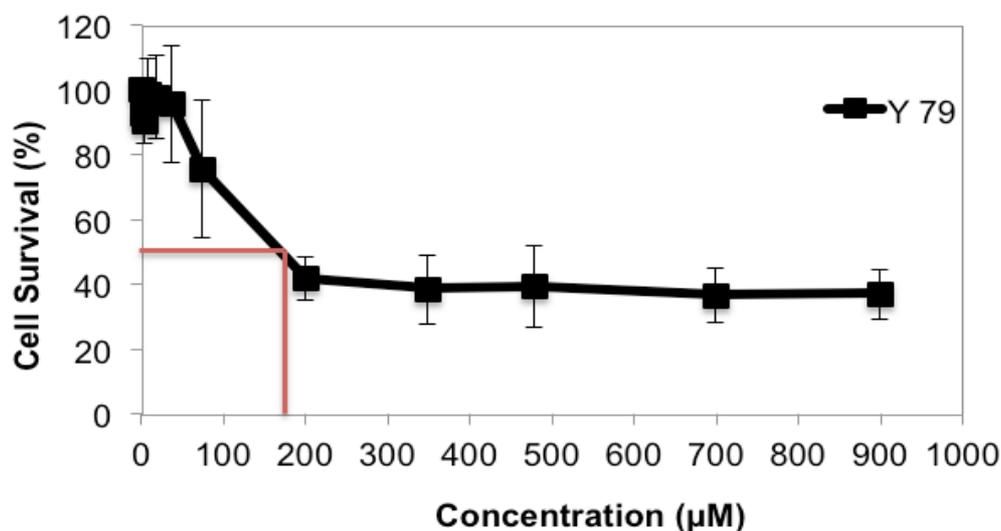


Figure 28: courbe de toxicité des liposomes de DMPC vis-à-vis des cellules Y79.

C.2.2. Cytotoxicité et phototoxicité des porphyrines dendrimériques sous forme vectorisée

Des suspensions liposomales contenant respectivement 25, 50, 75 et 150 µM de DMPC soit 50, 100, 150 et 300 nM de dérivés porphyriniques ont été préparées. Seules TPP-1c et TPP-1 ont été étudiées sous cette forme car ce sont les deux seules porphyrines strictement comparables, TPP-2 portant des espaceurs plus longs. Aux concentrations étudiées, aucune cytotoxicité n'a été observée à l'obscurité. Il en a été de même pour la phototoxicité, en-dessous de la concentration de 150 nM pour les deux TPP. Nous avons donc choisi de considérer la survie cellulaire à une concentration en TPP (200 nM) à laquelle nous détectons une phototoxicité, sans que celle-ci ne soit provoquée par la toxicité cellulaire intrinsèque de la DMPC. C'est ce que nous présentons dans le tableau 5 :

Système étudié	TPP-1c libre	TPP-1 libre	Liposomes blancs (DMPC)	Liposomes DMPC- TPP-1c	Liposomes DMPC- TPP-1
Survie cellulaire (%) à la concentration de 200 nM en porphyrine	107	105	99	75	60
Erreur (%)	8,7	3,8	-	10,1	9,4

Tableau 5 : phototoxicité après illumination des porphyrines libres et incorporées dans des liposomes de DMPC à la concentration en porphyrine de 200 nM.

Les résultats obtenus montrent que les liposomes incorporant les porphyrines sont plus phototoxiques que les liposomes seuls et que les porphyrines libres à même concentration. En revanche, comme précédemment, nous ne parvenons pas à discriminer le dérivé porphyrinique TPP-1 sucré, du dérivé TPP-1c, son équivalent non sucré. Ceci ne nous permet pas, dans ces conditions, de mettre en évidence l'existence d'une interaction spécifique entre les sucres portés par les porphyrines dendrimériques et les récepteurs exprimés par les cellules.

Ces résultats peuvent se justifier par la trop faible concentration en porphyrine utilisée, mais aussi par une possible déstabilisation des liposomes dans le milieu de culture. C'est que nous avons décidé de vérifier dans la suite de notre travail.

C.2.3. Influence du milieu de culture sur les liposomes de DMPC

La stabilité des liposomes a été évaluée par la mesure de leur taille par DLS. Lors de leur préparation, les liposomes de DMPC ont été réhydratés dans du tampon HEPES contenant 150 mM NaCl puis dilués à 37°C dans du DMEM supplémenté ou non en SVF, la concentration en NaCl étant maintenue à 150 mM, afin d'éviter tout choc osmotique. Le tableau 6 résume ces différents essais.

Liposomes de DMPC	HEPES	DMEM (dilution au 20 ^{ème})	DMEM + 10% SVF (dilution au 20 ^{ème})
Taille moyenne (nm) +/-10 nm	269 (unimodal) PDI = 0,172	247 (unimodal) PDI = 0,272	Distribution bimodale 12 et 111

Tableau 6 : Effet de L'HEPES, du DMEM et du SVF sur la taille de liposomes de DMPC de 2mM. PDI= Indice de polydispersité.

Les résultats montrent que les liposomes de DMPC ne sont pas modifiés après dilution dans du DMEM. En revanche, la présence de 10% de SVF dans le DMEM altère considérablement leur taille. Nous pouvons alors penser que les liposomes sont rapidement détruits dans le milieu de culture lors des études de cytotoxicité et de phototoxicité. La présence de SVF étant indispensable à la survie des cellules, nous pouvons conclure que l'approche classique d'évaluation de l'efficacité des

porphyrines par analyse sur culture cellulaire n'est pas appropriée pour la sélection de nos composés.

C.3. QCM-D

Pour étudier les interactions cellules-porphyrines, il nous fallait trouver une technique d'étude suffisamment rapide pour que nous puissions travailler sans SVF. Pour cela, il fallait s'orienter vers d'autres approches que la culture cellulaire classique. Comme A. Makky avait réalisé l'étude de l'interaction spécifique porphyrine-concanavaleine A sur des bicouches planes par QCM-D (Makky et al. 2011), nous avons décidé de faire adhérer des cellules Y79 à la surface d'un cristal de quartz recouvert de SiO₂ et d'étudier leur interaction avec des liposomes de DMPC et de porphyrines injectés dans le système microfluidique. L'objectif était de comparer ces nouveaux résultats à ceux obtenus précédemment grâce à la même technique, avec le modèle artificiel greffé de concanavaleine A mimant les récepteurs au mannose surexprimés sur les cellules.

C.3.1. Formation de la couche de poly-L-lysine (PLL)

Pour immobiliser des cellules dont la membrane est chargée négativement à la surface du capteur de QCM-D lui-aussi chargé négativement, le dépôt d'une couche de poly-L-lysine a été préalablement effectué, comme décrit au paragraphe B.2.2. La formation de cette couche a été suivie par des mesures de variation de fréquence et de dissipation. La figure 29 montre que l'adsorption de la PLL sur le capteur provoque une diminution importante de la fréquence de résonance du cristal de quartz et l'atteinte d'un état d'équilibre au bout de 10 min ($\Delta f = -6 \pm 0.5$ Hz pour la 5^{ème} harmonique).

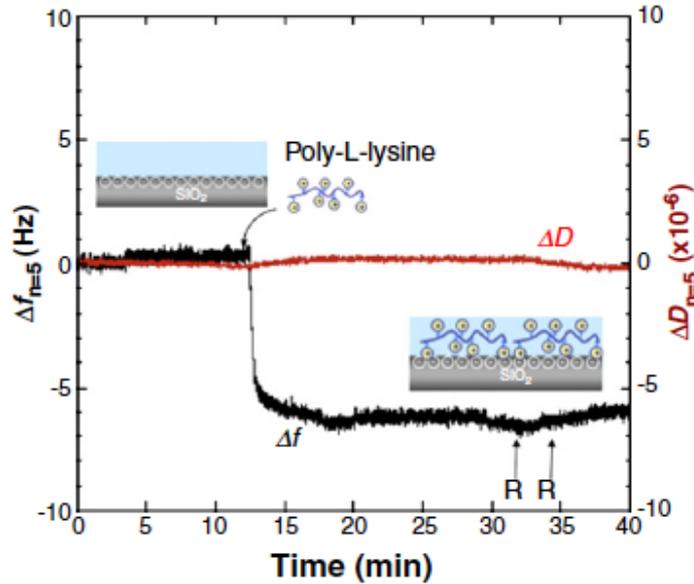


Figure 29 : Δf et ΔD ($n=5$) en fonction du temps lors de l'injection de PLL dans la cellule de mesure du QCM-D (Makky et al. 2012).

Pendant cette même période, aucun changement n'a été observé pour la dissipation, ce qui indique que la PLL forme un film rigide à la surface du capteur. Les mêmes tendances ont été remarquées quelque soit l'harmonique étudiée. Des rinçages au DPBS n'ont pas provoqué par la suite de changements significatifs de fréquence ni de dissipation prouvant que le film à la surface du capteur était fortement adsorbé. Picart et al. (2001) ont obtenus des résultats similaires après avoir formé des multicouches de PLL et d'acide hyaluronique ; l'adsorption de la première couche de PLL à la surface du capteur provoque une diminution de la fréquence de résonance de quelques Hz sans modification de la dissipation.

C.3.2. Dépôt des cellules Y79

Après formation de la couche de PLL sur le capteur du QCM-D, les cellules Y79 ont été injectées dans la cellule de mesure. La réponse provoquée par l'adhésion de ces cellules sur le capteur est présentée dans la figure 30.

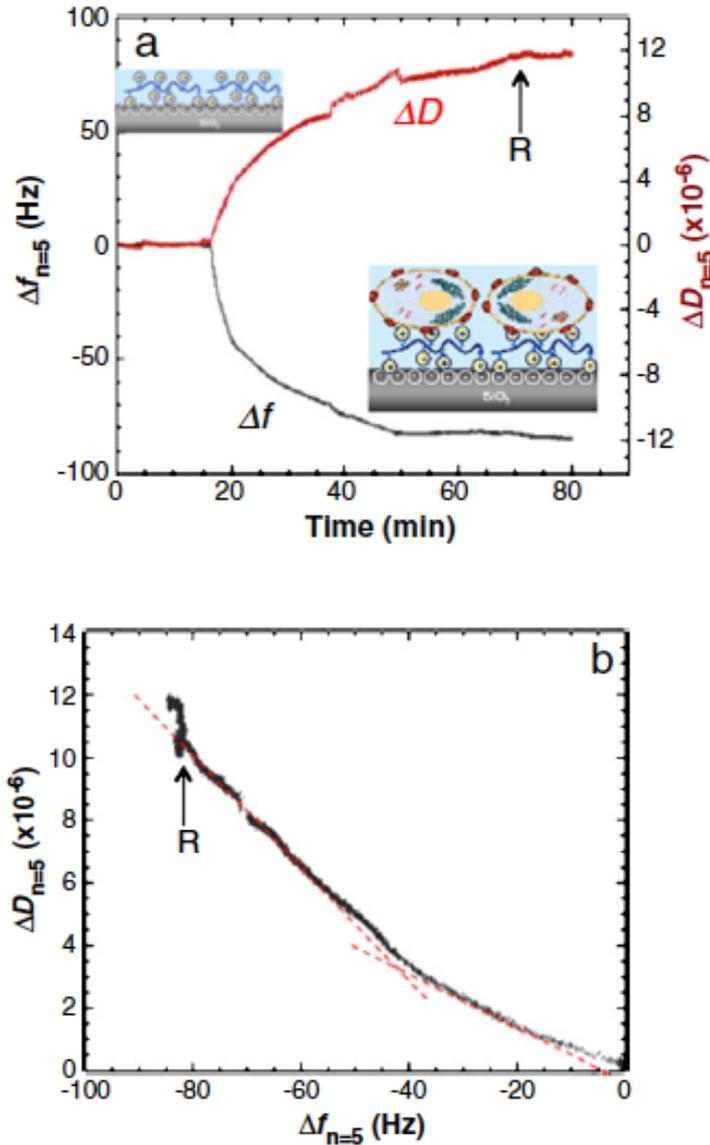


Figure 30 : (a) Evolution de la fréquence de résonance Δf et de la dissipation ΔD au cours du temps ($n=5$) après injection des cellules Y79 (500 000 /mL) dans du DMEM sur le capteur du QCM-D recouvert de PLL. (b) Expression de la variation de dissipation en fonction de la variation de fréquence, R = rinçage (Makky et al. 2012).

L'injection des cellules Y79 a provoqué une diminution très forte de la fréquence de résonance du cristal (Figure 30a, Δf , courbe en noir). Ceci s'explique par l'importante masse déposée à sa surface. Cette diminution a été associée à une augmentation de l'énergie de dissipation (Figure 30a, ΔD , courbe en rouge), les cellules déposées à la surface du capteur augmentant la viscosité du milieu. Après 50 min, les paramètres Δf and ΔD se sont stabilisées aux valeurs respectives d'environ -90 Hz et $12 \cdot 10^{-6}$. Les cellules Y79 ont été laissées en contact avec le capteur pendant une heure, puis un rinçage avec du DMEM a été effectué. Ce dernier n'a induit aucune modification dans la fréquence et la dissipation, ce qui indique que les cellules étaient fortement attachées à la surface du capteur.

Si l'adhésion de cellules adhérentes sur surface solide a été largement décrite (Fredriksson et al. 1998, Wegener et al. 1998, Moseke et Ewald, 2009, Marx et al. 2005), c'est la première fois, cependant, que des cellules suspensives ont été adsorbées sur un capteur de QCM-D. L'adhésion reste difficile à quantifier. L'équation de Sauerbrey (1959) qui décrit dans l'air la relation de proportionnalité entre la fréquence d'oscillation et la masse déposée n'est pas applicable ici à cause de la viscosité du milieu et des cellules. Le modèle de Voinova (Voinova et al. 1999) ne peut pas être utilisé, les cellules n'étant pas uniformément réparties sur le capteur, comme nous le montrons dans la figure 31. Une observation microscopique des cellules a en effet été réalisée après fixation de cellules Y79 sur une lame de verre recouverte de PLL. Elle a montré que la couverture de la surface par les cellules était inhomogène et incomplète, avec un taux de couverture d'environ 50%. En utilisant un test colorimétrique de viabilité cellulaire (bleu trypan, colorant les cellules mortes), nous avons pu montrer une forte mortalité après une heure d'adhésion (figure 32).

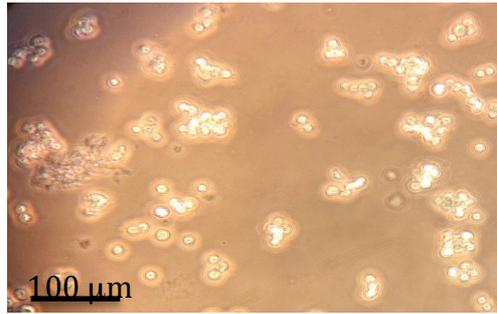


Figure 31 : cellules Y79 adsorbées sur une lame de verre recouverte de PLL

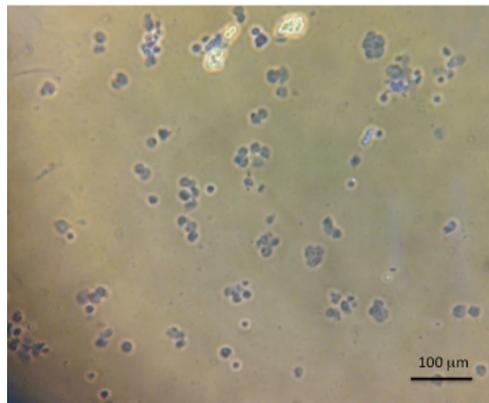


Figure 32 : cellules Y79 colorées au bleu trypan (cellules bleues = cellules mortes) adsorbées sur une lame de verre recouverte de PLL à $t = 1h$

Le cristal de quartz vibre en milieu aqueux à la fréquence fondamentale de 5 MHz. La longueur associée à cette onde de cisaillement est d'environ 250 nm, bien inférieure au diamètre d'une cellule Y79 (18 μm). Seule une fraction de la masse de cellules peut être donc détectée par le changement de fréquence. Par conséquent, la masse mesurée par le QCM-D est donc bien inférieure à la masse réellement adsorbée. Seule la détection d'une petite région du capteur près de l'électrode provoque l'augmentation de l'énergie de la dissipation (figure 30). Les cellules peuvent être perçues comme une petite perturbation des propriétés interfaciales générales de la surface du capteur. La figure 30b qui exprime le changement de dissipation en fonction du changement de fréquence permet d'obtenir des informations plus reproductibles, en s'affranchissant du temps, et en montrant l'évolution du comportement visco-élastique du système. Deux régimes peuvent être ainsi mis en évidence, sans qu'il soit encore possible de déduire exactement à quoi ils correspondent.

C.3.3. Interaction des liposomes incorporant les porphyrines dendrimériques avec les cellules Y79

Les porphyrines dendrimériques TPP-1c, TPP-1 et TPP-2 incorporées dans les liposomes de DMPC ont été injectées dans la cellule de mesure avec un débit de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. La figure 33 montre des différences dans la variation de la fréquence de résonance et de l'énergie de dissipation après injection des différents types de liposomes. Il existe donc des types de liaisons distinctes entre les liposomes et les cellules selon la porphyrine incorporée. Seuls les liposomes portant les porphyrines TPP-1 et TPP-2 produisent une variation significative de la fréquence de résonance (respectivement -29 and -39 Hz après rinçage) et de l'énergie de dissipation; ces liposomes s'adsorbent à la surface des cellules en augmentant ainsi la masse déposée sur le capteur. La stabilisation est observée 30 minutes après l'injection. L'augmentation de l'énergie de dissipation nous indique un comportement plus visqueux de la couche adsorbée sur le capteur, ce qui s'explique par la structure des liposomes (cœur aqueux) déposés sur les cellules.

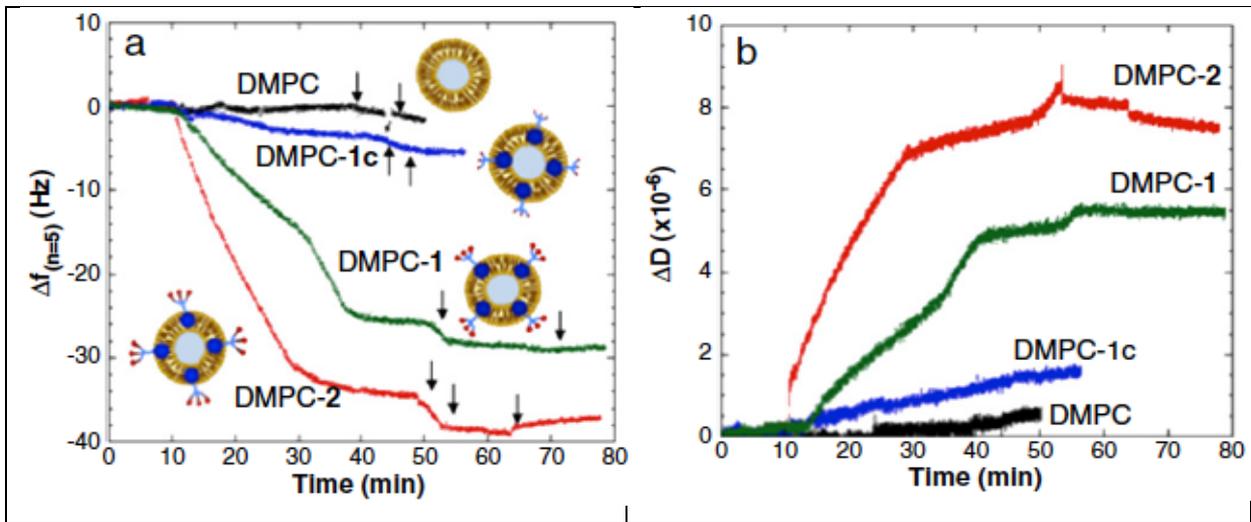


Figure 33 : Evolution de Δf (a) and ΔD (b) ($n=5$) au cours du temps sur un capteur recouvert de cellules Y79, après injection de liposomes (Makky et al. 2012).

Nous avons observé une cinétique d'absorption plus rapide et une variation de la fréquence plus importante pour la porphyrine TPP-2 incorporée dans les liposomes de DMPC que pour la porphyrine TPP-1. La mobilité des mannoses greffés est augmentée en raison de la présence d'espaceurs plus longs (TEG pour TTP-2 au

lieu de DEG pour TPP-1), ce qui favoriserait leur interaction avec les récepteurs à sucre surexprimés sur les membranes cellulaires. Les étapes de rinçage par du DMEM n'ont pas provoqué de désorption, montrant ainsi que les liposomes contenant TPP-1 et TPP-2 étaient fortement attachés à la couche de cellules Y79.

Deux questions se posent, toutefois : ce que nous voyons correspond-il vraiment à l'attachement des porphyrines aux cellules ? Ou au capteur, dans les espaces laissés libres entre les cellules ? Si l'adhésion des molécules se fait bien au niveau des cellules, cette interaction a-t-elle réellement lieu au niveau des récepteurs à sucre ?

Comme nous l'avons mentionné précédemment, ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus avec le modèle membranaire établi par A. Makky et fonctionnalisé par la concanavoline A. La cinétique d'adsorption est comparable (même profil), mais les taux d'adsorption des porphyrines mannosylées sont plus élevés avec le modèle qu'avec les cellules. La densité de concanavoline A à la surface du modèle a été évaluée à 35% (Makky et al. 2011). De plus, la géométrie planaire de la bicouche rend cette lectine accessible à toutes les molécules. Le taux de couverture sur le capteur étant d'au maximum 50% pour les cellules Y79, la quantité de récepteurs au mannose présents est sans doute moindre et tous les récepteurs ne sont pas exposés (figure 31).

En réalisant cette expérience, notre objectif était de mettre en évidence les interactions spécifiques entre les porphyrines glycodendrimériques et les récepteurs au mannose des membranes des cellules Y79. Nos premiers résultats sur la QCM-D tendent à valider l'existence de ces interactions. Toutefois, pour répondre aux deux questions posées plus haut et s'assurer que la variation du signal enregistrée est bien provoquée par cette interaction spécifique, nous avons injecté pendant 15 minutes avant les liposomes portant TPP-2, du mannane, un polymère de mannose. L'intérêt de ce polymère est qu'il peut se fixer à plusieurs récepteurs à mannose en même temps et jouer le rôle d'inhibiteur puissant de l'interaction porphyrine glycodendrimérique-récepteur (Bar-Shavit et al. 1980). Les résultats que nous avons obtenus, avec et sans injection préalable de mannane, sont présentés dans la figure 34 :

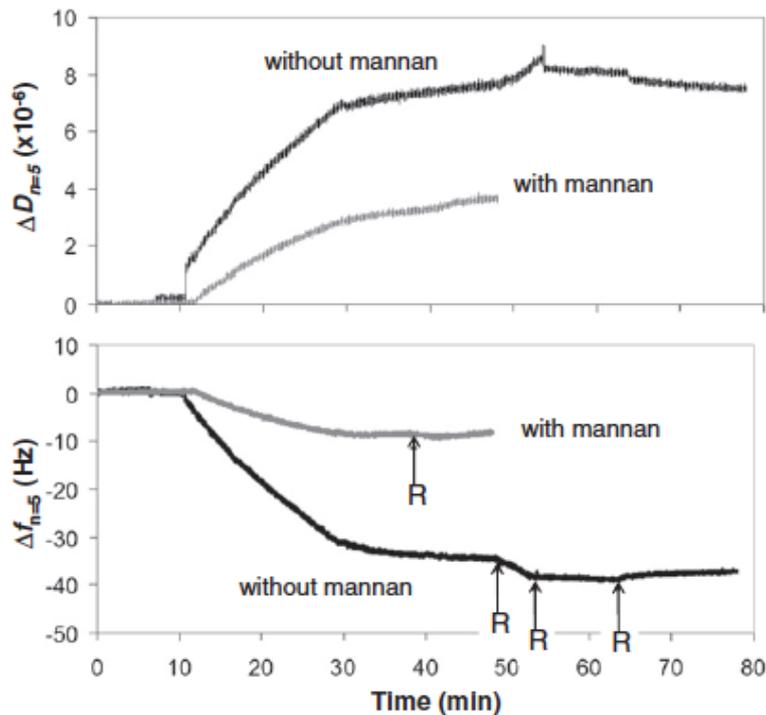


Figure 34 : Variation de Δf et ΔD ($n=5$) au cours du temps après injection de liposomes portant la porphyrine TPP-2 sur un capteur recouvert des cellules Y79, selon que cette injection ait été précédée ou non d'une injection de mannane. R= rinçage (Makky et al. 2012).

La présence de mannane provoque une diminution limitée de la fréquence de résonance ($\Delta f \sim -8$ Hz, contre ~ -37 Hz sans mannane). La même tendance est remarquée pour l'énergie de dissipation, plus faible en présence de mannane que sans (ΔD de 4.10^{-6} contre $7.5.10^{-6}$ sans mannane). Ces résultats montrent que lorsque les sites de reconnaissance des sucres au niveau des récepteurs sont saturés par le polymère de mannose, les liposomes contenant la porphyrine TPP-2 s'adsorbent moins. Ceci démontre que TPP-2 interagit bien avec les cellules Y79 via les récepteurs aux sucres surexprimés à leur surface.

Les valeurs de fréquence et de dissipation enregistrées pour les liposomes de TPP-2-DMPC adsorbés après injection de mannane étant semblables à celles obtenues par ceux portant la molécule contrôle, TPP-1c, nous pouvons déduire que ces valeurs correspondent aux interactions non spécifiques des liposomes avec la membrane cellulaire. La figure 35 schématise les différentes expériences réalisées :

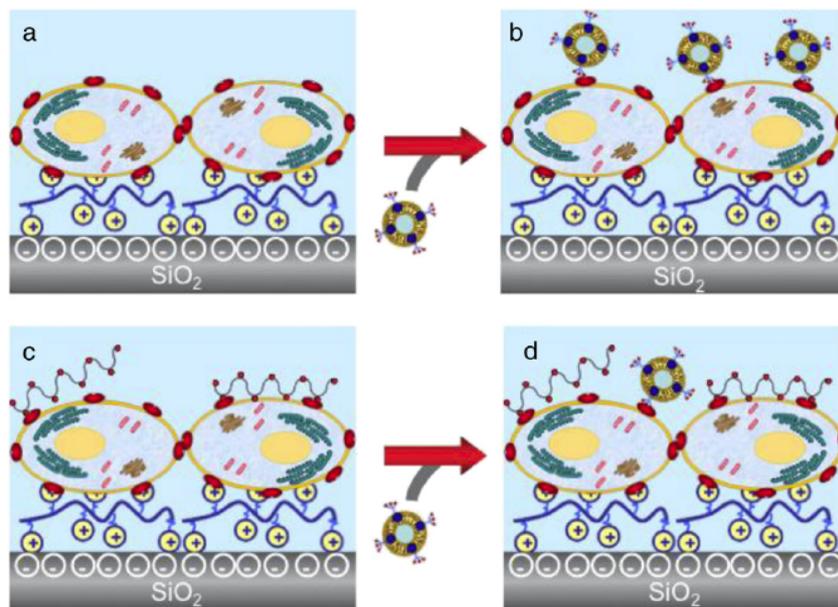


Figure 35 : Hypothèse du mécanisme d'interaction entre la porphyrine TPP-2 incorporée dans les liposomes de DMPC et les cellules Y79 adsorbées à la surface du capteur recouvert de PLL : a) adhésion des cellules Y79, b) fixation massive des liposomes aux récepteurs, c) injection du mannane et d) compétition entre le mannane et les liposomes de TPP-2 (Makky et al. 2012).

L'agrégation des porphyrines dendrimériques en solution aqueuse et leur association aux protéines du sérum entrave leur évaluation par les techniques de culture cellulaire classique. L'incorporation de ces molécules dans des liposomes de DMPC n'a pas permis de mettre en évidence les interactions spécifiques entre les sucres de porphyrines glycodendrimériques et les récepteurs aux mannoses surexprimés sur les cellules de rétinoblastome car les liposomes sont détruits par le sérum de veau foetal pourtant indispensable à la survie cellulaire.

C'est grâce à une technique physico-chimique, la QCM-D, exploitée de manière innovante, permettant d'obtenir une réponse rapide et nous affranchissant ainsi de la nécessité d'utiliser du SVF que nous avons pu discriminer les différentes porphyrines, en mettant en évidence l'intérêt des sucres qu'elles portent pour leur interaction avec les cellules. Les expériences que nous avons menées et qui complètent l'étude réalisée par A. Makky dans le cadre de sa thèse, ont également permis de confirmer que la longueur de l'espaceur joue un rôle non négligeable sur l'interaction, en éloignant les sucres du macrocycle et en favorisant leur mobilité.

Si la capacité d'interaction spécifique entre les porphyrines glycodendrimériques et les cellules Y79 a été clairement mise en évidence, les expériences de QCM-D n'ont pas permis de déterminer la capacité de pénétration de ces porphyrines dans les cellules, après leur fixation au récepteur, ou par un mécanisme non spécifique, ou encore de les comparer à TPP(DegMan)₃.

Ayant mis à jour les faiblesses des études en cultures cellulaires classiques, nous avons décidé de continuer nos études par cytométrie en flux, qui présente plusieurs avantages : comme la QCM-D, elle permet de travailler sur des temps courts, mais aussi sur des temps longs, d'étudier les porphyrines sous forme libre comme en culture cellulaire, en utilisant de faibles concentrations en SVF tout en maintenant les cellules en vie plus longtemps (car cellules restent en suspension).

Références :

Ballut, S., Makky, A., Chauvin, B., Michel, J-P., Kasselouri, A., Maillard, Ph., Rosilio, V., Tumor targeting in photodynamic therapy. From glycoconjugated photosensitizers to glycodendrimeric one. Concept, design and properties. *Org. Biomol. Chem.* 10, 4485–4495 (2012).

Ballut, S., Makky, A., Loock, B., Michel, J-P., Maillard, Ph., Rosilio, V., New strategy for targeting of photosensitizers. Synthesis of glycodendrimeric phenylporphyrins, incorporation into a liposome membrane and interaction with a specific lectin. *Chem. Commun. (Camb.)* 224–226 (2009).

Bangham, AD., Standish, MM., Watkins, JC., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238–252 (1965).

Chauvin, B., Thèse, "Physico-chimie de méso-tétraphénylporphyrines glycoconjuguées pour la Photothérapie Dynamique : vers une meilleure compr.hension de la distribution plasmatique et de la localisation subcellulaire ?", Université Paris Sud, (2011).

Fredriksson, C., Khilman S., Kasemo, B., Steel, DM., In Vitro Real-time Characterization of Cell Attachment and Spreading, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 9, no. 12, 785–788 (1998).

Laville, I., Pigaglio, S., Blais, JC., Doz, F., Loock, B., Maillard, Ph., Grierson, DS., Blais, J. Photodynamic efficiency of diethylene glycol-linked glycoconjugated porphyrins in human retinoblastoma cells. *J. Med. Chem.* 49, 2558–2567 (2006).

Makky, A., Michel, J-P., Maillard, P. & Rosilio, V. Biomimetic liposomes and planar supported bilayers for the assessment of glycodendrimeric porphyrins interaction with an immobilized lectin. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 656–666 (2011).

Makky, A., Michel, J-P., Ballut, S., Kasselouri, A., Briand, E., Maillard, Ph., Rosilio, V., Evaluation of the specific interactions between glycodendrimeric porphyrins, free or incorporated into liposomes, and concanavalin A by fluorescence spectroscopy, surface pressure, and QCM-D measurements. *Langmuir* 26, 12761–12768 (2010).

Makky, A., Michel, J-P., Ballut, S., Kasselouri, A., Maillard, Ph., Rosilio, V., Effect of cholesterol and sugar on the penetration of glycodendrimeric phenylporphyrins into biomimetic models of retinoblastoma cells membranes. *Langmuir* 26, 11145–11156 (2010).

Makky, A., Thèse "Analyse des mécanismes de pénétration intramembranaire de porphyrines glycoconjuguées utilisables en thérapie photodynamique des cancers : modélisation des interactions spécifiques et non-spécifiques." Université Paris-Sud (2010).

Marx, KA., Zhou, T., Montrone, A., McIntosh, D., Braunhut, SJ., Quartz crystal microbalance biosensor study of endothelial cells and their extracellular matrix following cell removal: Evidence for transient cellular stress and viscoelastic changes during detachment and the elastic behavior of the pure matrix. *Analytical biochemistry*, 343(1), 23–34 (2009).

Moseke, C., Ewald, A., Cell and Protein Adsorption Studies Using . Quartz Crystal Microgravimetry with Dissipation Monitoring, *Materialwissenschaft Und Werkstofftechnik* 40, no. 1–2 (2009).

Picart, C., Lavalley, P., Hubert, P., Cuisinier, F.J.G., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.-C., Buildup Mechanism for Poly(L-lysine)/Hyaluronic Acid Films onto a Solid Surface. *Langmuir* 17, 7414–7424 (2001).

Reid, TW., Albert, DM., Rabson, AS., Russell, P., Craft, J., Chu, EW., Tralka, TS., Wilcox, J.L., Characteristics of an established cell line of retinoblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 347–360 (1974).

Sauerbrey, G., Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung, *Zeitschrift für Physik*, 155, p. 206-222(1959).

Voinova, M. V., Rodahl, M., Jonson, M., & Kasemo, B. (1998). Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces, *Continuum mechanics approach* (1998).

Wang, ZJ., Chauvin, B., Maillard, Ph., Hammerer, F., Carez, D., Croisy, A., Sandré, C., Chollet-Martin, S., Prognon, P., Paul, JL., Blais, J., Kasselouri, A., Glycodendrimeric phenylporphyrins as new candidates for retinoblastoma PDT: blood carriers and photodynamic activity in cells. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 115, 16–24 (2012).

Wegener J., Janshoff A., Galla H-J., Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: comparative analysis of different mammalian cell lines. *Eur Biophys J.* Nov 1;28(1):26–37 (1998).

Deuxième partie :

Etude de la capture cellulaire des dérivés porphyriniques par cytométrie en flux

Chapitre 1 : Evaluation des propriétés spectrales des porphyrines par spectrofluorimétrie

A. Introduction

L'étude décrite dans la première partie a montré que la phototoxicité des porphyrines dendrimériques déterminée par le test classique de viabilité MTS sur les cellules Y79 est similaire pour tous les photosensibilisateurs dendrimériques étudiés qu'ils soient porteurs de sucres ou non (IC_{50} de 2,0 μ M pour TPP-1c, 2,9 μ M pour TPP-1 et 5,2 μ M pour TPP-2). Toutes ces porphyrines possèdent des IC_{50} supérieures à celle de la porphyrine de la génération précédente non dendrimérique, TPP-(DegMan)₃ (0,35 μ M). Elles sont moins efficaces. Des résultats analogues ont été obtenus sur cellules HT29.

Les porphyrines libres s'agrègent fortement dans le milieu de culture. Cette agrégation pouvant limiter leur interaction avec les cellules HT 29 et Y79, nous avons réalisé l'évaluation cellulaire en incorporant, cette fois, les porphyrines dendrimériques dans des liposomes de DMPC, au ratio lipide-porphyrine 500/1, afin de mieux les solubiliser. Cependant, la DMPC elle-même présente une toxicité élevée vis-à-vis des cellules. Son IC_{50} (170 μ M pour les cellules Y79) est si faible que lorsqu'on réalise l'étude à une concentration de DMPC plus faible, celle des porphyrines dans le milieu devient insuffisante pour induire un effet. De plus, comme nous l'avons montré, les liposomes sont déstabilisés par le sérum de veau foetal ajouté au milieu de culture (10% pour les cellules HT29 et 20% pour les cellules Y79). Nous n'avons donc pas pu tirer de conclusion de ces expériences. Les IC_{50} élevées mesurées pouvaient aussi bien résulter d'un défaut de capture et/ou de pénétration des porphyrines, que des conditions inadéquates d'étude.

La cytométrie en flux permet de déterminer la capture d'une substance active par une cellule dans des conditions plus appropriées aux propriétés des porphyrines. En effet, les études de capture peuvent être mises en place sur des temps d'incubation plus courts que celles de phototoxicité dans lesquelles les porphyrines sont incubées 24h avec les cellules pour maximiser l'internalisation. Mais les études de cytométrie en flux ne permettent pas de distinguer la porphyrine qui pénètre dans la cellule de celle qui n'y pénètre pas. Elles ne permettent pas non plus de comparer l'efficacité des molécules. Il est cependant possible de distinguer une interaction spécifique saturable d'une interaction non spécifique.

Jusqu'à présent, seule l'étude sur QCM-D nous a permis de mettre en évidence l'interaction spécifique entre les porphyrines glycodendrimériques et les récepteurs aux sucres surexprimés à la surface des cellules Y79. Cependant, pour réaliser les expériences avec la QCM, il a été nécessaire d'incorporer les porphyrines dans des liposomes. Si cela nous a permis de démontrer que les porphyrines glycodendrimériques peuvent effectivement être reconnues par le récepteur à mannose des cellules Y79 par l'intermédiaire de leur extrémités sucres, il n'a pas été possible d'étudier de cette façon la molécule de référence, TPP(DegMan)₃ car les liposomes contenant cette substance sont instables. De plus, la QCM n'a permis que de démontrer l'interaction spécifique : la pénétration des molécules par un mécanisme non spécifique observée en monocouche et par quenching de fluorescence sur liposomes par Makky et al. (2010a) n'a pu être mise en évidence sur bicouches, car les porphyrines ne pouvaient être étudiées sous forme libre. Enfin, nous avons observé que l'adsorption forcée des cellules à une surface recouverte de PLL raccourcissait leur durée de vie. Il ne serait donc pas possible d'étudier la pénétration intracellulaire par microscopie de fluorescence selon la technique décrite par N. Duhem (Duhem, thèse 2013). Afin d'approfondir ce premier résultat et de comprendre plus en détail pourquoi, malgré l'existence d'interactions cellules-molécules, les IC₅₀ de ces dernières sont supérieures à l'IC₅₀ de la molécule de référence TPP-(DegMan)₃, nous avons décidé de nous orienter vers des études de cytométrie en flux, permettant ainsi la comparaison porphyrines dendrimériques et porphyrine de référence, les molécules étant étudiées cette fois sous forme libre. La cytométrie en flux est une technique d'étude biologique classique pour l'étude des interactions molécules-récepteurs.

Grâce aux propriétés de fluorescence intrinsèques des porphyrines nous avons pu mettre en place une approche originale d'étude.

En effet, les porphyrines ne sont détectées par le laser du cytomètre que lorsqu'elles sont capturées par les cellules Y79 (à la surface ou internalisées) et ce pour plusieurs raisons :

- Seules, sous forme monomérique, leur taille est en-dessous du seuil de détection. Dans un milieu aqueux supplémenté par du sérum de veau fœtal (SVF), les porphyrines peuvent s'associer aux protéines du sérum et se retrouver sous forme monomérique, mais la taille du complexe reste malgré tout en-dessous du seuil de détection.
- En milieu aqueux, même s'il contient du SVF, les porphyrines non associées aux protéines s'agrègent, ce qui provoque un quenching de fluorescence.

En incubant cellules Y79 et dérivés porphyriniques, et en suivant l'évolution de la fluorescence au cours du temps, nous pouvons étudier en temps réel les capacités d'interaction des molécules avec la cellule. De plus, en faisant varier la température, nous pouvons également déterminer le mode de capture prédominant. Les propriétés spectrales des porphyrines sont donc cruciales dans cette approche. Bien que les porphyrines synthétisées par l'équipe de Philippe Maillard aient toutes le même chromophore, leurs spectres et leurs intensités de fluorescence peuvent être modifiés par les différents substituants greffés au macrocycle tétrapyrrolique.

Par conséquent, l'étude des propriétés spectrales des molécules TPP-1, TPP-2, TPP-1c et TPP-(DegMan)₃ constituait donc un préalable indispensable.

Les propriétés spectrales des porphyrines ont donc été déterminées, en milieu aqueux (DPBS) et aux concentrations choisies pour les études ultérieures (de 100 à 600 nM) dans le but de mimer les conditions expérimentales ultérieures. Elles ont été comparées aux spectres obtenus dans un milieu organique (méthanol) où la fluorescence des porphyrines est optimale. L'influence de la température (22°C et 4°C) sur l'intensité de fluorescence des dérivés porphyriniques a également été analysée.

B. Matériel et méthodes

B.1. Solutions de dérivés porphyriniques

Des solutions mères des porphyrines TPP-1, TPP-2, TPP-1c et TPP-(DegMan)₃ ont été préparées dans le DMSO à la concentration de 10⁻³ M. Ces solutions mères ont ensuite été diluées au centième dans du DPBS ou du méthanol selon les cas, pour donner des solutions filles à 10⁻⁵ M. Différents volumes des solutions filles ont été

ensuite prélevés et injectés dans une cuve de quartz remplie de DPBS ou de méthanol afin d'atteindre une concentration en TPP-1, TPP-2, TPP-1c et TPP-(DegMan)₃ de 100, 300, 400, 500 ou 600 nM.

B.2. Caractéristiques de l'appareil et conditions d'études

Nous avons étudié, grâce à un spectrofluorimètre SPEX, les spectres d'émission de fluorescence des 4 porphyrines dans les 2 milieux (organique et aqueux), à deux températures (22°C et 4°C), entre 600 et 800 nm après excitation par une lampe UV réglée à 405 nm. Cette longueur d'onde se trouve dans la bande de Soret des spectres d'absorbance des dérivés porphyriniques dans le DPBS et le méthanol et correspond à celle que nous avons utilisé par la suite en cytométrie en flux (figure 36, Wang et al. 2012).

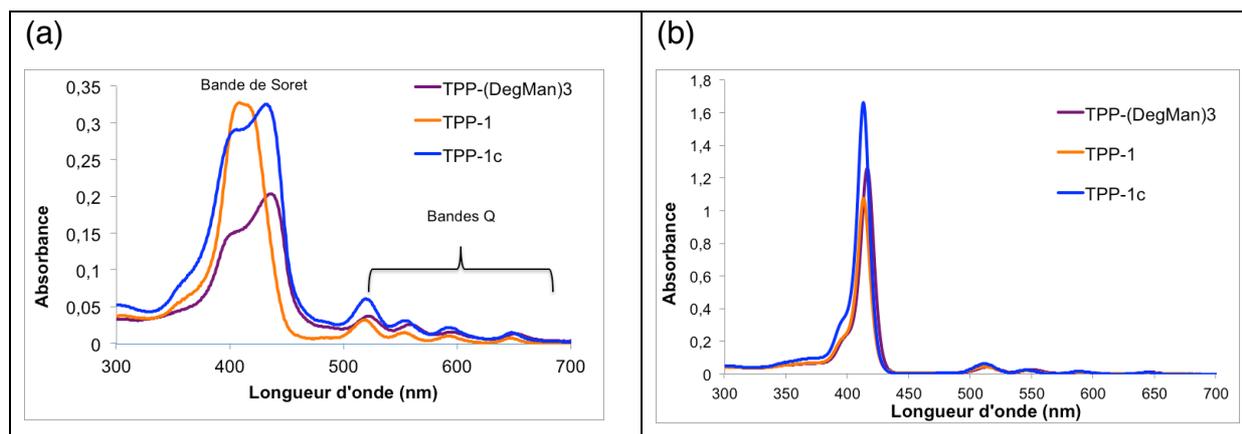


Figure 36 : spectres d'absorption des porphyrines TPP-1, TPP-1c et TPP-(DegMan)₃ à 4 μ M dans du DPBS (a) et du méthanol (b), à température ambiante (d'après Wang et al., 2012).

Les porphyrines possèdent un système d'électrons π fortement conjugués. Elles absorbent la lumière dans le domaine du visible et présentent un spectre d'absorption très caractéristique : une bande intense entre 350 et 450 nm (proche UV) appelée bande de Soret et quatre bandes situées entre 490 et 690 nm (visible) d'intensité plus faible appelées bandes Q. La bande de Soret et les bandes Q proviennent de transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ du système aromatique de la porphyrine. Les transitions provenant du deuxième état excité 2S (Bande de Soret) sont totalement

permises ; celles du premier état excité 1S (bandes Q) sont quasi-permises. Ceci explique que l'intensité d'absorption de la Bande de Soret soit beaucoup plus intense que celles des bandes Q.

C. Résultats et discussion

C.1. Fluorescence des dérivés porphyriniques dans le méthanol

Bien qu'amphiphiles, les porphyrines étudiées sont peu solubles en milieu aqueux. Elles sont, en revanche, soluble dans le méthanol qui constitue le milieu optimal pour les analyser sous forme de monomères, lorsque leur fluorescence est maximale (figure 37).

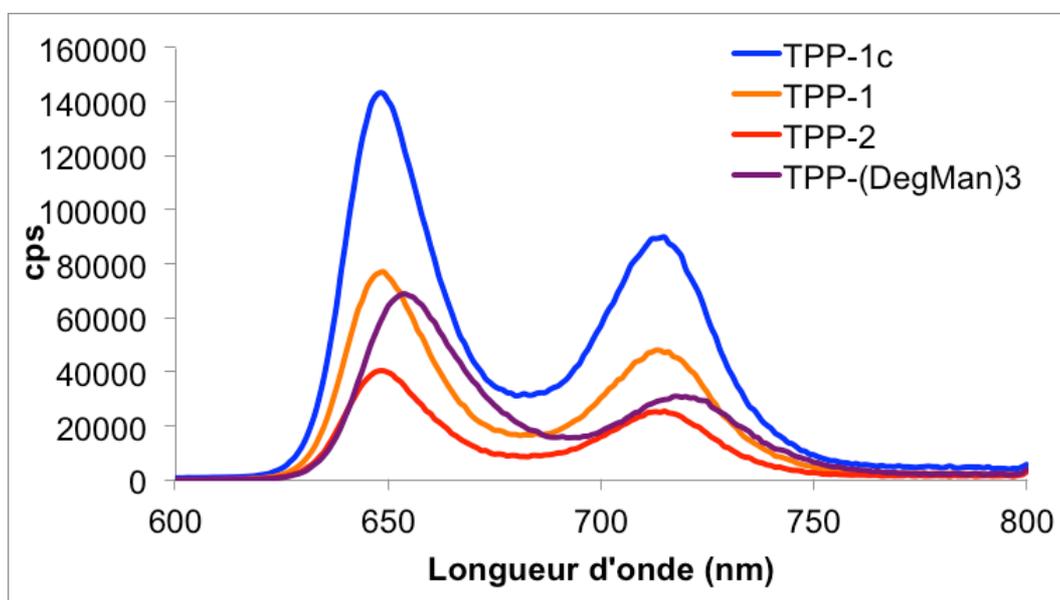


Figure 37 : spectre d'émission de TPP(DegMan)₃, TPP-1c, TPP-1 et TPP-2 dans le méthanol à la concentration de 100 nM, à 22°C.

L'allure des spectres d'émission est similaire pour tous les composés étudiés, avec deux bandes d'émission. Dans tous les cas, dans le méthanol, la première bande est plus intense que la seconde. Les longueurs d'onde d'émission de fluorescence sont présentées dans le tableau 7.

Porphyrines (100 nM) / Méthanol 22°C	$\lambda_{em 1}$ (nm)	$\lambda_{em 2}$ (nm)
TPP-1	649	713
TPP-2	649	713
TPP-1c	649	715
TPP-(DegMan) ₃	654	718

Tableau 7: longueurs d'ondes d'émission maximales des différentes porphyrines dissoutes dans le méthanol.

On observe un léger décalage du spectre d'émission de la porphyrine TPP(DegMan)₃ vers les longueurs d'ondes plus élevées par rapport aux trois porphyrines dendrimériques. Ceci peut s'expliquer par la structure moléculaire différente des deux générations de porphyrines.

La porphyrine présentant l'intensité de fluorescence la plus élevée dans le méthanol est TPP-1c. Viennent ensuite TPP-1 et TPP-(DegMan)₃. TPP-2, quant à elle, est la porphyrine dont l'intensité de fluorescence est la plus faible. Ces différences d'intensité dans le méthanol peuvent s'expliquer par la différence d'hydrophilie des porphyrines due à la présence des sucres et d'espaceurs éthylène glycol (EG) plus ou moins longs sur les porphyrines TPP-1, TPP-2 et la localisation des substituants sur TPP-(DegMan)₃.

Le coefficient de partage d'une molécule permet de quantifier son caractère plutôt hydrophile ou hydrophobe. Il se définit comme le rapport P des concentrations de la molécule dans une phase organique (par exemple l'octanol) et dans une phase aqueuse (eau). Un logP négatif indiquera une molécule plutôt hydrophile, tandis qu'un logP positif indiquera une molécule plutôt hydrophobe. Séverine Ballut (thèse, 2010) a étudié par la méthode « flacon agité » le coefficient de partage des molécules entre le 2-octanol et le DPBS (Kessel et al., 1977). Nos porphyrines possèdent toutes un coefficient de partage différent (tableau 8).

Porphyrines	logP \pm 0,3
TPP-1c	1,6
TPP-1	-0,65
TPP-2	-0,94
TPP-(DegMan) ₃	1,05

Tableau 8 : Coefficient de partage des différentes porphyrines étudiées (Ballut, 2010).

TPP-2, avec son espaceur plus long (TEG) que TPP-1 (DEG) et ses trois résidus mannose, est la porphyrine dont le logP est le plus faible. C'est donc le composé le plus hydrophile. TPP-1c, unique molécule non sucrée est, au contraire, le dérivé le plus hydrophobe. Entre ces deux extrêmes, TPP-1 et TPP-(DegMan)₃ possèdent des valeurs de logP intermédiaires.

Les intensités de fluorescence du spectre d'émission dans le méthanol décroissent dans le sens TPP-1c > TPP-1 > TPP-2, ce qui se justifie totalement au regard des valeurs de logP de ces molécules. TPP-(DegMan)₃ est difficilement comparable aux porphyrines dendrimériques, car sa structure chimique est très différente.

C.2. Fluorescence des dérivés porphyriniques porphyrines en milieu aqueux
Afin de mimer les conditions expérimentales utilisées ultérieurement, nous avons étudié la fluorescence des dérivés porphyriniques en milieu aqueux à 22°C et 4°C. Avant de débiter ces expériences, nous avons voulu vérifier que le DMSO, solvant des solution mères des molécules, n'émettait pas de fluorescence propre.

C.2.1. Spectres du DMSO seul dans du DPBS (blanc)

Une gamme de blancs composés de DMSO en concentration croissante (de 100 à 600 nM) dans du DPBS, a été réalisée et analysée. Elle constitue le contrôle des spectres d'émission des porphyrines obtenus après dilution des solutions-mères dans le tampon. Les spectres sont présentés dans la figure 38 :

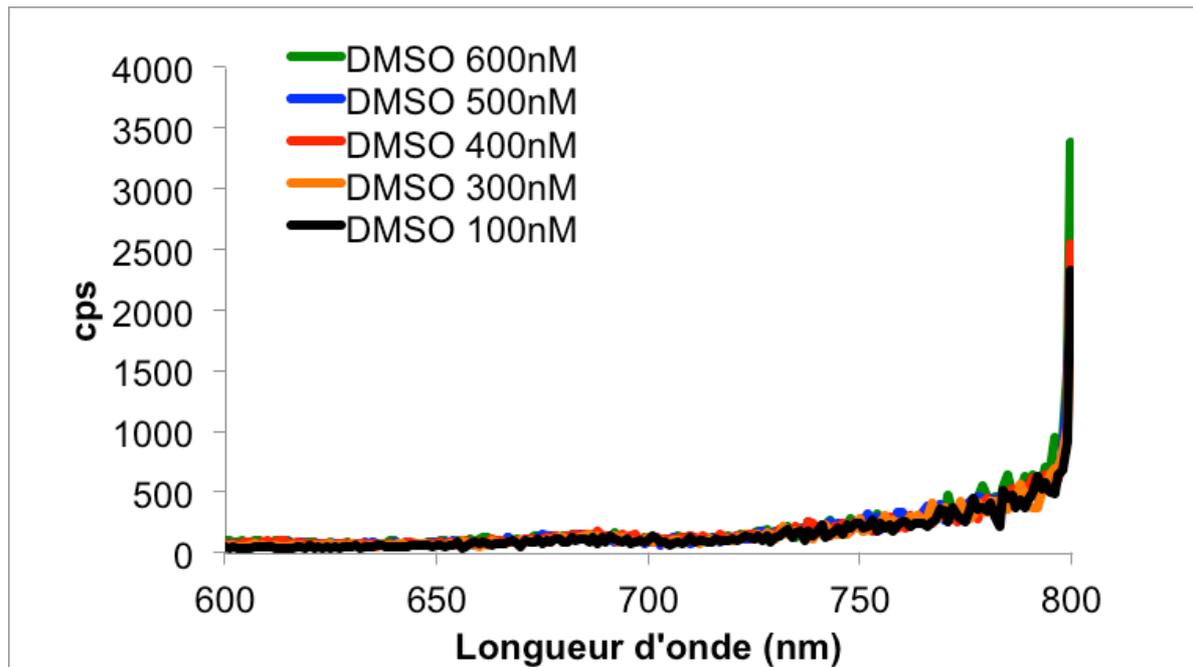


Figure 38 : spectres du DMSO dans le DPBS à 22°C aux concentrations de 100, 300, 400, 500 et 600 nM.

Nous n'avons observé aucune fluorescence pour le DMSO seul et ce, quelque soit sa concentration. Les pics visibles entre 760 et 800 nm sont vraisemblablement des artefacts.

C.2.2. Spectres de fluorescence des dérivés porphyriniques en milieu aqueux (DPBS) à 22°C

Nous avons ensuite mesuré les intensités de fluorescence des différentes porphyrines à différentes concentrations (100, 300, 400, 500 et 600 nM) lorsqu'elles sont injectées dans le DPBS (figure 39).

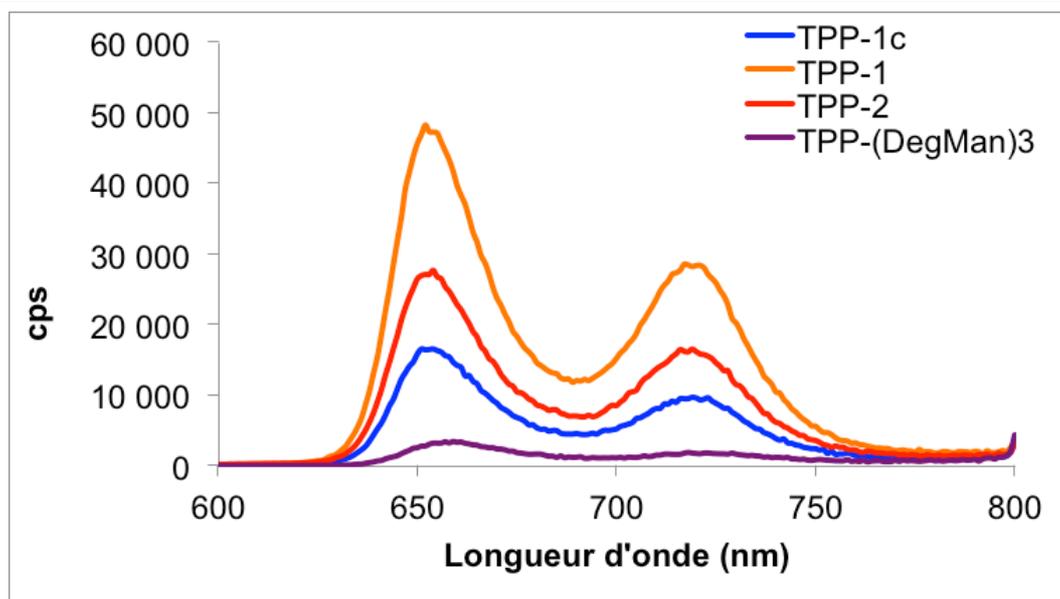


Figure 39: spectre d'émission de TPP-(DegMan)₃, TPP-1c, TPP-1 et TPP-2 dans le DPBS à la concentration de 100 nM, à la température de 22°C.

L'allure des spectres de fluorescence dans le DPBS à température ambiante est similaire à celle de ceux obtenus dans le méthanol. On remarque toutefois que les longueurs d'ondes d'émission maximales sont légèrement déplacées vers des valeurs plus élevées (tableau 9).

Porphyrines (100 nM) / DPBS (22°C)	$\lambda_{em 1}$ (nm)	$\lambda_{em 2}$ (nm)
TPP-1	652	717
TPP-2	654	719
TPP-1c	654	719
TPP-(DegMan) ₃	659	718

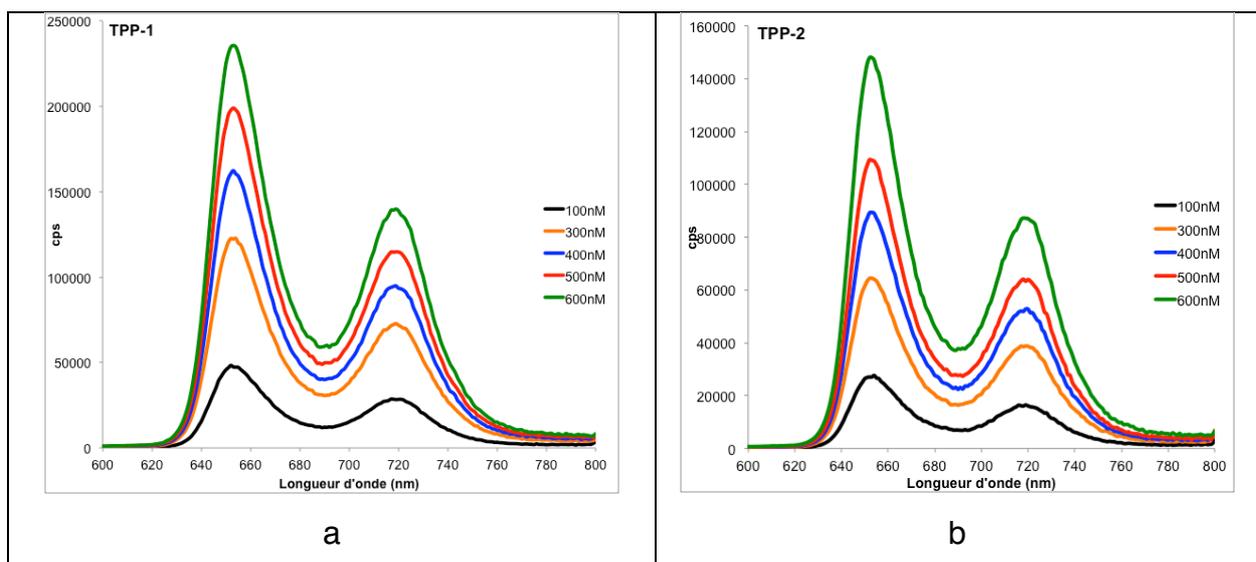
Tableau 9 : longueurs d'onde d'émission maximales des différentes porphyrines étudiées dans le DPBS à 22°C.

Les intensités de fluorescence sont également très diminuées par rapport à celles mesurées dans le méthanol à la même concentration. Dans un milieu aqueux comme le DPBS où les porphyrines sont très peu solubles, les dérivés les plus hydrophobes sont théoriquement les plus agrégés. Ceci déplace légèrement leur spectre de fluorescence comme nous l'observons effectivement dans le tableau 9, et diminue

théoriquement leur intensité de fluorescence car les porphyrines ne fluorescent que sous forme monomère. Or, ce n'est pas ce que nous avons observé : si la porphyrine non glycodendrimérique, plus hydrophobe, montre effectivement une intensité de fluorescence plus faible dans le DPBS que dans le méthanol, et plus faible que celle des porphyrines glycoconjuguées, l'ordre n'est pas celui attendu d'après les logP. C'est TPP-1 qui possède l'intensité de fluorescence la plus élevée, devant TPP-2, bien que ce soit cette dernière qui soit la plus hydrophile. TPP-(DegMan)₃ est la molécule qui présente l'intensité de fluorescence la plus faible, alors que son logP est plus faible que celui de TPP-1c. Cependant, comme elle a une structure chimique différente de celle des porphyrines dendrimériques, il est difficile de les comparer. Il faudra pourtant tenir compte de cette information pour l'interprétation des résultats de cytométrie en flux.

Nous avons montré ici que non seulement le comportement agrégé des porphyrines en milieu aqueux modifie leurs intensités de fluorescence par rapport à celles des mêmes molécules parfaitement dissoutes dans le méthanol, mais aussi que chaque porphyrine a des propriétés spectrales propres qui ne dépendent pas seulement de son hydrophilie apparente, mais aussi de leur structure moléculaire.

Nous avons ensuite étudié l'influence de la concentration des porphyrines en milieu aqueux à 22°C sur leur intensité de fluorescence (figure 40).



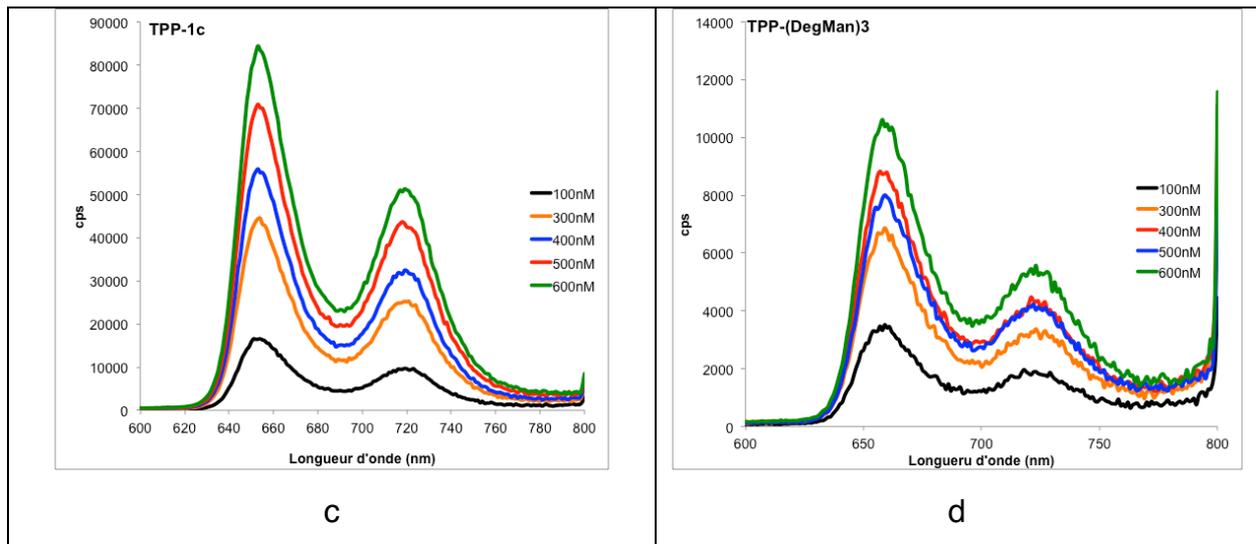
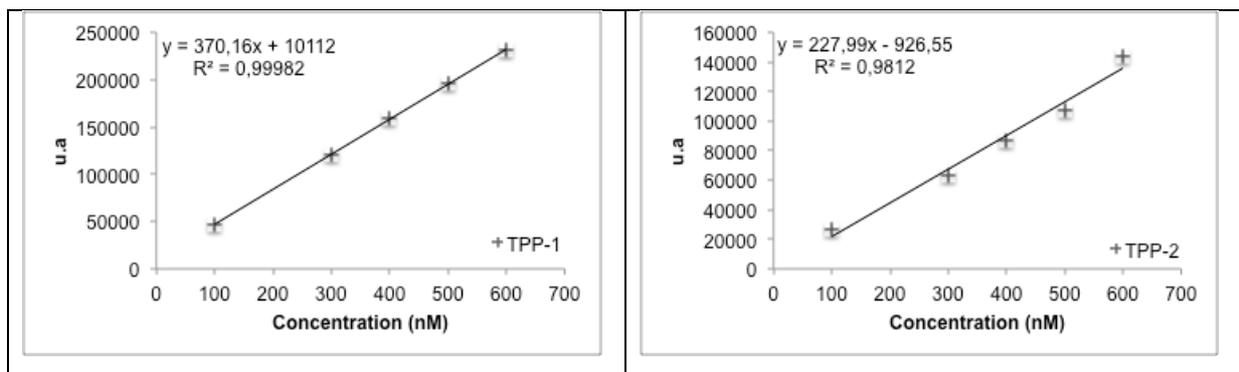


Figure 40 : spectre d'émission de (a) TPP-1 , (b) TPP-2, (c) TPP-1c et (d) TPP-(DegMan)₃ de 100 à 600 nM dans le DPBS à la température de 22°C

Dans tous les cas, nous avons observé une influence de la concentration sur le spectre d'émission des porphyrines : plus la concentration est élevée, plus l'intensité de fluorescence l'est également. Afin de déterminer si ces augmentations sont proportionnelles à la concentration en porphyrine dans le milieu, nous avons collecté les intensités de fluorescence de chaque porphyrine, à chaque concentration, à 655 nm, longueur d'onde utilisée par la suite pour les expériences de cytométrie en flux. Les résultats sont présentés dans les graphes de la figure 41 :



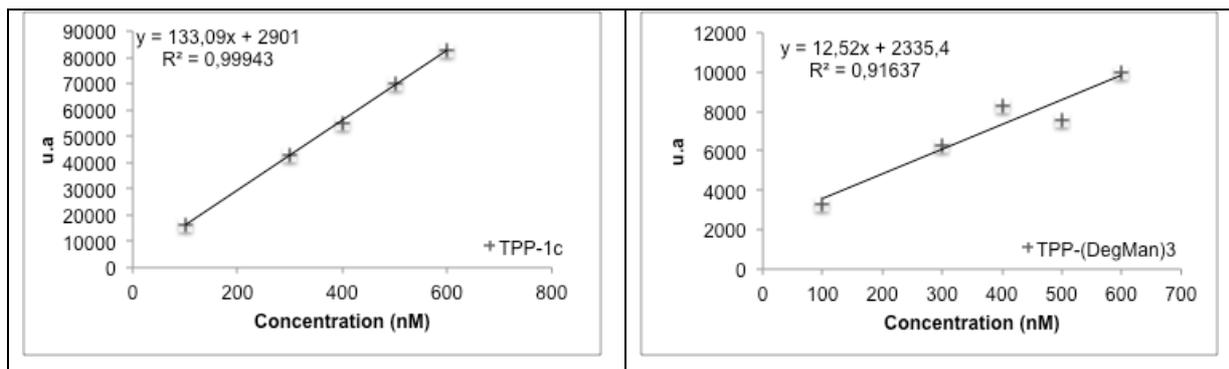


Figure 41 : intensité de fluorescence émise à 655 nm à 22°C, par les porphyrines TPP-1, TPP-2, TPP-1c, TPP-(DegMan)₃ aux concentrations de 100, 300, 400, 500 et 600nM.

Nous avons observé une très bonne linéarité entre la fluorescence émise et la concentration pour les porphyrines TPP-1 et TPP-1c. Bien que le coefficient de corrélation soit un peu moins proche de 1 pour TPP-2, la relation intensité de fluorescence-concentration reste également linéaire. En revanche, pour TPP-(DegMan)₃, le coefficient de corrélation est moins bon. Encore une fois, TPP-(DegMan)₃ se démarque des autres dérivés porphyriniques étudiés en s'agrégeant davantage qu'eux.

C.2.3. Spectres de fluorescence des dérivés porphyriniques en milieu aqueux (DPBS) à 4°C

L'allure des spectres d'émission n'est pas modifiée lorsque les porphyrines sont dans le DPBS à 4°C (figure 42) et le tableau 10 montre que les longueurs d'ondes maximales varient peu par rapport aux spectres obtenus à 22°C.

En revanche, les porphyrines ont toutes des intensités de fluorescence plus faibles à 4°C. Cette diminution n'est pas équivalente pour toutes les porphyrines étudiées, mais la tendance est la même qu'à température ambiante : TPP-1 possède les intensités de fluorescence les plus élevées, suivie de TPP-2, TPP-1c puis de TPP(DegMan)₃ avec des valeurs très faibles. A 4°C, les porphyrines seraient donc dans un état différent de celui dans lequel elles se trouvent à température ambiante. Il est possible qu'à cette température, les dérivés porphyriniques précipitent ou cristallisent, ce qui pourrait expliquer la baisse de leur intensité de fluorescence.

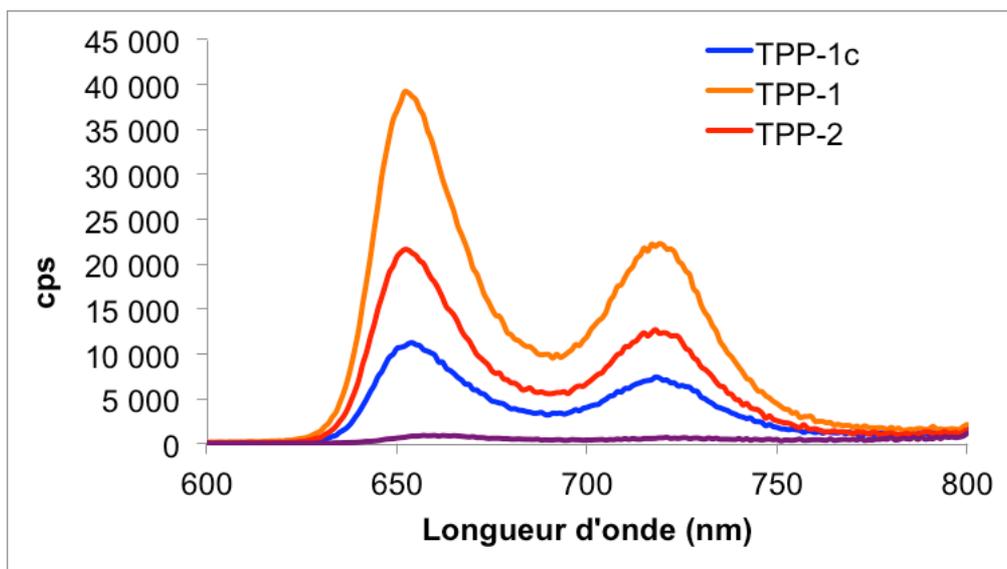


Figure 42 : spectre d'émission de TPP(DegMan)₃, TPP-1c, TPP-1 et TPP-2 dans le DPBS à la concentration de 100 nM, à la température de 4°C.

Porphyrines (100 nM) / DPBS (22°C/4°C)	$\lambda_{em 1}$ (nm)	$\lambda_{em 2}$ (nm)
TPP-1	652	717/719
TPP-2	654/653	719/718
TPP-1c	654	719/718
TPP-(DegMan) ₃	659/660	718/721

Tableau 10 : longueurs d'onde d'émission maximales des différentes porphyrines étudiées dans le DPBS à 22°C et à 4°C.

La figure 43 résume ces différentes études en analysant seulement la fluorescence collectée à 655 nm.

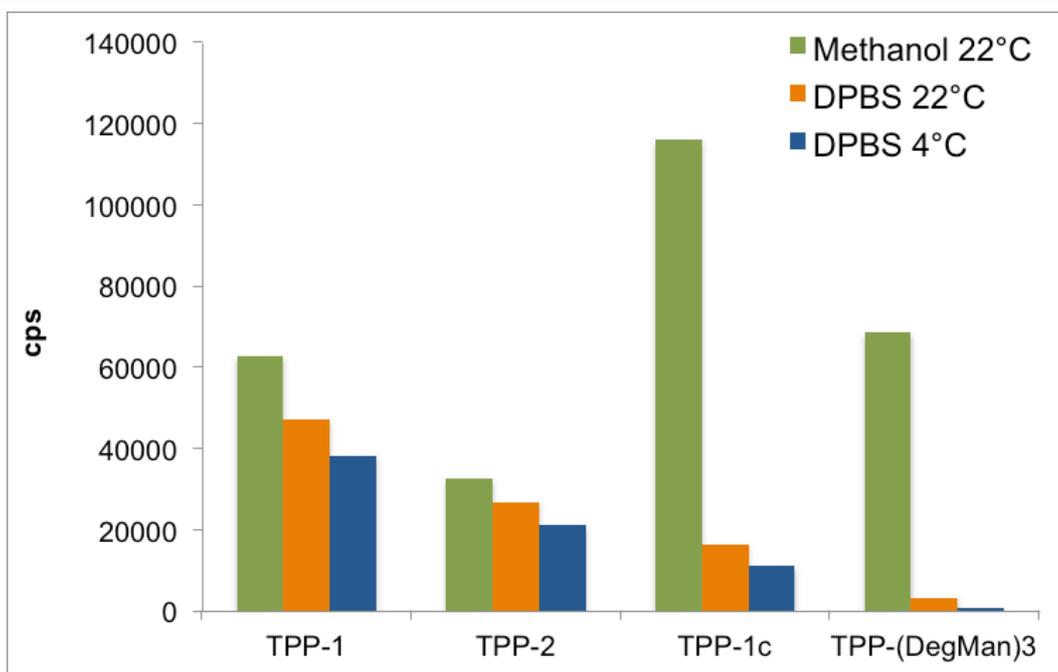


Figure 43 : comparaison des intensités de fluorescence des porphyrines à 655 nm dans le méthanol à 22°C et dans le DPBS à 22 et 4°C pour les porphyrines TPP-1, TPP-2, TPP-1c et TPP-(DegMan)₃ pour une concentration de 100 nM.

En conclusion, nous avons confirmé que :

- les dérivés porphyriniques étudiés fluorescent davantage lorsqu'ils sont sous forme monomérique.
- dans un milieu aqueux favorable à l'agrégation des porphyrines, les intensités de fluorescence sont diminuées et cette diminution n'est pas identique pour toutes les porphyrines, les porphyrines ayant selon la présence de sucres et leur configuration des solubilités différentes. En revanche, les intensités de fluorescence augmentent avec la concentration des porphyrines dans le milieu et dans le cas des porphyrines dendrimériques, cette relation est linéaire.
- La température, responsable d'un phénomène encore non élucidé sur les molécules provoque aussi des variations des intensités de fluorescence.

Chapitre 2 : Evaluation du mode de capture des dérivés porphyriniques par cytométrie en flux

A. Introduction

Afin d'étudier l'affinité des différentes porphyrines pour les cellules Y79 et de déterminer le mode de pénétration prédominant de celles-ci dans les cellules (transport médié ou diffusion passive), nous avons utilisé le cytomètre en flux dans un mode dynamique, comme cela a déjà été fait par Boulla et al. en 1999. Les cellules adhérentes HT 29 n'ont pas été étudiées ici, car il aurait fallu utiliser une technique d'étude différente, ce qui aurait introduit un biais dans nos études. L'analyse cinétique de l'interaction permet de déterminer les constantes d'association des différentes porphyrines avec les cellules Y79, en suivant l'évolution de la fluorescence en fonction du temps après avoir injecté les porphyrines dans une suspension cellulaire. A 4°C, l'endocytose et le transport actif sont bloqués. En réalisant des cinétiques à 37°C et à 4°C, il est possible de discriminer des modes de capture différents des porphyrines par les cellules.

Comme indiqué dans l'introduction de la partie III, les porphyrines ne sont détectées par le cytomètre que lorsqu'elles sont associées aux cellules. En solution, elles sont invisibles, d'autant plus qu'étant en grande partie agrégées, elles ne fluorescent pas. Les mesures sur des temps courts permettent de diminuer la quantité de sérum de veau fœtal jusqu'à seulement 2%. Ceci limite les interactions entre les porphyrines et les protéines du sérum, tout en n'affectant pas la viabilité des cellules pendant le temps de l'étude.

B. Matériel et méthodes

B.1. Culture cellulaire

Les cellules ont été cultivées comme décrit dans le chapitre II. Pour l'étude en cytométrie, elles ont été centrifugées et re-suspendues, à la concentration de 500000 cellules/mL, dans du DMEM Hi glucose sans rouge de phénol, contenant 2% de sérum de veau fœtal.

B.2. Dérivés porphyriniques libres ou incorporés dans des liposomes de DMPC

Des solutions mères des porphyrines TPP-1, TPP-2, TPP-1c et TPP-(DegMan)₃ ont été préparées dans le DMSO à la concentration de 10⁻³ M. Ces solutions ont ensuite été diluées dans le DPBS. Nous avons décidé de travailler à des concentrations des

porphyrines inférieures à leurs IC_{50} , afin de s'affranchir de leur phototoxicité et de se concentrer seulement sur leur mécanisme d'interaction avec les cellules. C'est pour cette raison que les concentrations en porphyrines mises en contact avec les cellules Y79 ont été choisies entre 100 et 600 nM. Travailler à ces faibles concentrations a également permis de limiter leur agrégation en milieu aqueux.

Les liposomes de DMPC blancs ou chargés en TPP-1c, TPP-1 ou TPP-2 ont été préparés comme indiqué dans la partie II (chapitre B.1.4), et à la même concentration.

B.3. Etude des microparticules en cytométrie en flux

Le cytomètre utilisé est un LSR Fortessa (Becton Dickinson, New Jersey, USA) couplé aux logiciels Diva et FlowJo. Les porphyrines ont été excitées à 405 nm et la fluorescence a été récupérée à $655/8 \pm 4$ nm.

Les cytomètres de haute technologies possédant les techniques les plus récentes et les plus avancées sont nécessaires pour pouvoir observer des microparticules. Afin de réduire la taille de particule détectable du micromètre à la centaine de nanomètres, il est indispensable d'installer un photomultiplicateur PMT sur le détecteur FSC.

Cette technique a permis l'étude des liposomes de DMPC d'environ 200 nm contenant dans leur membrane un nombre contrôlé de dérivés porphyriniques TPP-1c et TPP-1. Le but était de comparer la fluorescence intrinsèque entre les différentes porphyrines dans des conditions identiques à celles des mesures cellulaires, c'est à dire avec le même instrument. La fluorescence des porphyrines est facilement détectable ; en effet, comme le montre la figure 44, nous observons une différence significative entre celle des liposomes de DMPC blancs (sans porphyrine) et celle des liposomes de TPP-1c ou TPP-1. En revanche, la différence de fluorescence entre les liposomes chargés en porphyrine n'est pas significative.

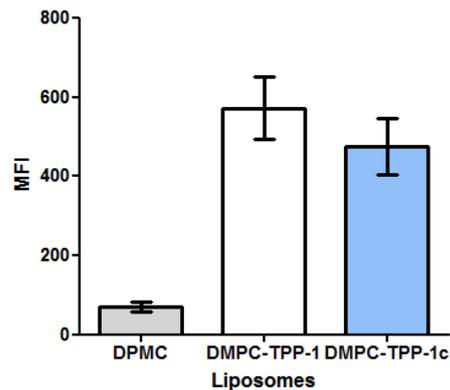


Figure 44 : histogramme montrant l'autofluorescence des liposomes de DMPC et la fluorescence des liposomes DMPC-TTP-1 et DMPC-TPP-1c. MFI = Mean Fluorescent Intensity, intensité moyenne de fluorescence.

Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat : la différence de fluorescence est peut-être réellement indétectable entre les deux porphyrines. Cependant, les expériences précédentes réalisées par spectrométrie de fluorescence ont montré qu'il existait des différences d'intensité de fluorescence entre les porphyrines. La résolution de l'appareil ne permet donc probablement pas de les différencier ici ; en effet, le nombre de porphyrines dans chaque liposome est sans doute trop faible pour que l'on observe un contraste suffisant entre les deux molécules. On sait, par exemple, qu'il faut 80 molécules de phycoérythrine (marqueur) pour que le cytomètre puisse détecter sa fluorescence. Comme nous ne pouvons conclure avec cette étude, nous avons donc dû nous référer aux études des dérivés porphyriniques par spectrométrie de fluorescence (Partie III, chapitre 1).

B.4.Principe de l'étude en cinétique par cytométrie en flux

Pour les expériences réalisées à 37°C, les cellules ont été conservées dans une étuve avec 5% de CO₂ avant le début de l'essai. Pour les expériences à 4°C, les cellules ont été placées dans de la glace. A cette température, les cellules ont une durée de vie très limitée, c'est pourquoi la durée maximale de l'expérience dans les deux cas a été fixée à 5h, la mortalité cellulaire étant trop importante au-delà.

Au moment de la mesure, les cellules ont été introduites seules dans le cytomètre. Les cellules vivantes ont été sélectionnées selon leur taille et leur granulosité (SSC-

A/FSC-A). Cela a été validé par un marquage à l'iodure de propidium (IP), agent intercalant fluorescent utilisé comme marqueur de la viabilité cellulaire ; en effet, lorsque les cellules ont perdu leur intégrité membranaire, ce qui est caractéristique de la nécrose, l'IP traverse la membrane plasmique perméabilisée, s'intercale entre les acides nucléiques et fluoresce, ce qui ne se produit pas avec des cellules saines où l'IP, hydrophile, ne traverse pas la membrane plasmique intacte. Seule la fluorescence des cellules individualisées a été observée (SSC-W/SSC-H). Les porphyrines ont ensuite été ajoutées dans la suspension cellulaire afin d'obtenir la concentration appropriée (100, 300, 400, 500 et 600 nM) dans le milieu. Après homogénéisation au vortex pendant 10 secondes, la fluorescence des tubes contenant les cellules en contact avec les porphyrines a été mesurée à différents temps. Entre les mesures, les tubes ont été conservés à l'abri de la lumière, à température ambiante. La figure 45 présente un exemple de cinétique observée en temps réel, lors de l'acquisition.

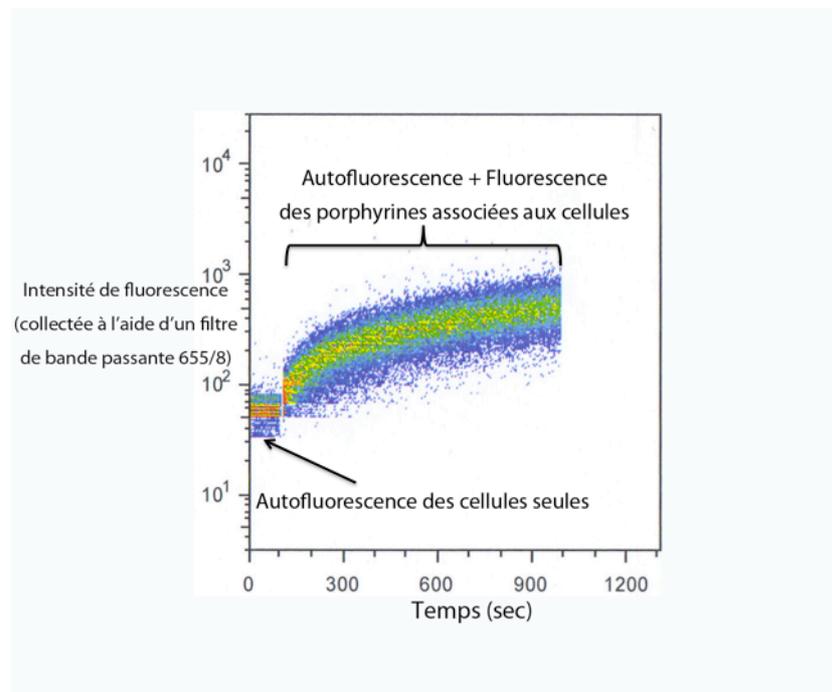


Figure 45 : exemple de mesure de cinétique. L'acquisition est réalisée par le logiciel BD FACS Diva sur la cytomètre.

C'est l'autofluorescence des cellules qui est d'abord détectée quand celles-ci sont introduites dans le cytomètre en flux. Lorsque les dérivés porphyriniques sont ajoutés

à la suspension cellulaire, on observe une augmentation croissante de la fluorescence en fonction du temps : elle représente la capture des porphyrines par les cellules. En effet, les porphyrines seules ne sont pas détectées par le cytomètre car leur taille moléculaire est en dessous de la limite de détection. En cytométrie en flux, l'interaction entre une substance fluorescente et des cellules se traduit donc expérimentalement par une augmentation de la fluorescence cellulaire.

C. Résultats

L'allure des cinétiques d'évolution des intensités de fluorescence dans des conditions différentes d'expérience permet de déterminer le ou les mécanismes de capture mis en jeu.

Nous avons réalisé des expériences à 37°C et à 4°C pour mettre en évidence la pénétration intracellulaire des porphyrines par transport médié par un récepteur (endocytose) ou un transporteur (transport actif). A 4°C, ce mode de transport est bloqué. Seul la diffusion passive ou l'interaction moléculaire entre une porphyrine et son récepteur (sans internalisation) peuvent induire une augmentation de la fluorescence à cette température. A 37°C, l'endocytose médiée ou le transport actif sont saturables et cela se traduit par l'apparition d'un plateau de fluorescence au cours du temps, plus ou moins rapidement selon l'affinité de la porphyrine pour le récepteur.

Les spectres d'émission de fluorescence des différents dérivés porphyriniques réalisés par spectrofluorimétrie ont montré que les porphyrines étudiées ne possèdent pas les mêmes intensités de fluorescence. Nous ne pouvons donc pas de faire de comparaison directe entre elles. Nous avons également observé une différence d'intensité de fluorescence entre 37 et 4°C pour une même molécule. Pour mettre en évidence une éventuelle influence de la température sur la capture des porphyrines par les cellules Y79, il était donc nécessaire que les intensités de fluorescence à 4°C soient d'une part suffisamment diminuées pour que l'écart d'intensité observé reflète bien une réelle diminution du nombre de porphyrines interagissant avec les cellules, mais aussi que les cinétiques soient différentes, avec dans un cas, un plateau (indiquant un mécanisme saturable), et dans l'autre, une

évolution plutôt linéaire de la fluorescence au cours du temps, indiquant un mécanisme passif (diffusion ou simple interaction molécule-récepteur.

C.1. TPP-1 et TPP-2

Nous avons commencé par étudier la capture des porphyrines TPP-1 et TPP-2 par les cellules Y79 à différentes concentrations et aux deux températures (figures 46 et 47).

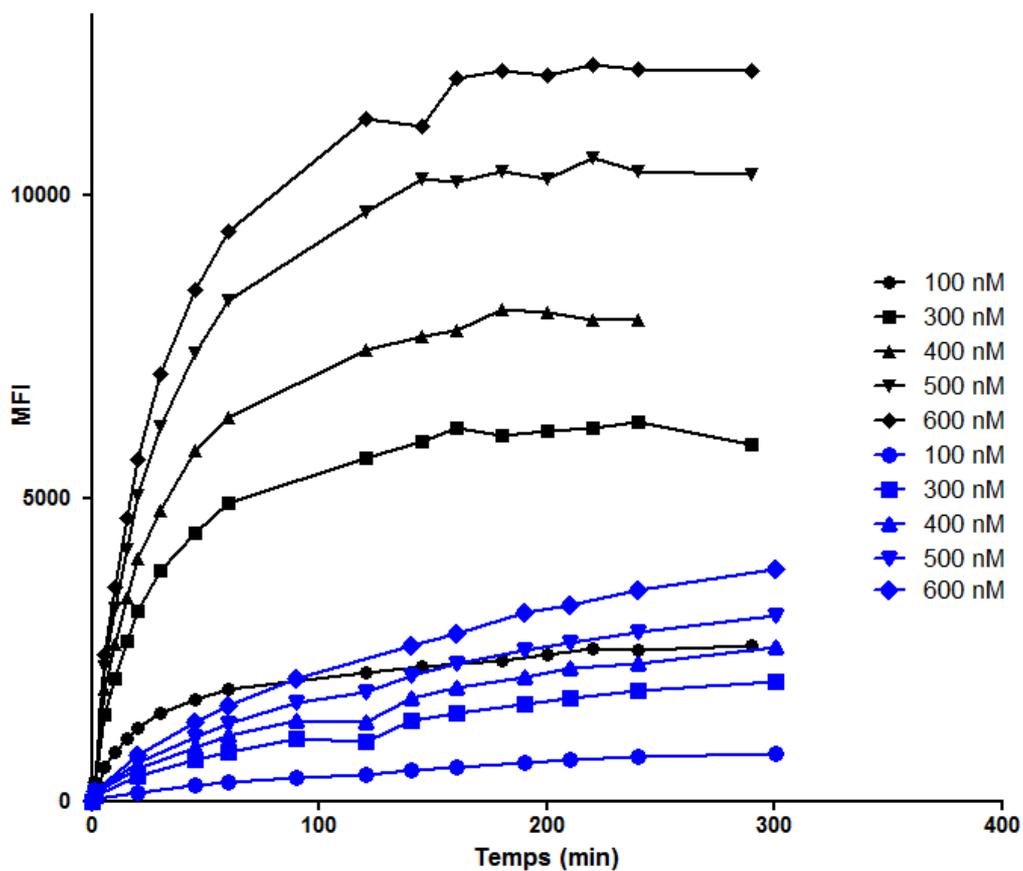


Figure 46 : cinétiques de TPP-1 à 100, 300, 400, 500 et 600 nM réalisées à 37°C (courbes noires) et 4°C (courbes bleues).

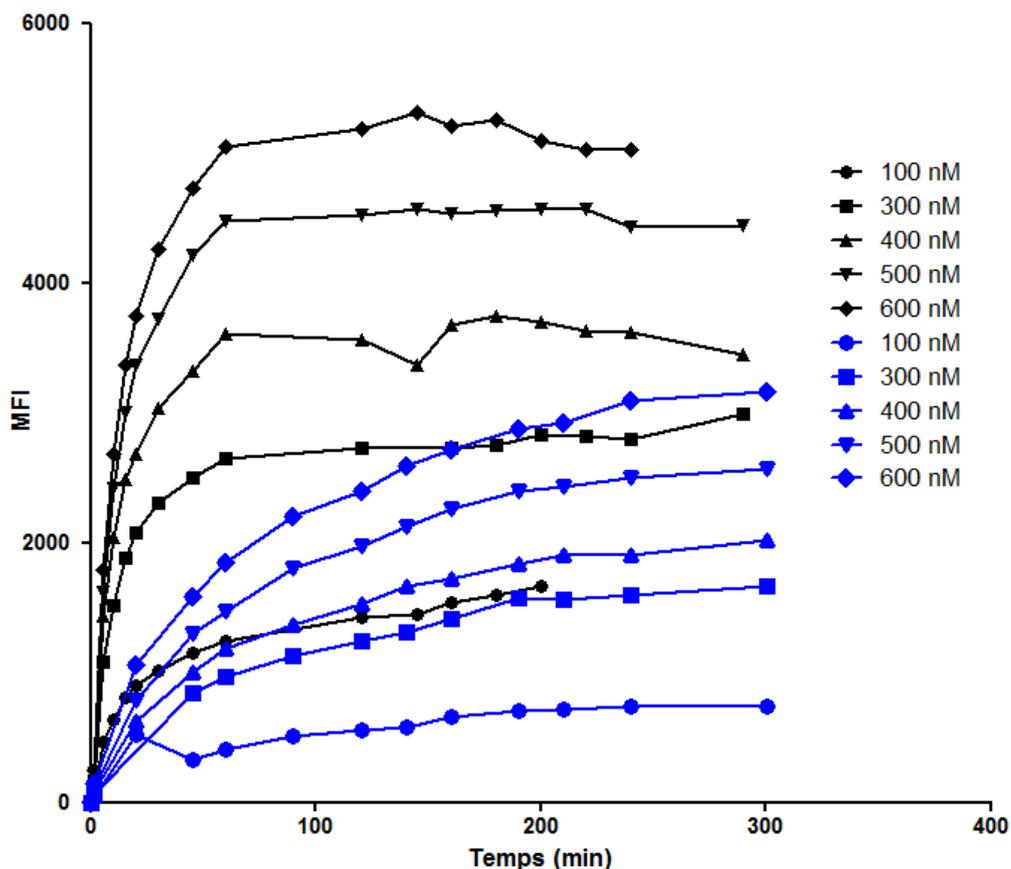


Figure 47 : cinétiques de TPP-2 à 100, 300, 400, 500 et 600 nM réalisées à 37°C (courbes noires) et 4°C (courbes bleues).

En analysant ces cinétiques, nous avons remarqué:

- une augmentation des intensités de fluorescence émises par les cellules en contact avec les porphyrines TPP-1 et TPP-2 en fonction de la concentration et ce, quelle que soit la température étudiée. TPP-1 et TPP-2 interagissent bien avec les cellules Y79.
- de plus faibles intensités de fluorescence à 4°C qu'à 37°C. Comme nous n'observons pas les mêmes allures de courbes pour les porphyrines selon que l'expérience ait été réalisée à 37°C ou à 4°C, les cinétiques à 4°C étant ralenties, nous pouvons supposer que TPP-1 et TPP-2 ont été en partie capturées par les cellules de rétinoblastome par interaction avec un récepteur.
- une stabilisation de la fluorescence à 37°C après environ 160 min (2h40) pour TPP-1 et 120 min pour TPP-2. L'apparition d'un plateau de fluorescence indique que les interactions entre les porphyrines et les récepteurs sur les cellules sont

contrôlées par un mécanisme saturable. Ce même phénomène a été observé à 4°C pour TPP-1 à la plus faible concentration (100nM) et pour TPP-2 à 100 et 300 nM. Aux concentrations plus élevées, nous avons remarqué l'apparition de pseudo-plateaux. Or, à 4°C, le transport médié est théoriquement bloqué. Ces plateaux et pseudo-plateaux pourraient s'expliquer par la fixation des molécules à leur récepteur, sans internalisation.

Les cinétiques présentant un plateau de fluorescence aux temps longs peuvent être normalisées, ce qui permet (a) de comparer les résultats obtenus pour plusieurs porphyrines différentes, en s'affranchissant des différences d'intensité entre ces molécules, (b) d'acquérir d'autres informations sur les mécanismes de capture mis en jeu. Pour cela, nous avons considéré la valeur de fluorescence maximale comme étant de 100% et nous avons calculé le pourcentage de fluorescence des autres points des cinétiques par rapport à cette valeur maximale. Par exemple : si un point, à une concentration donnée a une MFI de 20 000 et si la fluorescence maximale de cette cinétique est de 50 000, le pourcentage de fluorescence de ce point sera de $(20000/50000) \times 100$, soit 40%. Nous avons donc pu ainsi normaliser les cinétiques de TPP-1 et de TPP-2.

Contrairement à ce que nous avaient laissé penser les valeurs brutes de la figure 46, les cinétiques de capture de TPP-1 sont identiques pour toutes les concentrations étudiées à partir de 300 nM (Figure 48). A 100 nM, nous observons une cinétique plus lente, visible surtout à 37°C bien que, pendant la 1^{ère} heure de cinétique, toutes les courbes soient superposées.

La normalisation des valeurs d'intensité de fluorescence pour TPP-2 (figure 49) montre que les cinétiques à 37°C ne se superposent pas pour toutes les concentrations étudiées : les cinétiques de capture aux concentrations les plus élevées se distinguent de celles à 100 et 300 nM. A 4°C, comme pour TPP-1, les cinétiques ne sont pas influencées par la concentration en porphyrine.

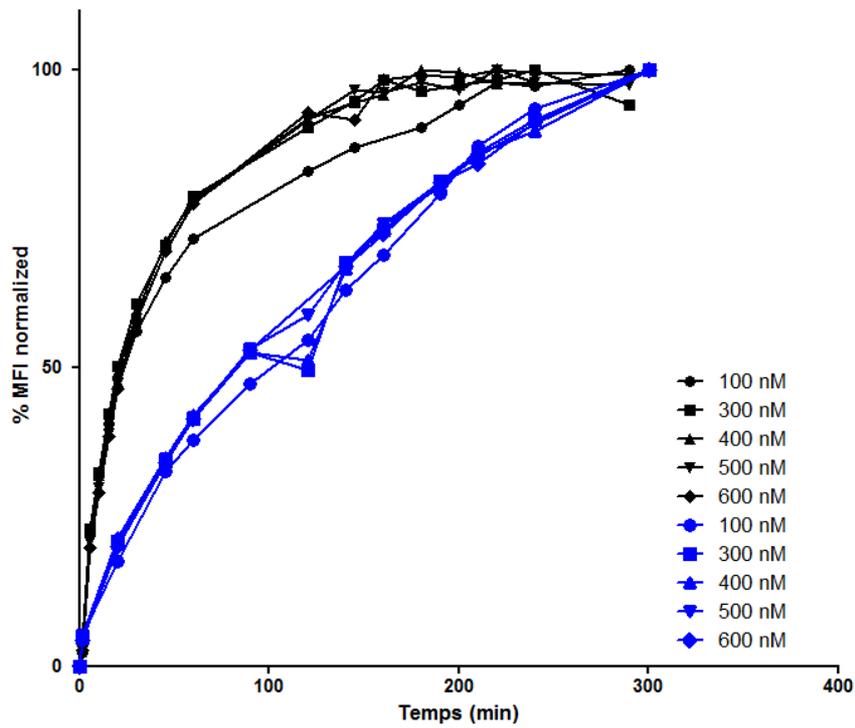


Figure 48 : cinétiques normalisées de TPP-1 à 37°C (en noir) et à 4°C (en bleu).

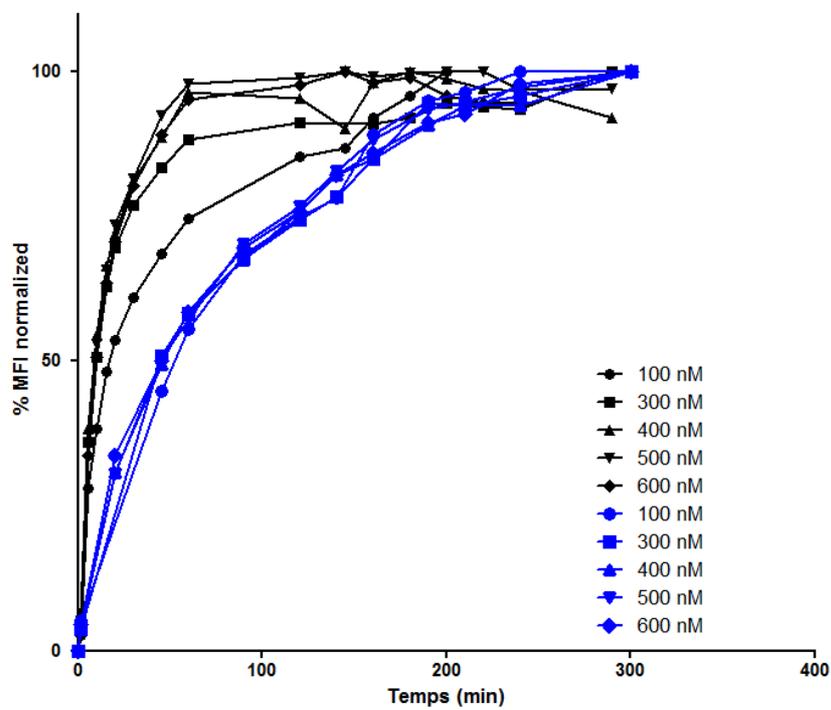
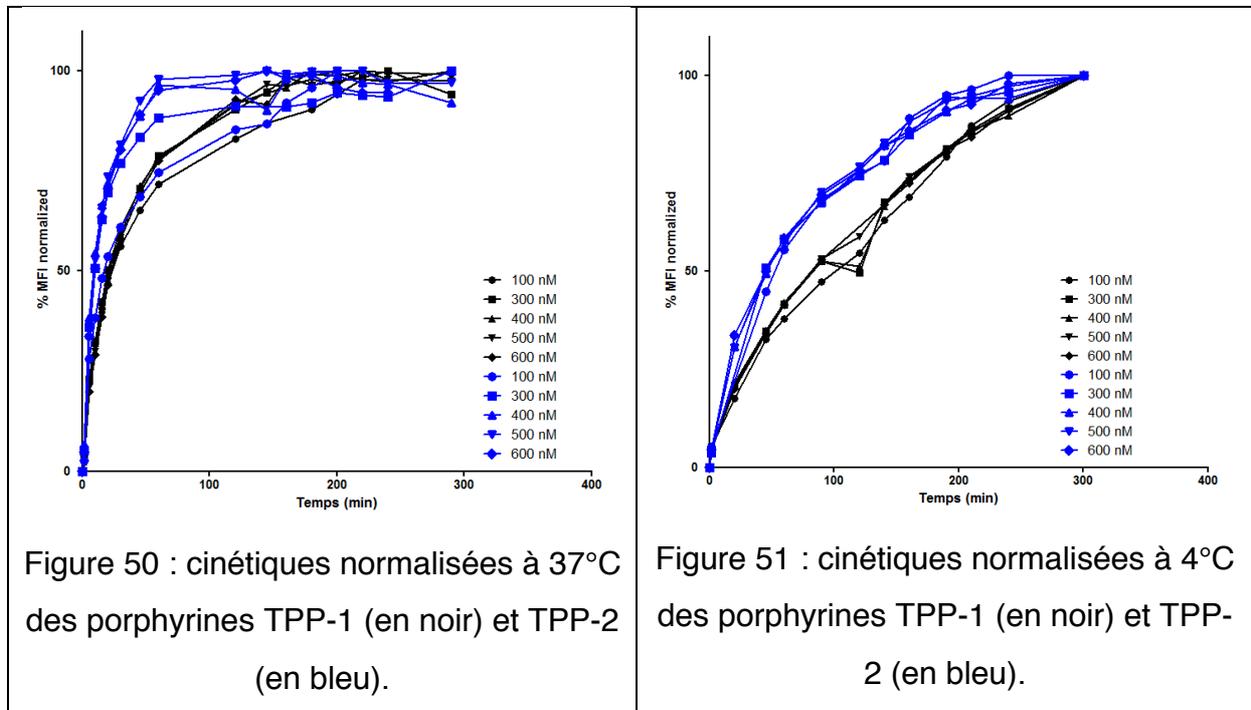


Figure 49: cinétiques normalisées de TPP-2 à 37°C (en noir) et à 4°C (en bleu).

Les cinétiques normalisées des porphyrines glycodendrimériques TPP-1 et TPP-2 aux différentes concentrations ont pu être superposées aux deux températures (figures 50 et 51).



Quelle que soit la température étudiée, la cinétique de capture est plus rapide pour TPP-2 que pour TPP-1 avec l'apparition plus précoce du plateau de saturation. Cela pourrait s'expliquer par deux hypothèses :

- 1) Une affinité moindre de TPP-1 pour le récepteur.
- 2) Une diffusion passive plus importante dans son cas.

Les intensités normalisées de fluorescence de TPP-1 à 4°C étant inférieures à celles de TPP-2, l'hypothèse (2) d'une diffusion passive plus importante est moins probable. De plus, à 4°C, la cinétique de TPP-2 présente un plateau de fluorescence, alors que TPP-1 n'en présente pas. Cela suggère donc que TPP-1 est moins affiné pour le récepteur, ce qui valide plutôt l'hypothèse (1). La seule différence entre les deux molécules réside dans la longueur de leurs espaceurs, on peut supposer que le récepteur impliqué dans ces cinétiques est bien un récepteur à mannose. La molécule TPP-2, avec son espaceur TEG serait peut-être capable de se fixer sur

plusieurs récepteurs simultanément, contrairement à TPP-1, ce qui expliquerait que ses cinétiques de capture soient plus rapides.

C.2. TPP-1c

Les cinétiques de TPP-1c à 37 et à 4°C sont présentées dans la figure 52:

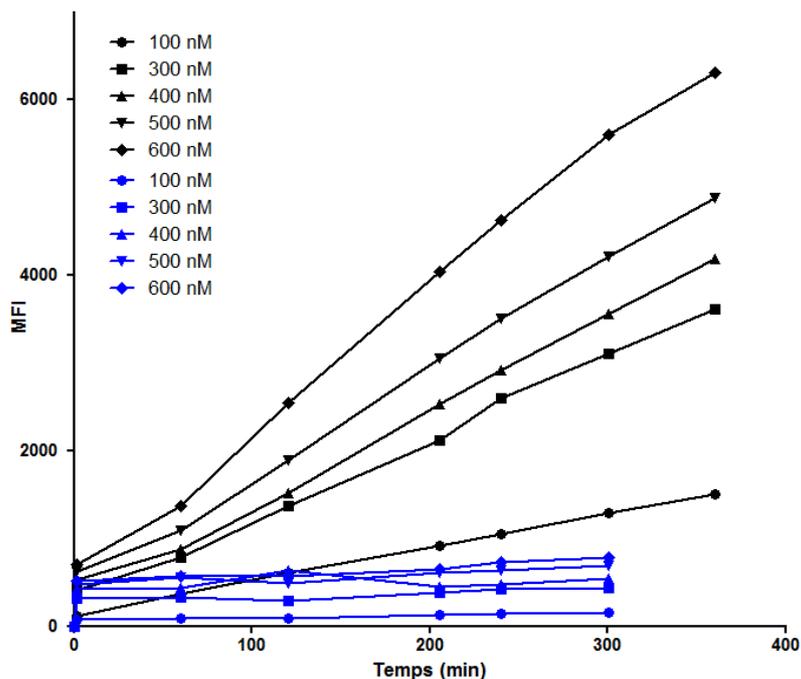


Figure 52 : cinétiques de TPP-1c à 100, 300, 400, 500 et 600 nM réalisées à 37 et 4°C

TPP-1c est l'équivalent non sucré de TPP-1. Cette différence par rapport aux porphyrines TPP-1 et TPP-2 a apparemment un effet sur l'allure de ses cinétiques de capture par les cellules. Ici, nous n'observons pas de mécanisme de saturation à 37°C, et les intensités de fluorescence à 4°C sont plus basses. La figure 52 montre :

- un effet de la concentration en porphyrine sur les intensités de fluorescence, sans le phénomène de saturation observé pour les porphyrines glycodendrimériques.
- des intensités de fluorescence très inférieures à 4°C par rapport à celles mesurées à 37°C et des cinétiques ayant des allures différentes aux deux températures.

C.3. TPP-(DegMan)₃

Les cinétiques de capture de TPP-(DegMan)₃ à 37 et à 4°C sont présentées dans la figure 53. Bien que TPP-(DegMan)₃ soit une porphyrine mannosylée comme TPP-1 et TPP-2, nous avons observé des allures de cinétiques très différentes. La figure 53 montre que :

- à 37°C, les intensités de fluorescence augmentent avec la concentration de la porphyrine dans le milieu. Après 4h d'expérience, il n'y a toujours pas de saturation.
- à 4°C, les intensités de fluorescence aux concentrations étudiées sont quasi-nulles. Les expériences de fluorescence par spectrofluorimétrie ont montré qu'à cette température, cette porphyrine avait une intensité de fluorescence très diminuée. Ceci pourrait expliquer pourquoi les valeurs sont aussi basses.

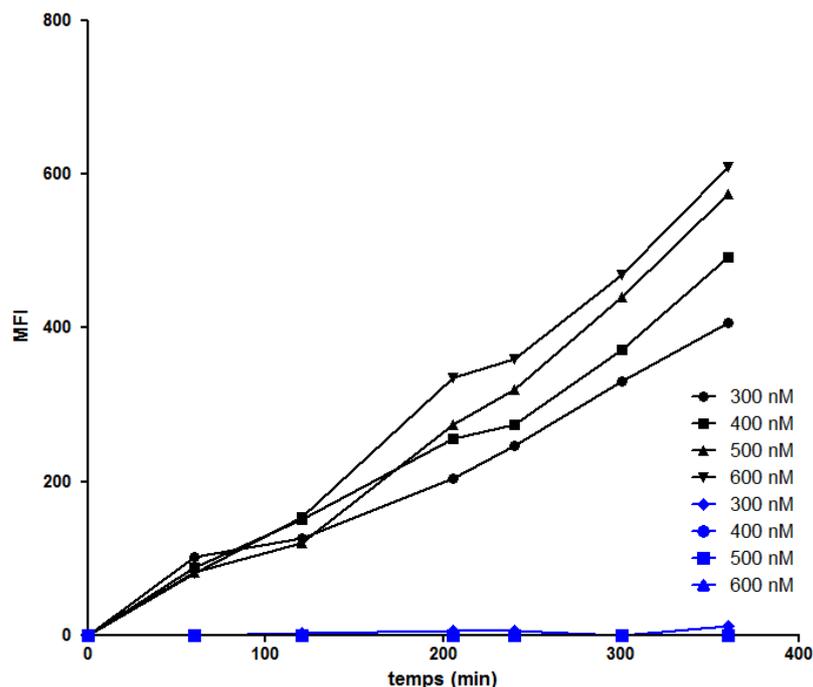


Figure 53 : cinétiques de TPP(DegMan)₃ à 300, 400, 500 et 600 nM réalisées à 37 et 4°C.

Ces expériences ne nous ont donc pas permis de mettre en évidence le transport de TPP(DegMan)₃ via un récepteur.

Références :

Ballut, S. Thèse « Synthèse et études photophysiques et photobiologiques de photosensibilisateurs porphyriques glycodendrimères : application en thérapie photodynamique (PDT) », Université Paris-Sud (2010).

Boulla, G., Randriamampita, C., Raposo, G., and Trautmann, A., Binding kinetics of soluble ligands to transmembrane proteins: comparing an optical biosensor and dynamic flow cytometry. *Cytometry* 40, 76–80 (2000).

Duhem, N., thèse « New derivatives of vitamin E as nanovectors for poorly soluble drugs and anticancer agents », Université Catholique de Louvain, Bruxelles, (2013).

Kessel, D. Effects of photoactivated porphyrins at the cell surface of leukemia L1210 cells. *Biochemistry* 16, 3443–3449 (1977).

Makky, A., Michel, J-P., Ballut, S., Kasselouri, A., Maillard, Ph., Rosilio, V., Effect of cholesterol and sugar on the penetration of glycodendrimeric phenylporphyrins into biomimetic models of retinoblastoma cells membranes. *Langmuir* 26, 11145–11156 (2010).

Wang, ZJ., Chauvin, B., Maillard, Ph., Hammerer, F., Carez, D., Croisy, A., Sandré, C., Chollet-Martin, S., Prognon, P., Paul, JL., Blais, J., Kasselouri, A., Glycodendrimeric phenylporphyrins as new candidates for retinoblastoma PDT: blood carriers and photodynamic activity in cells. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 115, 16–24 (2012).

Troisième partie : Analyse lipidomique

A. Introduction

Nous avons à présent montré que le modèle membranaire précédemment établi par Ali Makky nous permettait bien de discriminer les porphyrines étudiées selon leurs interactions spécifiques (modèle lipidique fonctionnalisé par la Concanavaleine A). Si les études de culture cellulaires classiques se sont révélées inadéquates pour conclure sur la validité de notre modèle, l'immobilisation de cellules de rétinoblastome Y79 sur un capteur de quartz de QCM-D a montré des résultats similaires à ceux obtenus avec le modèle, après injection des différentes porphyrines étudiées. La cytométrie en flux a fourni des informations complémentaires concernant l'interaction spécifique et non spécifique des porphyrines avec les cellules. Nous avons mis en évidence un transport médié par plusieurs protéines, prédominant, qui masque dans la plupart des cas le transport passif. Le transport par diffusion existe sans doute pourtant, comme l'a démontré l'étude en monocouche de Makky et al. (2010a). Réalisée sur un modèle à 4 composants, SOPC, SOPE, SOPS et cholestérol en différentes proportions, cette étude a montré que quelle que soit la composition lipidique, une porphyrine donnée pénétrait de la même façon. Toutefois, selon sa structure chimique, sa pénétration pouvait varier de manière significative, les porphyrines glycodendrimériques semblant interagir davantage avec les lipides que la porphyrine non-glycoconjuguée. Le modèle lipidique utilisé par Ali Makky dans sa thèse était dérivé des travaux de Huster et al. (1998) et de Yorek et al. (1985). Plus complexe que les modèles utilisés jusqu'à présent pour des études comparables, il était basé sur l'association de phospholipides portant des groupements polaires différents, dans une composition conforme à celle décrite dans la littérature pour les membranes rétiniennes (Fliesler et Anderson 1983, Yorek et al. 1985, Huster et al. 1998, 2000). Ces groupements polaires représentaient le point d'interaction initial des porphyrines avec la membrane. Pour les chaînes hydrophobes, le choix s'était porté sur des phospholipides hybrides de longueurs de chaînes identiques (18 carbones), mais comptant une chaîne saturée et une chaîne insaturée pour respecter une certaine fluidité de la membrane. La concentration de cholestérol variait par rapport à celle de SOPC et SOPE (entre 10 et 30 mol%, c'est à dire de 5 à 18 % m/m). La concentration de SOPS avait été fixée à 10 mol% quelle que soit la composition, pour maintenir le taux de charge. Les travaux réalisés avec

les monocouches, les liposomes et bicouches supportées ont été réalisés en utilisant une composition de SOPC/SOPE/SOPS/CHOL (M3 : 3:3:1:3 en mol, soit 36 :34 :12 :18 % m/m) ou (M1 : 4:4:1:1 en mol, soit 43 :41 :11 :5 % m/m) (Makky et al. 2010a, 2010b, 2011).

Afin de conclure sur la validité de ce modèle et d'approfondir notre connaissance du rétinoblastome, nous avons réalisé la caractérisation et la quantification des phospholipides et des stérols présents dans les extraits de lipides totaux des cellules de rétinoblastome immortalisées Y79 et de deux xénogreffes, Rb102 et RB200, fournies par Carole Thomas, à l'Institut Curie. Pour les cellules Y79, un fractionnement a pu être réalisé, qui a permis de préciser la composition lipidique des différentes membranes de la cellule.

B. Matériel et méthodes

L'analyse lipidomique s'est divisée en plusieurs étapes : nous avons tout d'abord extrait les lipides totaux des cellules Y79 et des xénogreffes Rb 102 et Rb 200. L'analyse de ces échantillons a été réalisée par chromatographie liquide couplée à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière et la validation effectuée par spectrométrie de masse couplée (ou non) à la chromatographie liquide. Pour identifier et quantifier les lipides présents, une gamme d'étalonnage de phospholipides et de cholestérol standards a été établie. Ces standards ont ensuite été injectés à différentes concentrations avant l'injection des échantillons de lipides extraits des cellules.

B.1.Extraction des lipides des membranes de cellules de rétinoblastome Y79 et de xénogreffes Rb 102 et Rb 200

B.1.1. Choix de la méthode

Notre objectif étant au départ d'extraire tous les lipides des membranes cellulaires, nous nous sommes orienté vers le protocole d'extraction des lipides totaux décrit par Folch (Folch et al. 1957). D'autres méthodes dérivées de ce protocole de référence ont été publiées, notamment celle de Bligh et Dyer en 1959, originellement dédiée à l'extraction de lipides issus des muscles de poissons (Bligh and Dyer, 1959).

La méthode de Folch fait intervenir le mélange solvant chloroforme/méthanol en proportion 2:1, tandis que celle de Bligh et Dyer utilise des proportions inverses. Le mélange de Bligh et Dyer contenant une proportion plus forte en méthanol est plus polaire et favorise donc l'extraction des phospholipides. Comme notre objectif était d'extraire non seulement les phospholipides mais aussi les autres familles de lipides dont les stérols (plus solubles dans de fortes proportions de chloroforme), nous avons opté pour un protocole dérivé de celui de Folch. L'étude des lipides membranaires des cellules Y79 après extraction par le solvant de Folch précédemment réalisée par Yorek et al. (1985) a conforté notre choix.

B.1.2. Protocole adapté à notre étude

Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (4,5 g/L de glucose) contenant 20% de SVF et des antibiotiques (streptomycine, 50 IU/mL et pénicilline 5 IU/mL). Elles sont placées dans une étuve à 37°C contenant 5% de CO₂.

Pour l'extraction, 50 mL d'une suspension cellulaire à 500 000 cellules/mL sont prélevés et centrifugés à 1000g pendant 5 minutes. Le culot de cellules est ensuite lavé par du DPBS. Ce culot est repris dans 1mL de tampon HEPES (10 mM d'HEPES, 150 mM de NaCl, pH 6,5) ainsi que dans 3,75 mL de solvant de Folch, permettant la solubilisation et le passage en phase organique de lipides tels que les gangliosides. Après agitation au vortex pendant 5 minutes, le mélange est laissé au repos pendant 2 heures. A ce stade, les cellules sont en grande majorité lysées par addition du mélange de Folch (solvant de Folch et tampon HEPES) et les lipides solubilisés dans la phase organique du mélange. Mais pour obtenir une lyse totale de toutes les cellules, nous avons ajouté deux opérations complémentaires:

- une série de trois chocs thermiques au cours desquels le mélange est plongé successivement dans de l'azote liquide (-170°C) puis dans un bain-marie à 37°C°.

- une série de cinq sonications de 30 secondes dans un bain à ultra-sons et dans la glace afin d'éviter l'échauffement des échantillons.

Après 5 minutes de centrifugation à 3000g, la phase organique (phase inférieure) est isolée et après évaporation sous flux d'azote, on obtient un résidu sec de lipides. Une

lyophilisation de ce résidu est alors réalisée afin d'éliminer les solvants résiduels. Les lipides sont ensuite conservés au congélateur à -20°C.

B.1.3. Adaptation de la méthode à l'extraction des lipides à partir de xénogreffes

Madame Carole Thomas de l'Institut Curie d'Orsay nous a fournis deux xénogreffes (Rb 102 et Rb 200) prélevées sur deux enfants atteints de rétinoblastome.

Les tumeurs sont découpées en petits morceaux. Ces morceaux sont placés dans un homogénéisateur de Potter afin d'être broyés. Ensuite, le protocole utilisé est identique à celui décrit précédemment pour les cellules Y79.

B.2. Séparation des membranes cellulaires par centrifugation différentielle

La centrifugation différentielle a pour objectif initial d'isoler tous les organites et le cytoplasme cellulaire en provenance d'un culot de cellules en se basant sur la densité des composants à isoler. Le protocole décrit ci-après est inspiré de celui détaillé dans le livre « Biologie Moléculaire de la cellule » de Lodish et al. (2005, 3^{ème} édition, éditions De Boeck), et nous a été également communiqué par le Dr. Brenner-Jan (Unité de recherche INSERM UMR-S 769, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry). Les cellules Y79 (500 000 cellules/mL), sont tout d'abord centrifugées et lavées à deux reprises par du DPBS. Après aspiration du tampon, le culot de cellules est conservé dans de la glace. 5 mL de solution de lyse [saccharose 250 mM, Tris pH 7,6 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 0,15 mM et PMSF (phenylmethane sulfonylfluoride antiprotéase) 0,4 mM, ajouté extemporanément] sont ajoutés au culot de cellules, et après homogénéisation, la suspension est laissée 30 minutes dans la glace. On introduit ensuite les 5 mL de suspension cellulaire dans un homogénéisateur de Dounce et on réalise 100 allers-retours avec le piston en faisant des pauses tous les 20 coups. Le piston n'est à aucun moment remonté jusqu'en haut, l'objectif étant de sentir un effet ventouse afin de permettre la libération des organites intracellulaires.

Afin de récupérer la fraction contenant le noyau, la suspension est centrifugée pendant 5 minutes à 850g à 4°C. Le surnageant (S1) est isolé et le culot est homogénéisé dans du tampon de lyse dans le même volume que précédemment (5

mL) puis centrifugé de nouveau dans les mêmes conditions. Le culot contenant les noyaux est conservé à -20°C .

Pour isoler la fraction contenant les mitochondries, le surnageant de la première centrifugation (S1) est centrifugé à $10\,000g$ pendant 15 minutes. Le culot contenant alors les grosses mitochondries est isolé et le surnageant (S2) est centrifugé pendant 15 minutes à $20\,000g$ à 4°C . Le culot résultant de cette centrifugation et contenant les petites mitochondries est isolé à son tour. Les deux culots de mitochondries sont homogénéisés dans 2 mL de tampon de lyse et lavés à deux reprises pendant 15 minutes à $20\,000g$ à 4°C . Le culot contenant les mitochondries est conservé à -20°C . Enfin, pour isoler la fraction du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique, le surnageant (S2) est centrifugé pendant 1h à $100\,000g$ à 4°C . Le surnageant est aspiré délicatement et le culot (quasiment invisible) contenant les membranes est conservé à -20°C . La figure 53 résume les différentes étapes du protocole :

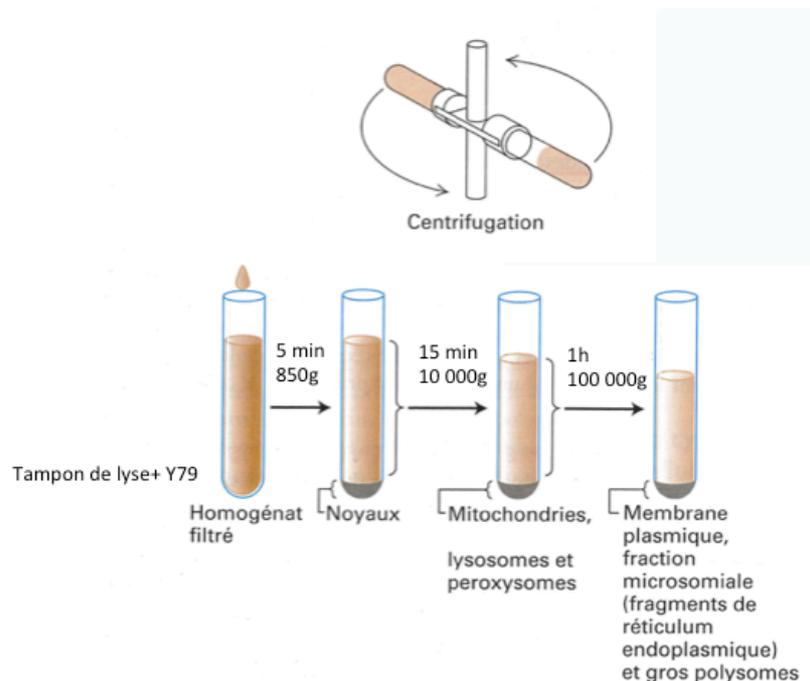


Figure 53 : résumé des différentes étapes de la centrifugation différentielle (adapté de Lodish et al. 2005)

B.3. Analyse des échantillons en LC-DEDL (Chromatographie Liquide couplée à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière)

B.3.1. Conditions opératoires

L'équipe du Pr. P. Chaminade (EA 4041, Châtenay-Malabry) a mis au point une méthode d'analyse des phospholipides par chromatographie liquide couplée à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (LC-DEDL) que j'ai pu utiliser pour caractériser mes échantillons. Le cholestérol peut également être caractérisé par cette méthode, mais le pic correspondant peut être pollué par la présence d'autres lipides élués aux mêmes temps de rétention. Pour s'affranchir de ce problème, nous avons dans un premier temps utilisé la chromatographie gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) pour caractériser et quantifier les stérols. Cette méthode sera détaillée ultérieurement.

La séparation chromatographique en LC est réalisée en phase normale par deux colonnes successives identiques afin d'améliorer la résolution de la séparation (colonnes YMC en vinyle avec greffage PVA, résistantes aux pH acides d'une longueur de 150 mm, un diamètre interne de 2.1 mm, une porosité de 12 nm et une granulométrie de 5 μ m). Afin d'améliorer la reproductibilité des expériences, nous avons travaillé à température constante, les deux colonnes étant placées dans un four à 35°C. La pompe HP 1050 (Hewlett-Packard) est réglée à un débit de 0,4 ml/min et le volume injecté est de 10 μ l. La pompe est utilisée selon le gradient suivant (fixé après optimisation) décrit dans le tableau 11 :

TEMPS	PHASES MOBILES (%)		
	A	B	C
0	98	2	0
4	12	88	0
25	0	60	40
36	0	60	40
37	98	2	0
51	98	2	0

Tableau 11 : Gradient utilisé pour les expériences d'étude des phospholipide et du cholestérol. Les phases mobiles utilisées sont les mélanges suivants :

A : Heptane/ Isopropanol (98/2)

B : Chloroforme (stabilisé à l'éthanol)/ Isopropanol (65/35) + 1% acide acétique

C : Méthanol/H₂O (95/5) + 0.08% triéthylamine

Au niveau du détecteur DEDL (Eurosep), la tension appliquée est de 600 V, la température de nébulisation est de 35°C et la température d'évaporation de 45°C.

B.3.2. Réalisation des expériences

Afin d'identifier les différentes classes de phospholipides et le cholestérol dans l'échantillon et les quantifier, un mélange de standards de phospholipides (cardiolipine CL, phosphatidylinositol PI, phosphatidyléthanolamine PE, phosphatidylsérine PS, phosphatidylcholine PC, sphingomyéline SM, lysophosphatidylcholine LPC) et de cholestérol (CHOL) est préparé à différentes concentrations dans du solvant de Folch : 20, 125, 250, 375, 500 et enfin 600 ppm seulement pour CL et CHOL. Deux injections successives d'un blanc (mélange solvant), une injection de chaque point de gamme et trois de chacun des échantillons de lipides extraits des cellules Y79 et des xénogreffes sont réalisées.

Les aires de pics des chromatogrammes de chaque point de gamme sont d'abord mesurées à l'aide du logiciel XCalibur. Les équations des courbes d'étalonnage sont ainsi déterminées. Puis, l'aire du pic de chaque phospholipide et du cholestérol dans les échantillons est mesurée, la moyenne de ces aires est calculée et la concentration de chaque phospholipide et du cholestérol est déduite des droites d'étalonnage.

B.3.3. Identification des lipides et reproductibilité des échantillons en LC-DEDL

Les temps de rétention des phospholipides présents dans les extraits de lipides totaux des membranes de cellules Y79 correspondent tous aux temps de rétention des standards de phospholipides injectés juste avant. Il en est de même pour le cholestérol (figure 54).

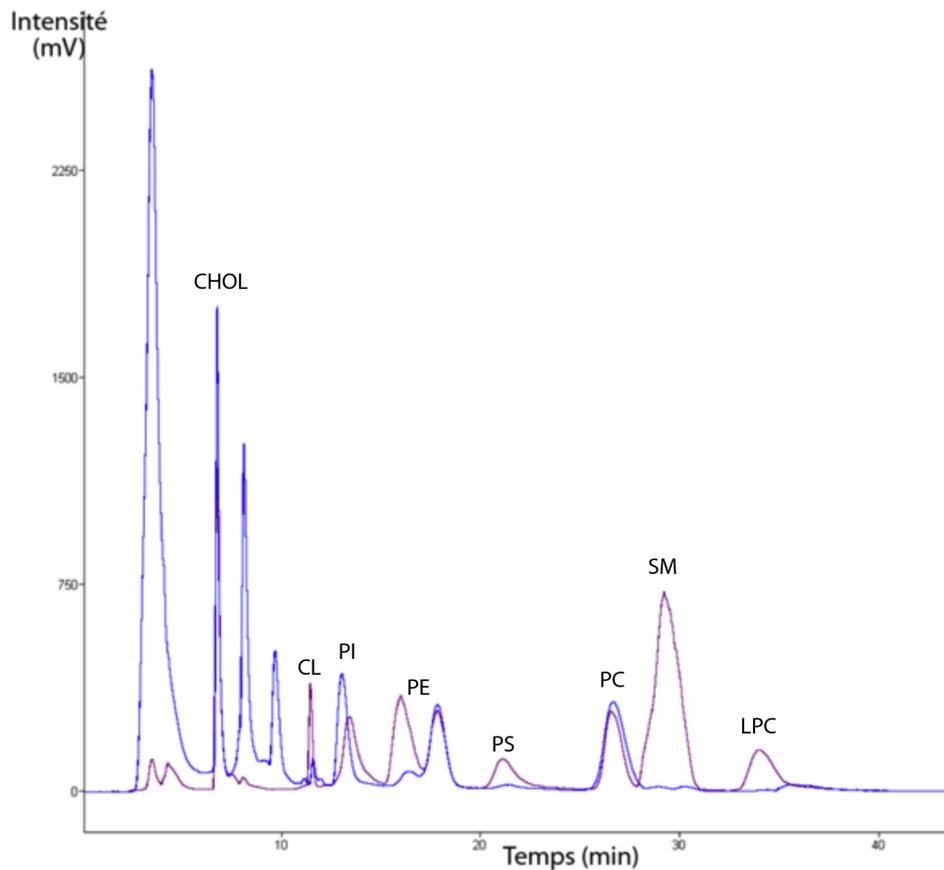


Figure 54: chromatogramme LC-DEDL des extraits lipidiques de membrane cellulaire de Y79 (en bleu) et des standards de phospholipides-cholestérol (en violet).

La figure 55 compare deux extractions distinctes issues de deux culots de lipides membranaires de cellules Y79. Bien qu'il existe des différences significatives entre les proportions de différents phospholipides (PC, PE, PS, PI), nous observons une tendance similaire dans la composition en phospholipides et en cholestérol des deux échantillons, provenant de deux décongélations de cellules différentes. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les cellules des deux échantillons n'avaient pas subi le même nombre de passages, les cellules de juillet étant les plus « âgées ». Par la suite, nous avons analysé des échantillons de lipides extraits de trois échantillons cellulaires distincts, mais possédant le même nombre de passages (entre P8 et P10).

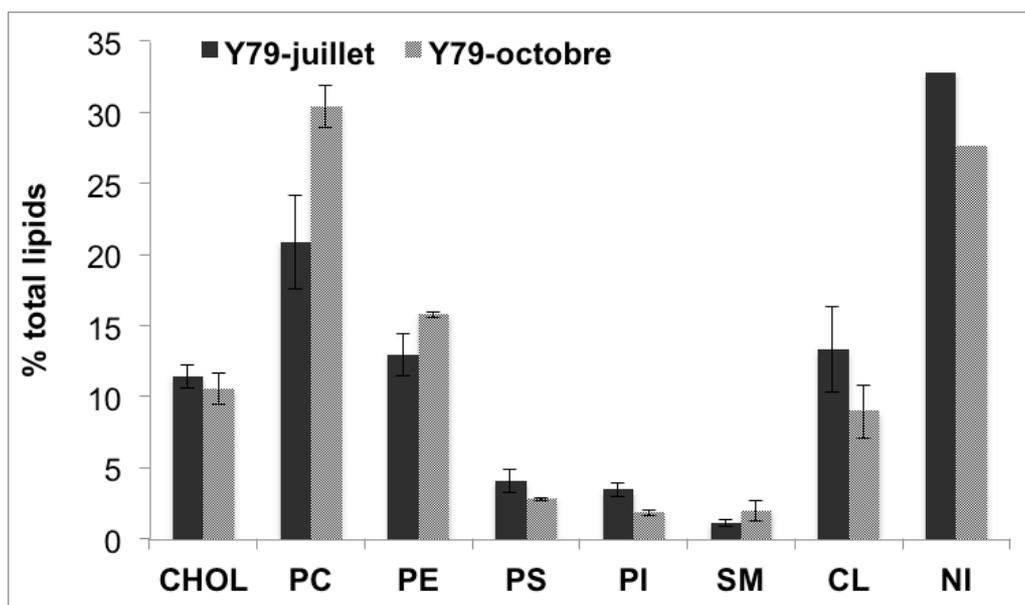


Figure 55 : Pourcentage de lipides totaux présents dans les échantillons de lipides membranaires de cellules Y79. Comparaison de deux extractions distinctes (NI : lipides non identifiés).

B.4. Analyse des échantillons en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) et en infusion de masse

Cette technique a permis d'analyser les phospholipides et les céramides membranaires.

B.4.1. Etude des phospholipides

La colonne utilisée pour cette étude est la même que celle utilisée dans les expériences décrites précédemment (A.2.1). Le spectromètre de masse utilisé est un SCIEX API 3000, la source utilisée est une source electrospray ESI. En LC/MS, le débit utilisé est de 0,3 mL/min pour la séparation. En sortie de colonne, de l'éthanol est ajouté à un débit de 0,075 mL/min afin d'améliorer l'ionisation freinée par le chloroforme utilisé pour la séparation.

B.4.2. Etude des céramides

L'analyse chromatographique des céramides a été réalisée avec une colonne Interchrom Strategy 3Si, d'une longueur de 15,1 cm et de diamètre 2,1 mm. Le débit de la pompe HP 1050 (Hewlett-Packard) est réglé à 0,3 mL/min et 1 μ L d'échantillon

est injecté. La pompe est utilisée selon le gradient suivant, présenté dans le tableau 12 :

Temps (min)	0	9	15	20	25
A (CHCl ₃)	100	75	10	100	100
B (MeOH)	0	25	90	0	0

Tableau 12 : Gradient utilisé pour l'étude des céramides

Le DEDL (Eurosep) est utilisé à la tension de 600V, la température de nébulisation est de 35°C et la température d'évaporation est de 45°C. la pression dans le détecteur est réglée à 1,5 bar.

Le spectromètre de masse utilisé est décrit dans le paragraphe précédent. Le débit utilisé est de 0,3 mL/min pour la séparation. En sortie de colonne, de l'éthanol est ajouté à un débit de 0,075 mL/min.

B.5. Analyse des échantillons en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

B.5.1. Conditions opératoires

Les expériences de GC-MS ont été réalisées sur l'ITQ 900 de ThermoFischer Scientific équipée d'un injecteur automatique. Le spectromètre de masse est une trappe ionique, l'analyse se fait par impact électronique par une énergie cinétique E_c de 70 eV. Les échantillons sont tout d'abord passés en mode full scan, où tous les rapports m/z sont balayés, ce qui permet la détermination des temps de rétention du CHOL et du cholestérol deutéré (CHOL-d₆) mais aussi la détection de tous les stérols éventuellement en présence dans l'échantillon. Par la suite, les échantillons sont passés en full scan avec une partie en mode single ion monitoring, en mode SIM aux temps de rétention du CHOL et de son étalon afin d'obtenir une quantification plus précise de ces deux espèces. Pour le mode SIM, qui consiste à ne détecter que certains ions spécifiques de ces espèces, nous avons choisi les ions moléculaires et des fragments spécifiques du CHOL et du CHOL-d₆. Pour le CHOL, les ions choisis sont 386 (ion moléculaire), 368 et 352. Pour le CHOL-d₆, les ions choisis sont 392 (ion moléculaire), 359 et 219. La température d'injection est de 300°C, la ligne de

transfert est à 300°C. De la 3^{ème} à la 6^{ème} minute, la température passe de 90 à 240°C à la vitesse de 15°C/min. A partir de la 6^{ème} minute, la température est amenée à 390°C à la vitesse de 5°C/min. 10 µL d'échantillon sont injectés en mode split à 1/10^{ème}.

B.5.2. Réalisation des expériences

Comme nous l'avons décrit précédemment, pour quantifier une espèce présente, il faut réaliser une gamme étalon. Pour la quantification du cholestérol en GC-MS, nous avons introduit un étalon interne spécifique, le cholestérol deutéré (CHOL-d₆). Le CHOL et le CHOL-d₆ ne sont pas co-élués. Le standard interne est toujours ajouté à la même concentration dans les échantillons, soit 250 ppm (environ 2 fois moins que la concentration supposée de CHOL). La gamme d'étalonnage est présentée en annexe et est composée de 8 points de 5 à 500 ppm en CHOL. Chaque point de gamme contient trois essais. La droite d'étalonnage est ensuite tracée selon l'équation $y = aX + b$ où y est le rapport entre l'aire du pic de CHOL et l'aire du pic de CHOL d₆. X représente la concentration en cholestérol.

Les aires de pics des chromatogrammes de chaque point de gamme sont mesurées à l'aide du logiciel XCalibur. L'équation de la droite d'étalonnage est ainsi déterminée.

Afin de ne pas polluer la colonne avec des espèces non éluées, une étape de traitement supplémentaire a été appliquée aux lipides totaux extraits des membranes de cellules Y 79 et de xénogreffes. Les échantillons ont été saponifiés. La saponification est une réaction chimique transformant un ester en un ion carboxylate et un alcool. Il s'agit en fait de l'hydrolyse en milieu basique d'un ester, comme décrit dans la figure 56.

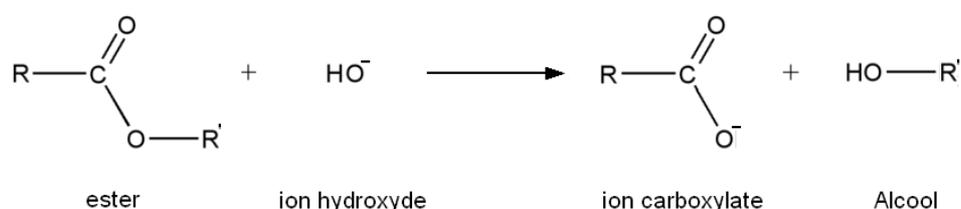


Figure 56 : saponification (image Wikipedia)

Pour réaliser cette saponification, nous ajoutons trois fois le volume du culot d'une solution de potasse à 30% dans le méthanol. Le mélange est ensuite laissé sous agitation pendant au moins 2 heures à 37°C. La saponification permet d'éliminer les phospholipides membranaires et les chaînes latérales des stérols estérifiés qui vont alors passer en phase aqueuse. L'extraction des stérols se fait par 4 mL d'heptane. Le solvant est ensuite évaporé, cette étape étant réalisée trois fois afin de récupérer la quantité maximale de stérols présents dans l'échantillon (92% dans ce cas). Le résidu sec est ensuite dissous à nouveau dans du chloroforme. Tous les échantillons sont injectés trois fois : un blanc (dichlorométhane), les points de gammes et les échantillons.

B.6. Etude du comportement interfacial des différents lipides membranaires extraits à l'interface air-liquide

B.6.1. Balance de Langmuir

La balance de Langmuir est un appareil utilisant la technique de la lame de Wilhelmy pour déterminer la pression de surface à différents états de compression de molécules insolubles, déposées à l'interface air/liquide. La cuve de la balance à film KSV NIMA que nous avons utilisée a une aire de 775 cm². La compression des molécules est réalisée au moyen de deux barrières affleurant la surface de l'eau et se déplaçant latéralement l'une vers l'autre, à une vitesse contrôlée (10 mm/min, correspondant à une vitesse de compression globale de 29 cm²/min). Afin d'éviter toute contamination de la surface, la balance est enfermée dans une enceinte en plexiglas. Avant toute expérience, la cuve et les barrières sont nettoyées avec du chloroforme et rincées par de l'eau ultrapure. Le film monomoléculaire est formé à la surface du tampon HEPES (10 mM d'HEPES, 150 mM de NaCl, pH 6,5) par dépôt d'une solution de chloroforme/méthanol (9 :1) contenant les lipides membranaires des cellules Y79 et des deux xénogreffes, à l'aide d'une micropipette (Microman Gilson, Wisconsin, Etats-Unis). Un délai d'attente de 20 minutes est nécessaire à l'évaporation totale des solvants organiques. La mise en mouvement des barrières entraîne la diminution de la surface disponible et donc la compression du film. Lors de cette compression, les variations de la pression de surface sont enregistrées en

fonction de l'aire moléculaire. Cette aire est connue d'après la quantité de molécules déposées à la surface. Dans notre cas, nous ne connaissons pas la composition exacte en lipides de nos mélanges, seulement la masse du mélange. L'aire est donc exprimée en m^2 par mg de l'extrait étudié. Pendant la compression, les molécules doivent adapter leur organisation et leur orientation à l'interface jusqu'à atteindre un état où elles forment un réseau bidimensionnel dense. A la fin de la compression, lorsque la pression superficielle atteint une valeur critique caractéristique du film, le collapse du film se traduit par l'effondrement du réseau bidimensionnel des molécules condensées.

Toutes les expériences ont été réalisées à 25 ± 1 °C et les isothermes présentées dans les résultats correspondent à une isotherme moyenne obtenue à partir d'au moins trois mesures. Les principales caractéristiques des isothermes de compression sont décrites dans la figure 57.

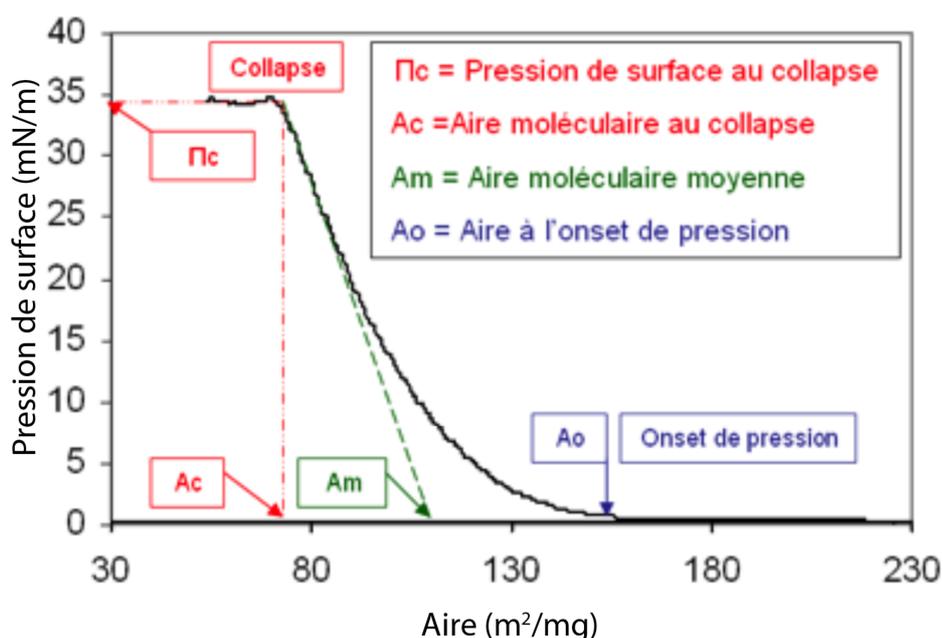


Figure 57 : schéma d'une isotherme de compression π -A.

A partir des isothermes π -A, le module de compressibilité latérale K des monocouches a été calculé à partir de l'équation : $K = -A(d\pi/dA)$. Les valeurs de ce module de compressibilité nous informent sur l'état d'organisation des monocouches. Selon Davies and Rideal (Davis et Rideal, 1963), des valeurs de K inférieures à 12,5

mN/m, comprises entre 13 et 100 mN/m, entre 100 et 250 mN/m, ou supérieures à 250 mN/m représentent respectivement la monocouche à l'état gazeux, liquide expansé, liquide condensé ou solide.

B.6.2. Microscopie à angle de Brewster (Brewster Angle Microscopy, BAM)

La microscopie à l'angle de Brewster est une technique d'étude des films monomoléculaires à la surface de l'eau dont le principe de base repose sur les propriétés de réflectivité des interfaces. Elle est sensible à l'épaisseur, la densité et l'anisotropie optique des films (Hénon, 1993). L'interface eau-air recouverte d'une monocouche d'un mélange lipidique est éclairée par un pinceau de lumière polarisée dans le plan d'incidence, tandis qu'un objectif récupère la lumière réfléchie et diffractée par cette surface en formant l'image sur laquelle nous observons les domaines de coexistence de phase.

C. Résultats

C.1. Identification et quantification des lipides présents dans les membranes cellulaires de Y79 et de xénogreffes Rb 102 et Rb 200

Le chromatogramme de la figure 58 représente les différents lipides extraits des membranes cellulaires de Y79 issus de trois culots distincts. Les temps de rétention sont similaires et l'allure du chromatogramme est la même pour les trois essais. Les échantillons sont donc reproductibles, les différences d'aires des différents pics se justifiant par le fait que les concentrations en lipides ne sont pas identiques dans les trois échantillons. La quantification se faisant par rapport à la masse de lipides totaux présents dans chaque échantillon, nous comparons par la suite des pourcentages de lipides par rapport aux lipides totaux (% m/m).

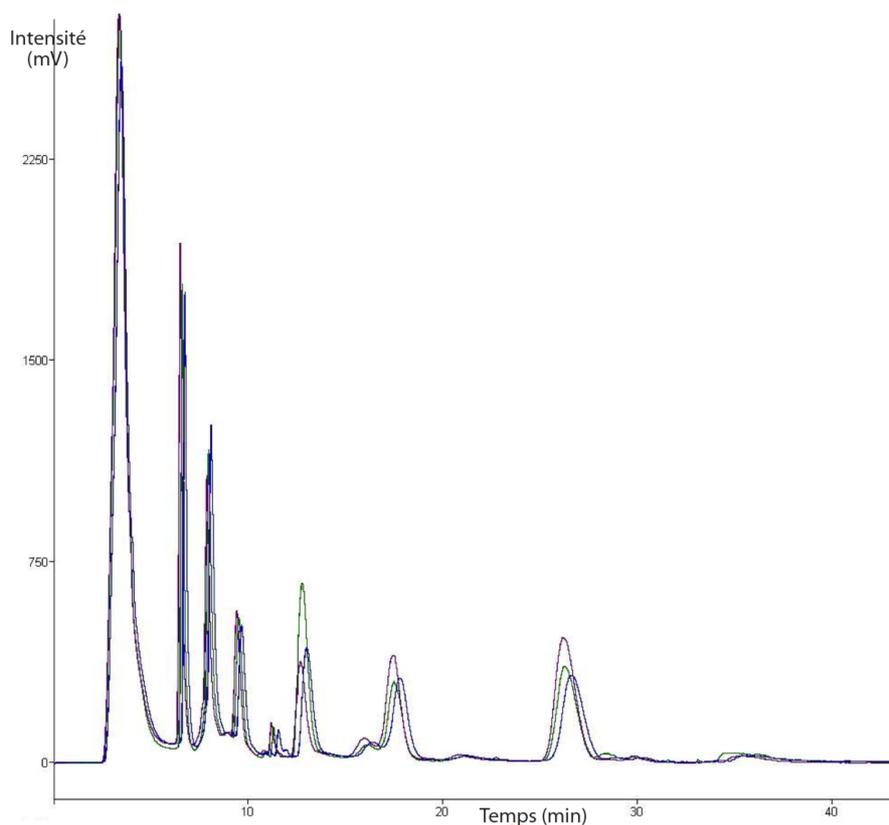


Figure 58: chromatogramme de 3 échantillons de lipides extraits des cellules Y79.

Les taux de phospholipides et de cholestérol des trois échantillons issus des cellules Y79 ont été moyennés et sont présentés dans le tableau 13, en fonction du taux de lipides identifiés et de celui des lipides totaux.

	CHOL	PC	PE	PS	PI	SM	CL	NI	Lipides identifiés
%m/m des lipides identifiés	14,6	42,0	21,8	3,9	2,6	2,7	12,4		-
Ecart-type	1,5	2,6	0,6	0,2	0,3	0,9	2,3		
%m/m des lipides totaux	10,6	30,4	15,8	2,8	1,9	1,9	9,0	27,6	72,4
Ecart-type	1,1	1,5	0,2	0,1	0,2	0,7	1,8		

Tableau 13 : Pourcentages de chaque lipide identifié par rapport à la masse des lipides identifiés et totaux, extraits des cellules Y79 (NI : lipides non identifiés).

La LPC étant connue pour être un produit de dégradation de la PC lors de l'extraction, nous avons ajouté la quantité de LPC à la quantité de PC.

Pour les xénogreffes, nous avons procédé de la même manière en analysant trois échantillons de chaque lignée de xénogreffes (Rb 102 et Rb 200). Les quantités comparées des différents lipides des cellules Y79 et de ces deux xénogreffes sont présentées dans la figure 59 et les tableaux 14 et 15.

	CHOL	PC	PE	PS	PI	SM	CL	NI	Lipides identifiés
%m/m des lipides identifiés	23,1	45,5	14,3	3,7	2,2	2,7	8,5	-	-
Ecart-type	10,3	4,1	3,2	1,4	1,5	0,4	5,5	-	-
%m/m des lipides totaux	10,6	22,9	7,3	1,9	1,2	1,4	4,7	50,3	49,7
Ecart-type	1,6	2,1	2,9	1,0	0,9	0,5	3,5		

Tableau 14 : Pourcentages de chaque lipide identifié par rapport à la masse des lipides identifiés et totaux, extraits de la xénogreffe Rb 102 (NI : lipides non identifiés).

	CHOL	PC	PE	PS	PI	SM	CL	NI	Lipides identifiés
%m/m des lipides identifiés	17,2	42,8	17,1	5,4	2,8	2,8	12,1	-	-
Ecart-type	0,8	3,8	1,0	1,0	0,0	0,6	4,0	-	-
%m/m des lipides totaux	9,2	22,9	9,2	2,9	1,5	1,5	6,7	46,2	53,8
Ecart-type	0,7	2,1	1,0	0,4	0,2	0,4	2,6		

Tableau 15 : Pourcentages de chaque lipide identifié par rapport à la masse des lipides identifiés et totaux, extraits de la xénogreffe Rb 200 (NI : lipides non identifiés).

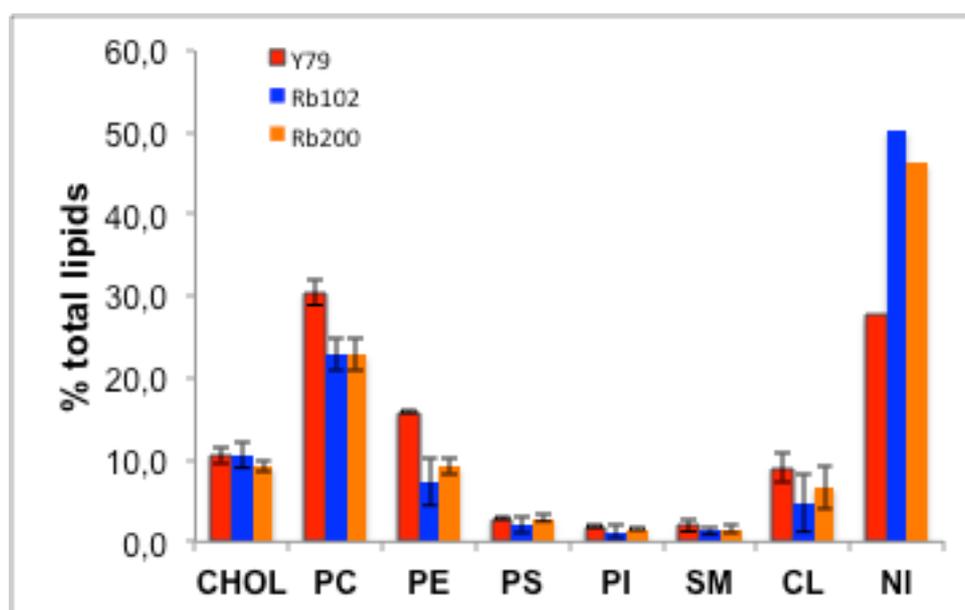


Figure 59 : Pourcentages en masse des différents phospholipides et du cholestérol identifiés en LC-MS dans les extraits lipidiques totaux de membranes des cellules Y79 et des xénogreffes Rb 200/Rb 102 (NI : lipides non identifiés)

Le cholestérol est présent dans les membranes cellulaires de cellules Y79 et des xénogreffes Rb 102 et Rb 200 en même quantité. Afin de s'assurer de la présence seulement de cholestérol sous le pic identifié comme tel, nous avons également identifié et quantifié le cholestérol par GC-MS. Les résultats sont présentés dans la figure 60.

En considérant les écarts-types de ces expériences, nous observons que les quantités de cholestérol pour les lipides membranaires des cellules Y79 et de xénogreffes Rb 200 sont bien identiques en LC-DEDL et en GC-MS. Nous en avons donc déduit que le pic correspondant au cholestérol en LC-MS ne contient que du cholestérol. Les expériences réalisées en GC-MS nous ont également permis de statuer sur l'absence d'autres stérols dans les membranes cellulaires ; en effet, que ce soit pour les membranes lipidiques des cellules Y79 ou des xénogreffes, aucun autre stérol n'a été détecté.

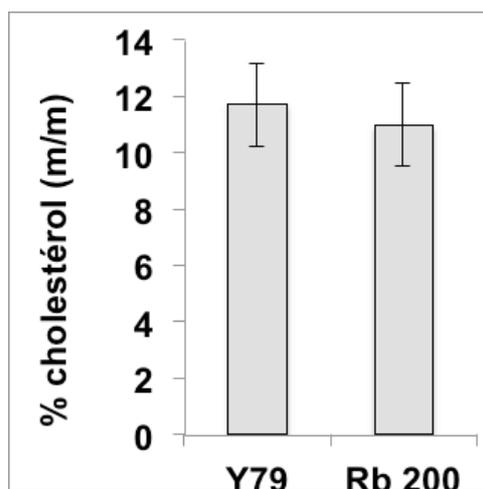


Figure 60 : Quantité de cholestérol (% m/m) présents dans les extraits lipidiques totaux de membranes des cellules Y79 et de la xénogreffe Rb 200 après identification et quantification par GC-MS.

En ce qui concerne les phospholipides, nous observons le même profil pour les 3 différentes lignées. Mais il y a deux fois plus de lipides non encore identifiés dans les xénogreffes que dans les cellules Y79.

En comparant ces résultats au modèle SOPC/SOPE/SOPS/CHOL (36/34/12/18) ou (43/41/11/5), nous remarquons :

- qu'il y a deux fois plus de têtes PC que de PE dans les extraits lipidiques cellulaires.
- que la quantité totale de PL chargés est bien de 10%, mais qu'en plus de la PS il y a une quantité non négligeable de têtes PI parmi les PL chargés.
- que la concentration de CHOL est voisine de 12 % (m/m) ce qui rend le modèle SOPC/SOPE/SOPS/CHOL (36/34/12/18) plus conforme à la réalité. C'est celui qui a été utilisé pour les expériences d'interaction entre les porphyrines et le modèle en monocouche (Makky et al. 2010a).

C.2. Validation de l'identification des lipides par LC-MS et infusion de masse.

Hypothèses sur la longueur des chaînes d'acides gras portés par les phospholipides

Cette analyse n'a été réalisée que pour les cellules Y79.

C.2.1. LC-MS mode négatif

Les phospholipides ont été étudiés en LC-MS, par ESI (electrospray ionisation) en mode négatif et en mode positif (on arrache ou on ajoute un proton). Dans notre cas, il s'avère après essai que nos molécules perdent leurs protons plus facilement. Nous avons donc réalisé les études de masse en mode négatif.

Les standards de phospholipides ont été injectés en LC-MS pour que la comparaison avec les échantillons de lipides de cellules Y79 soit réalisable. Les masses des fragments de chaque espèce de standards sont comparées aux masses des fragments issus des échantillons de lipides de cellules Y79. Nous retrouvons ainsi les têtes polaires des phospholipides, les différences de masse entre fragments standards et échantillons étant liées à l'appareil (précision de la masse +/- 3) (Figures 61-64).

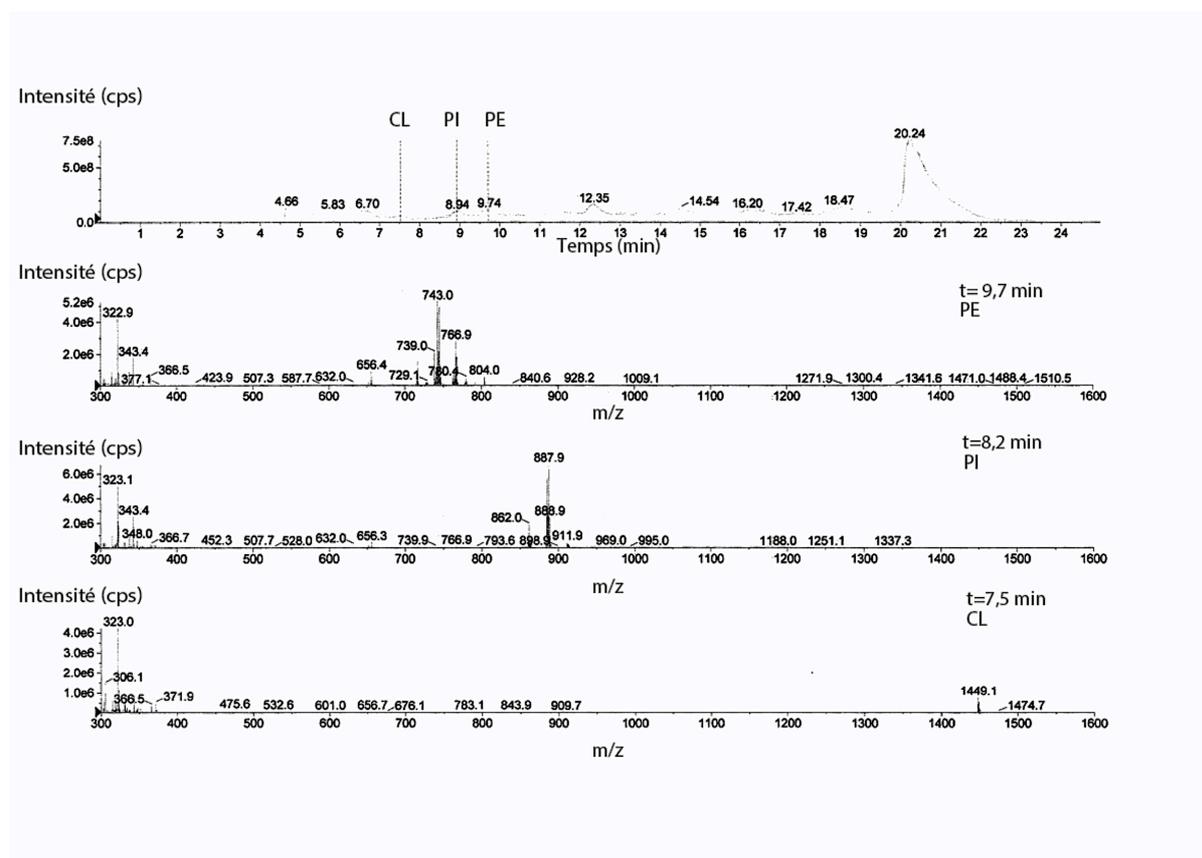


Figure 61 : LC (graphe supérieur)-MS (graphes inférieurs) des standards de phospholipides PE, PI et CL.

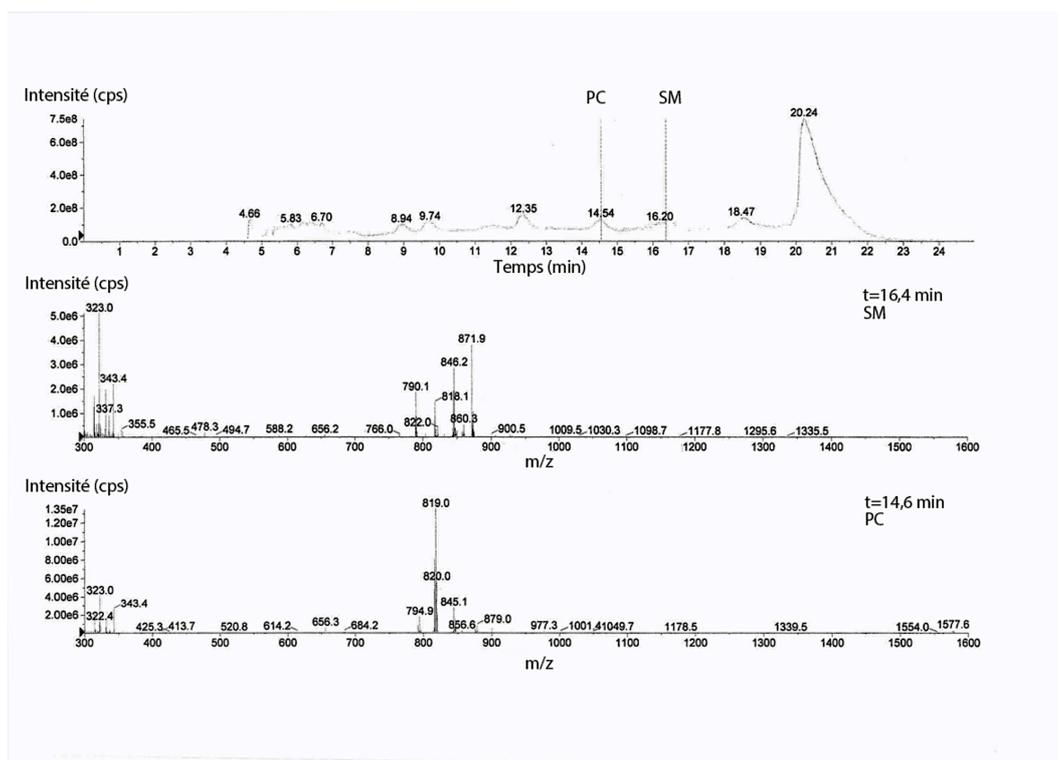


Figure 62 : LC (graphe supérieur)-MS (graphes inférieurs) des standards de phospholipides SM et PC.

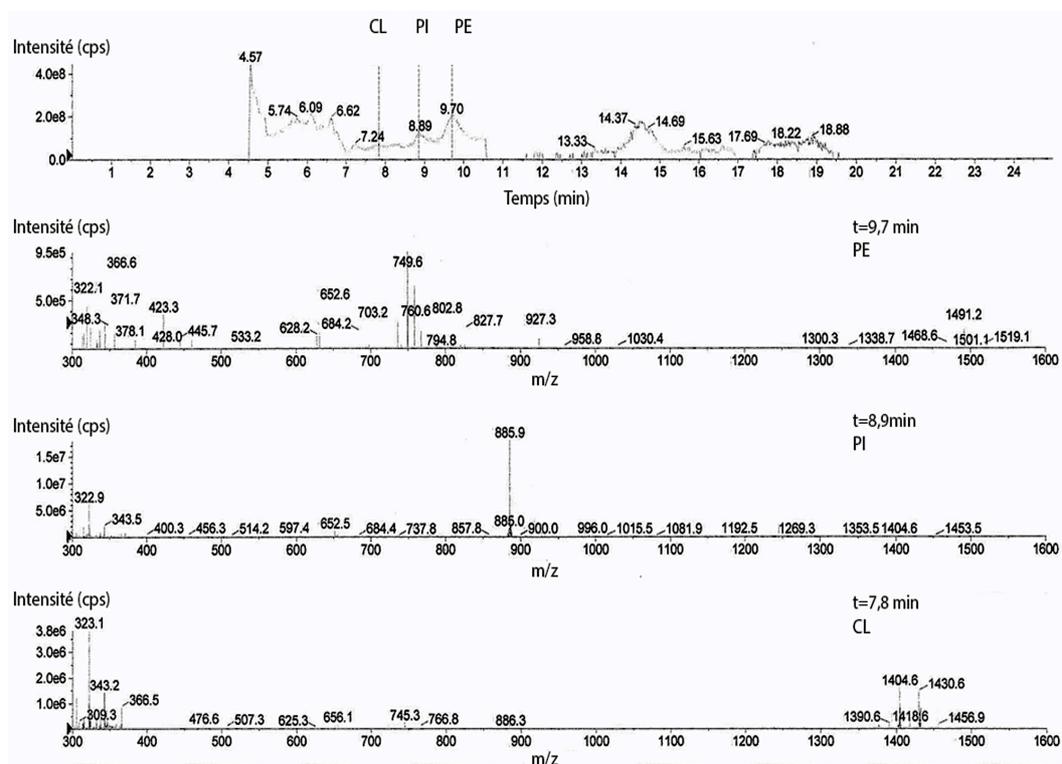


Figure 63 : LC (graphe supérieur)-MS (graphes inférieurs) des lipides extraits des membranes de cellules Y79 (identification de PE, PI et CL).

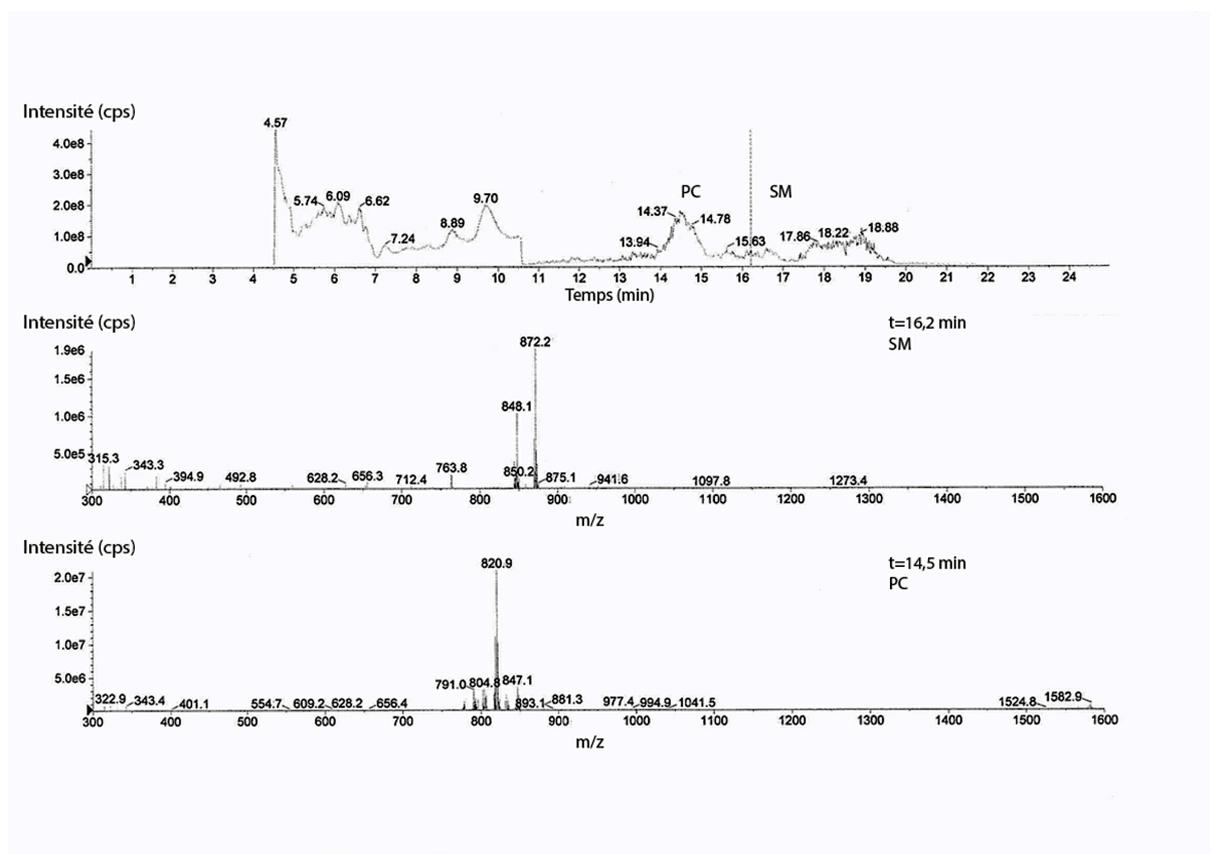


Figure 64 : LC (graphe supérieur)-MS (graphes inférieurs) des lipides extraits des membranes de cellules Y79 (identification de PC et SM).

Grâce à cette méthode, nous avons pu valider la présence de la cardiolipine, du phosphatidylinositol, de la phosphatidyléthanolamine, de la phosphatidylsérine et de la sphingomyéline dans nos échantillons en comparant les masses obtenues à celles rapportées par Imbert et al. (2012) (tableau 16).

Ionization mode	Lipid class	Rt. (min)	ESI	
			Mol. ion	Frag.
+	Sq	3.21	<u>411</u>	
+	OOO	7.30	885	<u>603</u>
+	Chol	10.41		<u>369</u>
-	SA	12.17	<u>283</u>	
-	CB	14.16	<u>852</u>	
			<u>840</u>	
			<u>826</u>	
			<u>812</u>	
			798	
-	PG	17.05	<u>843</u>	283
			815	281
			775	
			775	
			<u>747</u>	
-	CL	17.35	<u>1448</u>	
-	PE	18.22	<u>806</u>	716
			<u>766</u>	
			744	
-	PI	19.25	<u>859</u>	
			<u>833</u>	
-	PS	21.09	<u>788</u>	701
-	LPE	21.40	480	<u>283</u>
			466	
+	PC	23.21	810	
			786	
			<u>760</u>	
+	SM	24.26	753	
			<u>[M+Na]⁺</u>	
			<u>731</u>	
+	LPC	25.09	<u>548</u>	

Tableau 16 : rapport m/z des ions moléculaires caractéristiques d'un mélange standard de lipides en ESI (d'après Imbert et al. 2012). Les valeurs soulignées indiquent le pic le plus intense.

C.2.1.1. Validation des phospholipides présents dans les membranes cellulaires par infusion de masse

Afin de valider l'ensemble des phospholipides détectés et de proposer des hypothèses sur la nature des chaînes d'acides gras, nous avons utilisé le spectromètre de masse en infusant un échantillon très concentré en lipides membranaires de cellules Y79. Le logiciel Mass Bank a été utilisé pour associer les fragments obtenus en MS² aux phospholipides et aux chaînes d'acides gras.

Il est important de noter que travaillant en mode négatif, toutes les masses exactes correspondent à la masse du pic -1, un proton ayant été arraché lors de l'ionisation.

La figure 65 montre le spectre obtenu après infusion de la totalité de l'extrait contenant les lipides Y79. A partir de ce résultat, nous avons identifié les pics caractéristiques des lipides en présence, pour ensuite les fragmenter en MS² et obtenir des informations sur les longueurs des chaînes carbonées.

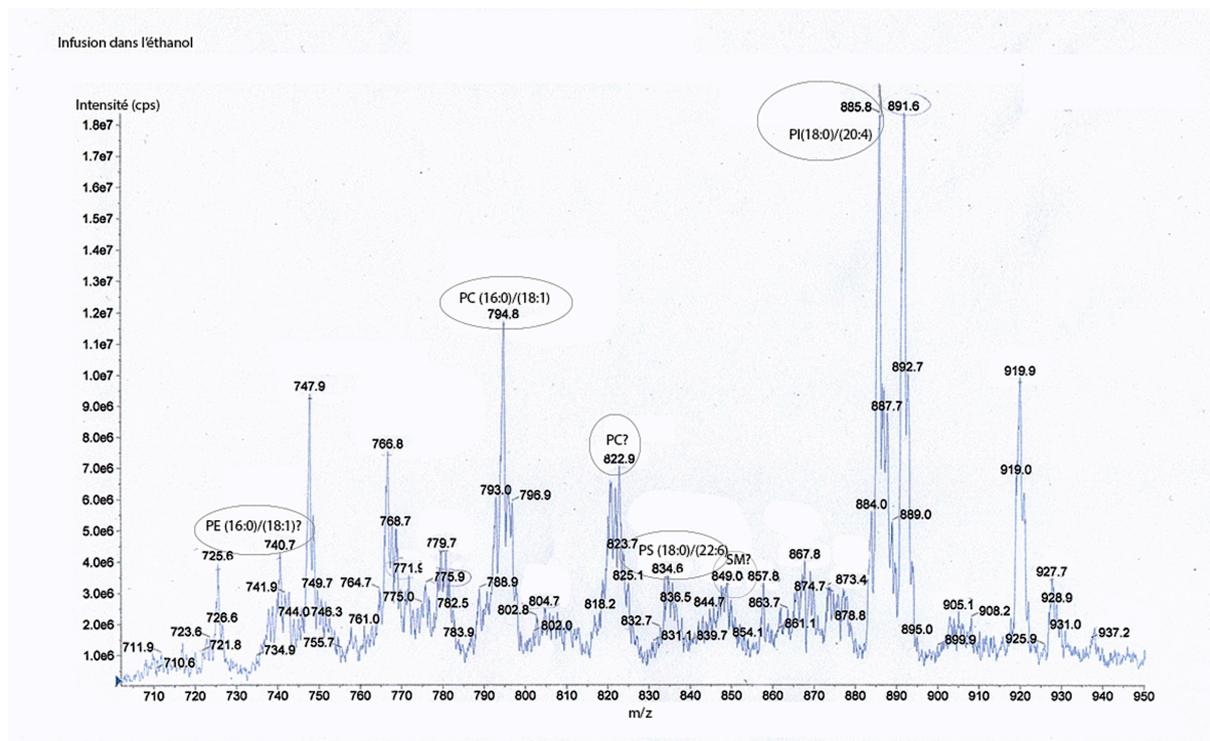
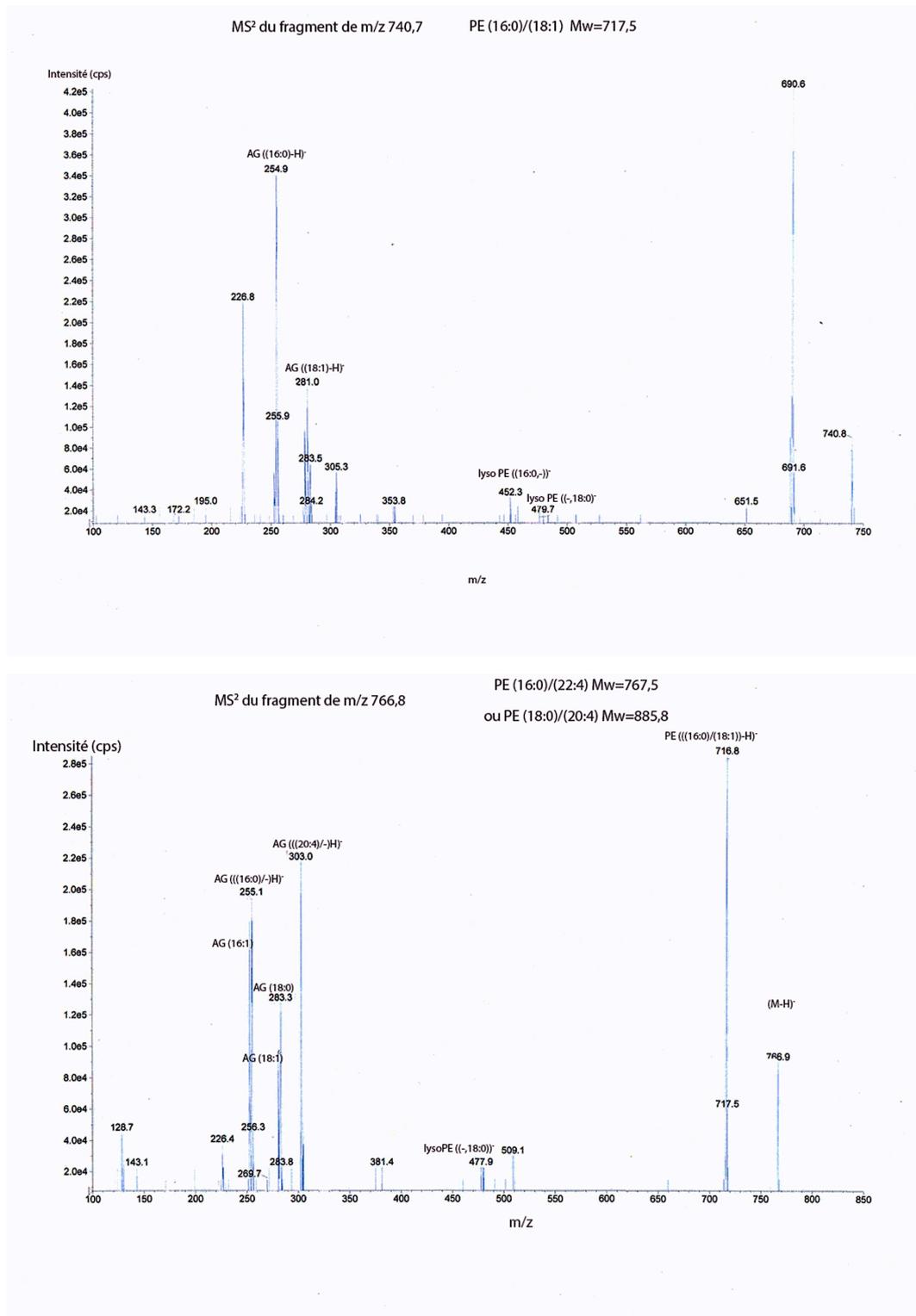


Figure 65 : spectre de masse des lipides membranaires des cellules Y79 après infusion.

C.2.1.1.1. Phosphatidyléthanolamine (PE)

La PE est un phospholipide mal détecté en spectrométrie de masse, c'est pour cela que l'avons validé par infusion, les concentrations étant plus élevées (figure 66).

Figure 66 : MS² de la PE

Le premier spectre montre la présence de PE(16:0/18:1). Le deuxième correspond à deux structures possibles : PE(16:0/22:4) ou PE(18:0/20:4). Soit une seule de ces deux espèces est présente, soit les deux, mais dans des proportions inconnues.

C.2.1.1.2. Phosphatidylsérine (PS)

Tout comme la PE, la PS s'ionise difficilement. C'est pour cela que nous ne l'observons que par infusion (figure 67).

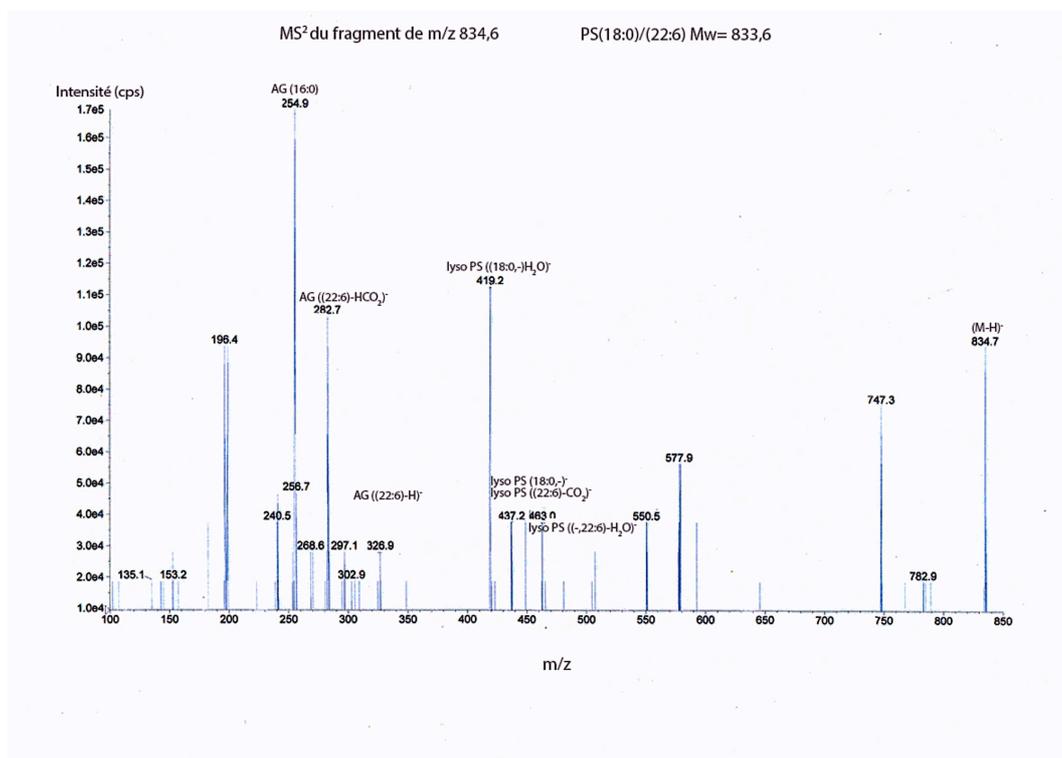
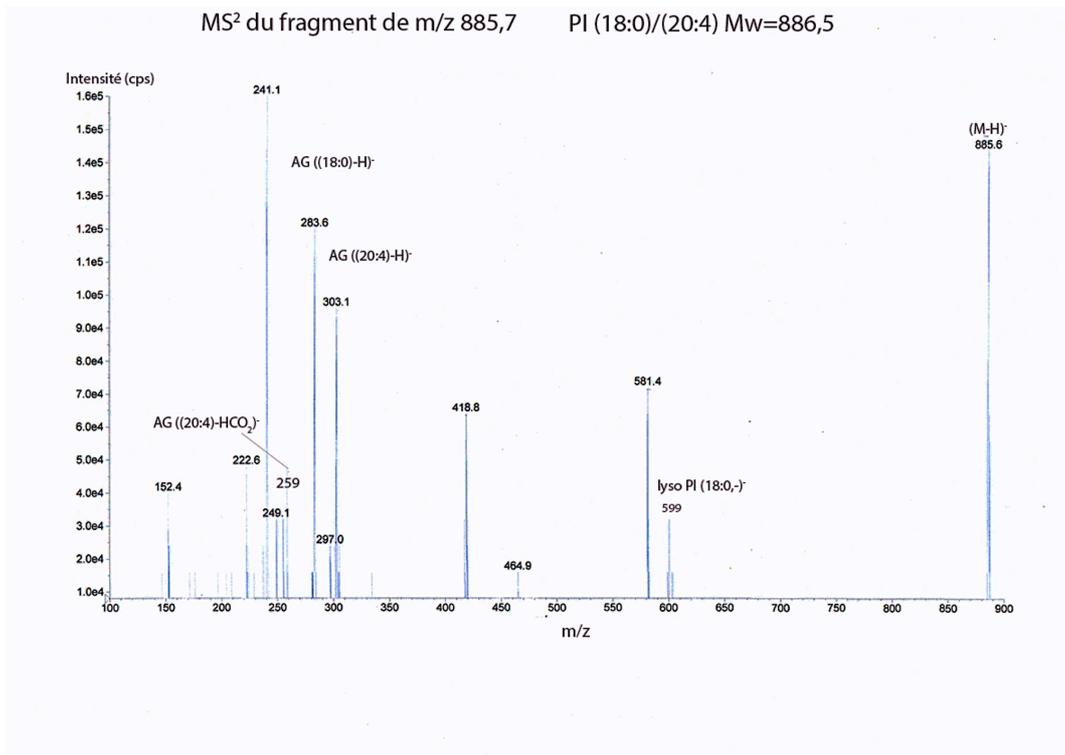


Figure 67 : MS² de la PS

Nous ne détectons qu'une espèce: PS (18:0 / 22:6).

C.2.1.1.3. Phosphatidylinositol (PI)

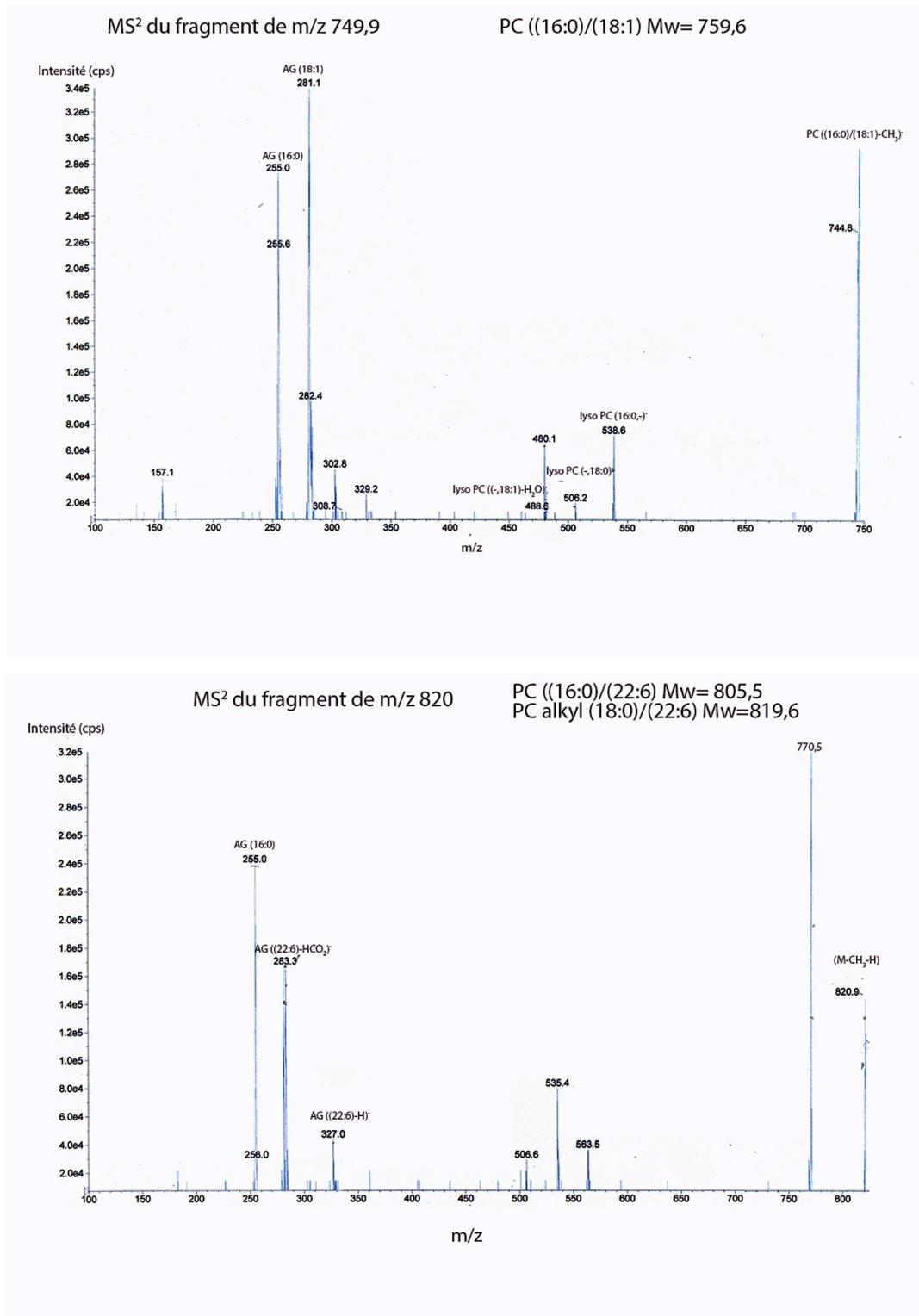
La figure 68 présente le spectre de masse MS² du fragment correspondant au phosphatidylinositol :

Figure 68 : MS² de la PI

Nous ne détectons qu'une espèce: PI (18:0 / 20:4).

C.2.1.1.4. Phosphatidylcholine (PC)

La figure 69 présente le spectre de masse MS² du fragment correspondant à la phosphatidylcholine :

Figure 69 : MS² de la PC

Le premier spectre montre la présence de PC(16:0/18:1). Le deuxième correspond à deux structures possibles: PC(16:0/22:6) ou PC alkyl(18:0/22:6). Soit une seule de ces deux espèces est présente, soit les deux, dans des proportions inconnues.

Grâce à cette technique, nous avons validé toutes les têtes polaires présentes dans nos mélanges et nous avons désormais une idée de la longueur des chaînes hydrocarbonées. Sur ce plan, le modèle artificiel n'est pas suffisamment proche de la réalité, notamment en ce qui concerne la longueur de la chaîne insaturée.

Nous avons décidé de continuer notre étude en analysant les pics non identifiés.

C.2.1.2. Analyse des pics non identifiés (NI)

Nous avons identifiés et quantifiés tous les phospholipides ainsi que le cholestérol présents dans les différents échantillons de lipides membranaires. Le pourcentage de lipides non identifiés n'étant pas négligeable (près de 50%) et ces lipides non identifiés pouvant potentiellement être des marqueurs de la cancérisation, nous avons décidé de les analyser à leur tour. Un des pics non élucidé élué par la méthode de détection des phospholipides utilisée précédemment pourrait correspondre à un ou plusieurs céramides.

La colonne et les conditions de séparation ont été modifiées afin de pouvoir séparer et mieux détecter les céramides en présence. Après passage de plusieurs standards en LC-DEDL, nous avons identifié un céramide majoritairement présent dans les membranes de cellules Y79 : le céramide standard CIIIb dont le temps de rétention correspond à celui d'un pic majoritaire provenant de l'échantillon testé, comme le montre le chromatogramme de la figure 70 :

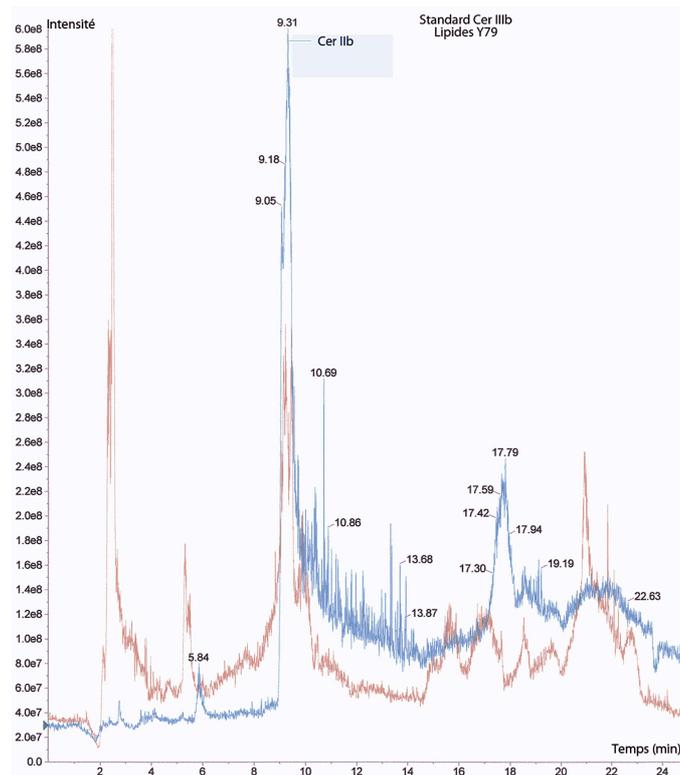


Figure 70 : chromatogramme d'un standard de céramide (Cer IIIb) en bleu et d'un échantillon de lipides extraits des membranes de cellules Y79 en rouge.

Afin de valider la structure du céramide présent dans notre échantillon, nous l'avons ensuite analysé par LC-MS.

Les céramides sont des lipides issus de la réaction d'amidification de la sphingosine ou de la phytosphingosine et d'un acide gras. Suivant la famille de céramides, la fragmentation en spectrométrie de masse n'est pas la même (figure 71).

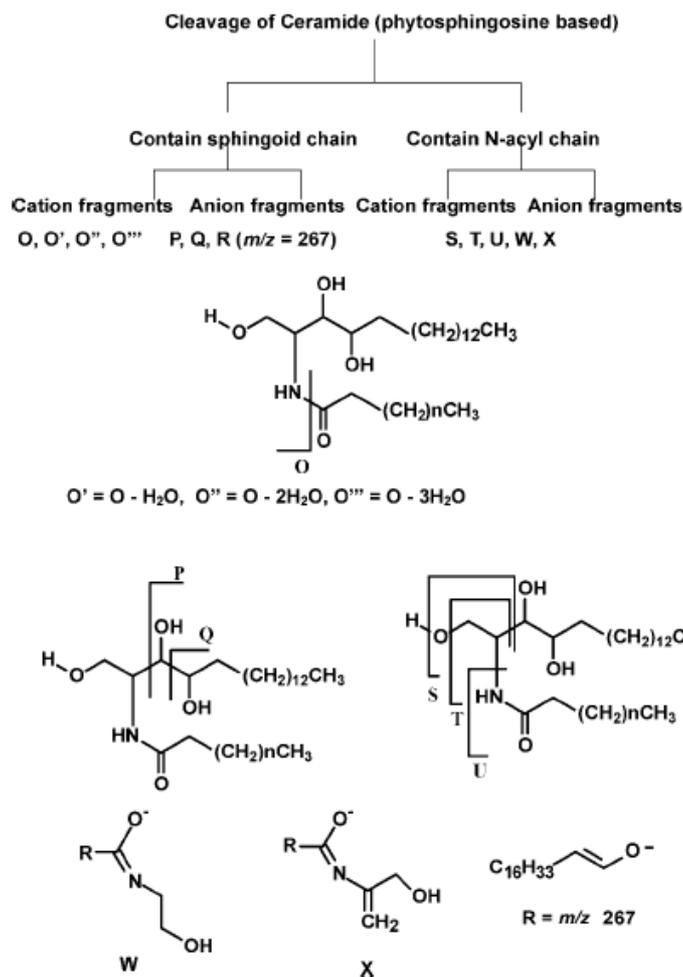


Figure 71 : nomenclature pour les clivages des ions précurseurs des céramides à base phytosphingosine (d'après Lee et al. 2002)

Le spectre de masse en MS² (figures 72 et 73, tableau 16) montre la fragmentation de l'ion de m/z 616. Nous retrouvons alors les fragments communs caractéristiques des céramides (ici, P, R, U, W, X). Il n'est pas nécessaire de retrouver tous les fragments, car nous ne sommes pas en infusion et par conséquent, les concentrations sont faibles. Le céramide identifié est bien le Cer IIIb (C18 :1P), céramide à base phytosphingosine acétylé par un acide oléique. Il possède une insaturation, ce qui le différencie du céramide III.

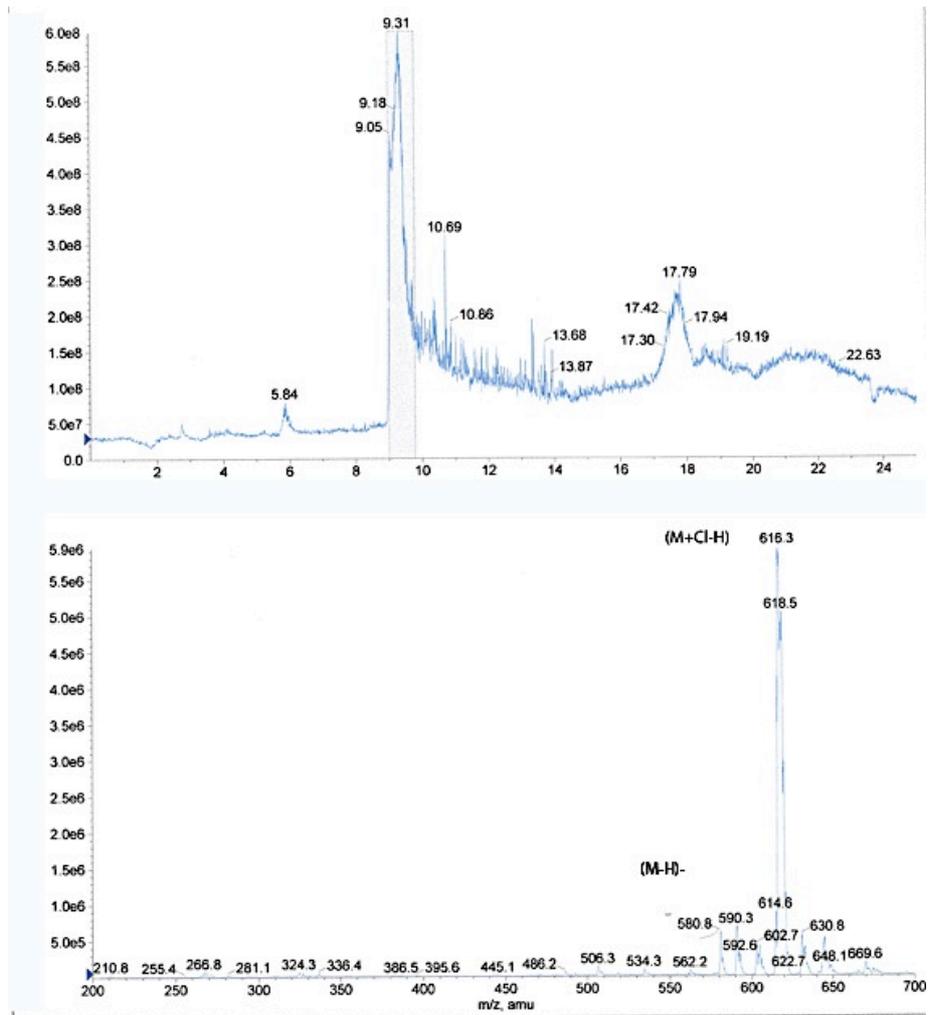
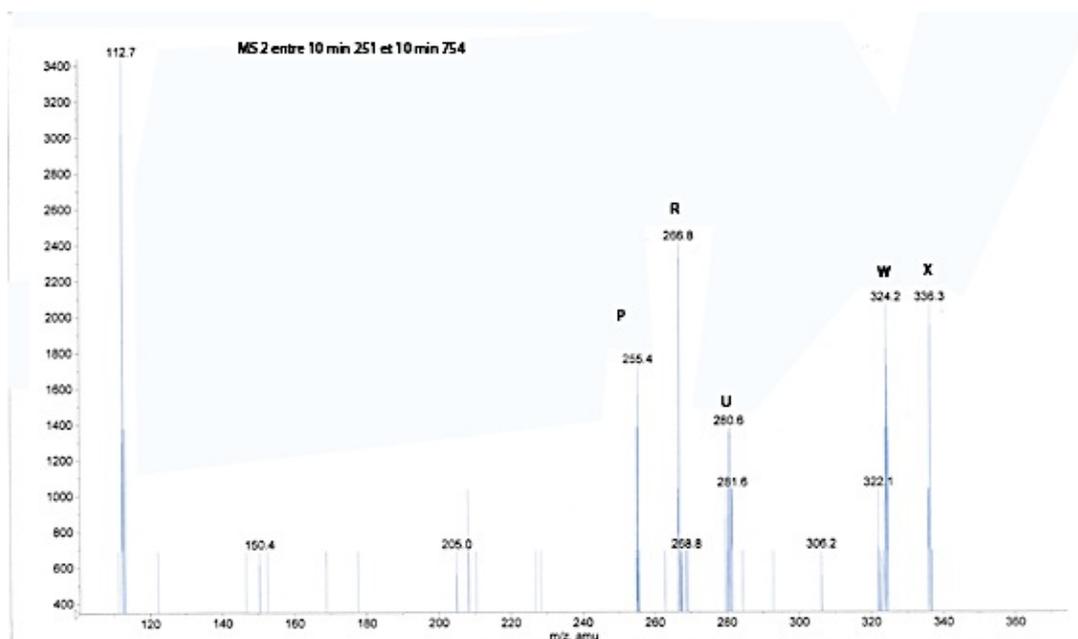


Figure 72 : spectre de masse de l'échantillon de lipides extraits des membranes cellulaires de Y79 (en haut : chromatogramme, en bas : spectre de masse du pic de céramides, analyse entre 10,2 et 10,8 min)

Figure 73 : MS² correspondant au pic du céramide détecté

Characteristic in-source CID negative fragment ions (<i>m/z</i>) of ceramides with phytosphingosine											
	MW	P	Q	R	S	T	U	W	X	[M - H] ⁻	[M - H + AcOH] ⁻
C6:0P	415.7	255	225	267	156	140	114	158	170	415	475
C8:0P	443.7	255	225	267	184	168	142	186	198	443	503
C11:1P	483.9	255	225	267	224	208	182	226	238	483	543
C18:1P	582.0	255	225	267	322	306	280	324	336	581	641
C18:2P	580.0	255	225	267	320	304	279	322	334	579	639

Tableau 16: ions négatifs caractéristiques après fragmentation (d'après Lee et al. 2002)

Ainsi, nous avons analysé les phospholipides et le cholestérol des échantillons en les quantifiant. Nous avons également pu évaluer les longueurs des chaînes des phospholipides identifiés. Il restait sur le chromatogramme (figure 36) deux pics : l'un des deux a été identifié comme un pic de céramides contenant le Cer IIIb, l'autre reste à ce jour non identifié.

C.3. Identification des lipides des différentes membranes cellulaires

L'analyse de la composition membranaire totale des cellules Y79 et des xéno greffes a soulevé plusieurs interrogations, dont une décisive par la suite pour la reformulation du modèle de membrane de rétinoblastome artificiel. Nous avons trouvé une quantité non négligeable de cardiolipine dans nos extraits de lipides

totaux. Or, la cardiolipine est connue pour être un lipide spécifique des mitochondries ; lorsqu'elle est exprimée à la surface membranaire, cela signe l'état d'apoptose des cellules. Les proportions non négligeables de cardiolipine présentes dans les membranes étaient-elles liées à un nombre élevé de mitochondries dans les cellules cancéreuses de rétinoblastome ou à un début d'apoptose de ces dernières ? Pour répondre à cette question, nous avons décidé de séparer les membranes des organites subcellulaires et d'isoler les mitochondries. Par la technique de centrifugation différentielle, nous avons pu également séparer les membranes des noyaux de celles du réticulum endoplasmique couplé à la membrane plasmique. Dans chaque fraction, nous avons ensuite extraits les lipides membranaires en appliquant une extraction de Folch. Les lipides membranaires des différentes fractions ont été analysés par LC-MS et les résultats sont présentés dans les figures 74 à 76. Tous les spectres issus des extractions par centrifugation différentielle montrent un pic à 7,65-7,66 min que nous n'avons pas pu identifier.

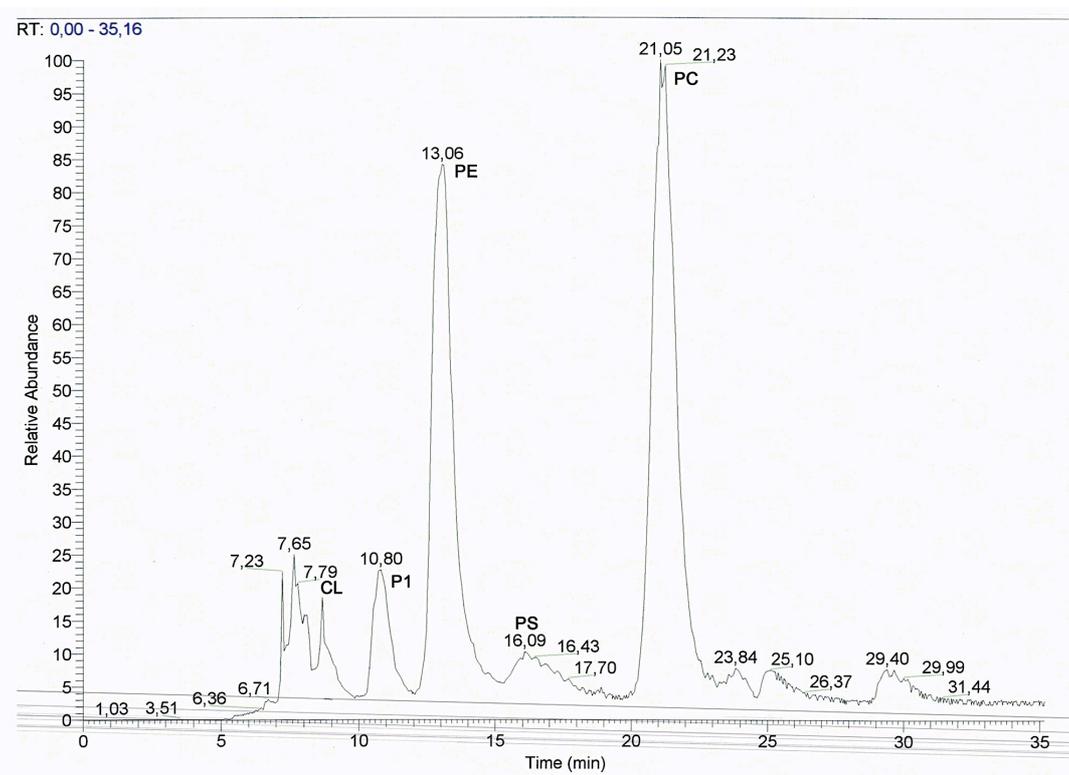


Figure 74 : chromatogramme LC-MS des lipides membranaires de la fraction mitochondriale.

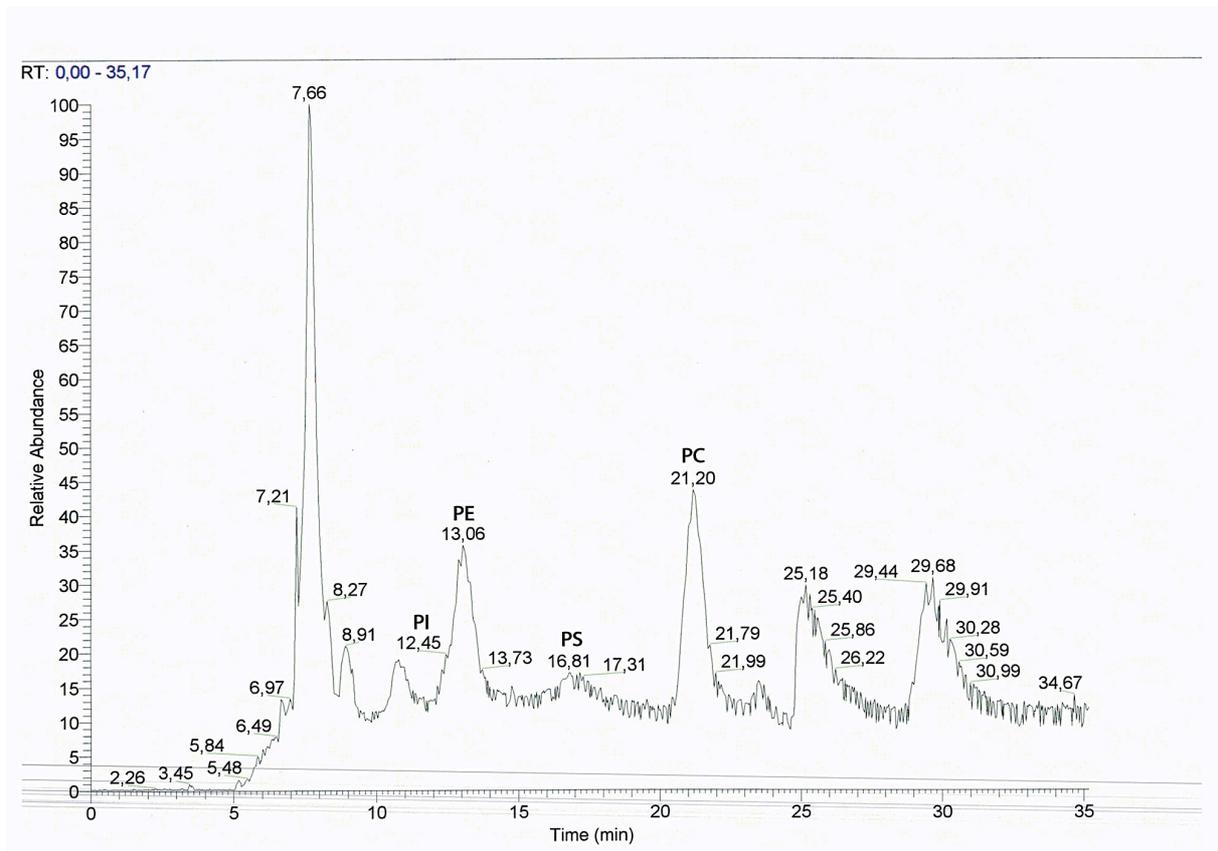


Figure 75 : chromatogramme LC-MS des lipides membranaires de la fraction nucléaire.

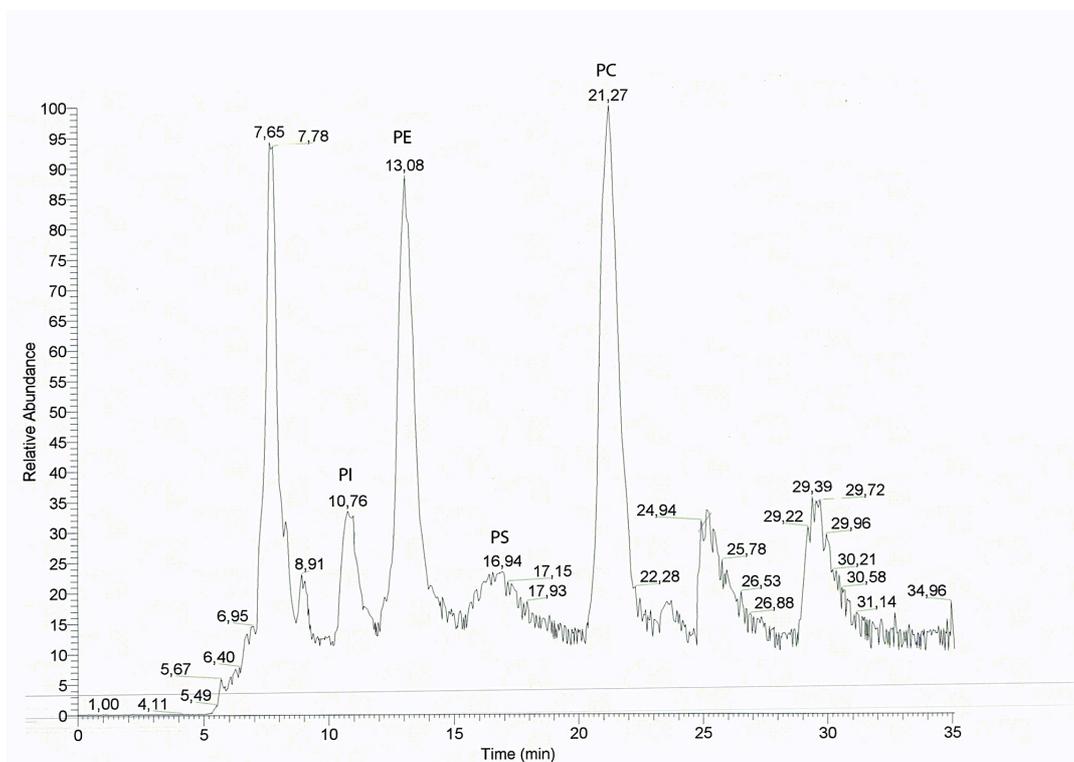


Figure 76 : chromatogramme LC-MS des lipides membranaires de la fraction correspondant au réticulum endoplasmique et à la membrane plasmique.

Les masses indiquées par chaque pic ont été analysées et nous avons pu identifier la plupart des lipides présents dans les différents mélanges. Les lipides issus des fractions du noyau (figure 75) et du mélange réticulum endoplasmique/membrane plasmique (figure 76) sont identiques. Ces fractions contiennent toutes en proportions variables du PI et de la PS, de la PC et de la PE. Un composé non identifié a également été observé dans ces deux fractions de rapport m/z 478,25. La fraction mitochondriale contient également ces lipides, mais aussi toute la cardiolipine (figure 74). Les cellules Y79 contiennent donc un nombre très élevé de mitochondries ce qui est confirmée par l'importance du culot de la fraction correspondante récupérée lors de l'étape de centrifugation différentielle. Il est connu que les cellules cancéreuses contiennent des mitochondries avec un métabolisme altéré (Gogvadze et al. 2008), il est également probable, vu les besoins énergétiques de ces cellules, que le nombre de mitochondries par cellule soit élevé. La fraction du mélange réticulum endoplasmique/membrane plasmique est la plus riche en phospholipides. Mais nous n'avons pas pu, à ce jour, déterminer les proportions respectives de ces différents phospholipides et du cholestérol qui la composent. Ce travail doit donc être poursuivi.

C.4. Analyse du comportement interfacial des extraits de lipides et formulation d'un nouveau modèle artificiel

C.4.1. Comportement interfacial des extraits lipidiques totaux

L'un des deux objectifs de l'analyse lipidomique que nous avons réalisée était de valider la pertinence du modèle lipidique proposé par Makky et al. (2010a), le second étant d'approfondir notre connaissance du rétinoblastome et de comparer les profils lipidiques des cellules Y79, Rb102 et Rb200. Pour valider le modèle, nous avons étudié le comportement interfacial des lipides issus des différentes extractions et nous l'avons comparé à celui des modèles M1 (SOPC-SOPE-SOPS-CHOL, 43:41:11:5) et M3 (SOPC-SOPE-SOPS-CHOL, 36:34:12:18) utilisés par Ali Makky pendant sa thèse. Nous nous sommes intéressés au profil des isothermes π -A établies après dépôt sur balance de Langmuir d'une masse identique de lipides dans tous les cas, et plus particulièrement à l'évolution du module de compressibilité qui

caractérise le degré d'organisation des monocouches à différentes pressions de surface. La pression de surface qui correspond le mieux, selon la littérature, à celle des membranes est 30 mN/m (Blume, 1979).

L'étude a été réalisée d'abord sur les extraits lipidiques membranaires totaux issus des cellules Y79 et de la xénogreffe Rb 102. Il n'a pas été possible, faute de temps, d'analyser de cette façon les extraits lipidiques issus de la xénogreffe Rb 200. Les isothermes sont présentées dans la figure 77. Cette figure montre un comportement voisin des extraits lipidiques totaux de Y79 et Rb102 à l'interface air/tampon. Une transition caractéristique est retrouvée vers 28 mN/m dans les deux cas. La pression de collapse est elle-aussi quasiment identique. Les modules de compressibilité sont représentés dans la figure 78. Seule l'aire occupée par les molécules apparaît différente, plus faible pour l'extrait de Rb102 que celui de Y79. Les isothermes des deux extraits totaux se démarquent très significativement des isothermes des deux modèles artificiels. Toutefois, on note une superposition de l'isotherme du modèle artificiel (43 :41 :11 :5) à celles des extraits aux pressions les plus faibles. La morphologie des isothermes des lipides Y79 et du modèle M3 : SOPC-SOPE-SOPS-CHOL (36 :34 :12 :18), observée à l'aide du microscope à l'angle de Brewster, est peu différente jusqu'à 25 mN/m. Des domaines apparaissent toutefois à 34 mN/m pour la monocouches de lipides des cellules Y79.

Les modules de compressibilités présentés dans la figure 78 confirment la ressemblance entre les comportements interfaciaux des extraits d'origine biologique. Ils sont faibles et démontrent que ces couches lipidiques sont très désorganisées ($K < 50$ mN/m). La courbe du modèle artificiel SOPC-SOPE-SOPS-CHOL (36 :34 :12 :18) contraste fortement, avec un module de compressibilité maximum voisin de 117 mN/m à une pression proche de 30 mN/m. La monocouche de ce modèle n'est pas seulement plus expansée, elle est également beaucoup plus structurée. La courbe de compressibilité du modèle (43 :41 :11 :5) se distingue peu du précédent.

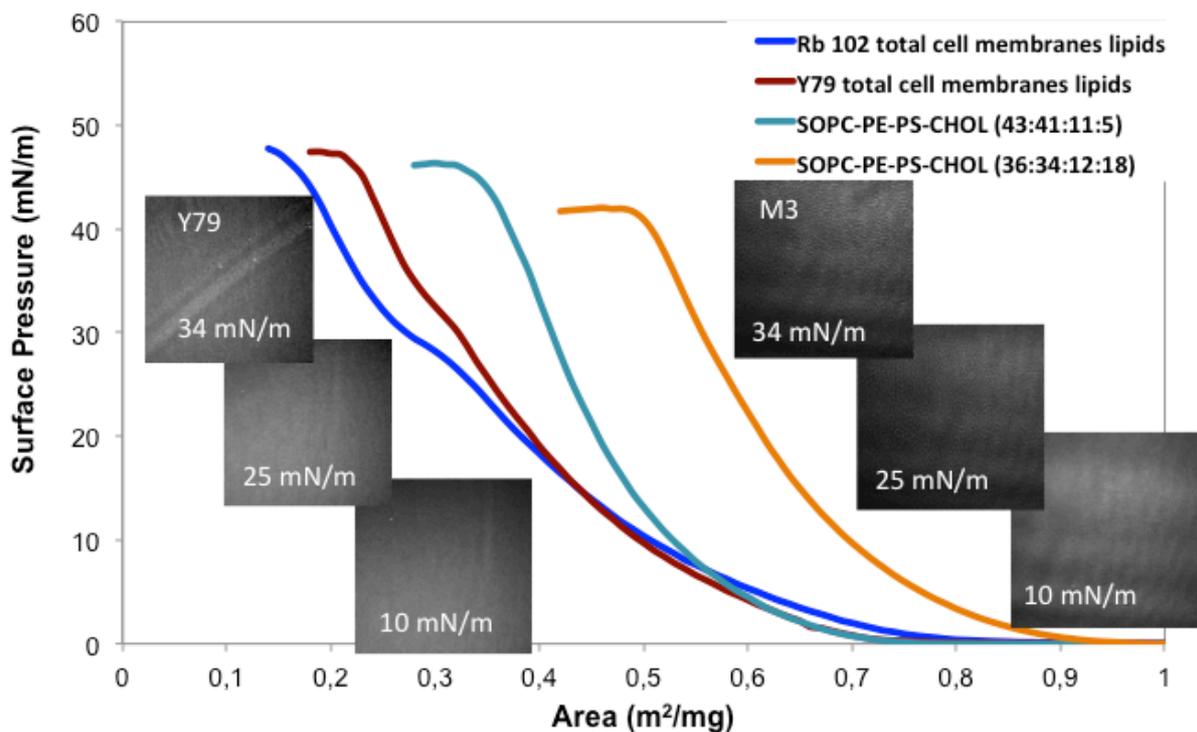


Figure 77 : isothermes de compression et morphologie des monocouches d'extraits lipidiques totaux des membranes de cellules Y79 et des xénogreffes Rb 102 comparées à l'isotherme de compression des deux modèles artificiels.

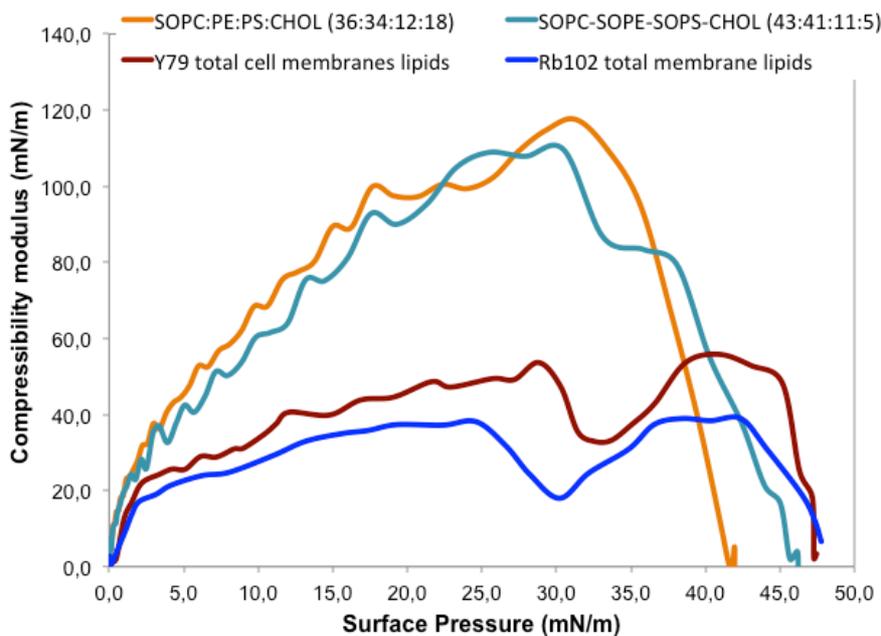


Figure 78 : modules de compressibilité des monocouches d'extraits lipidiques totaux des membranes de cellules Y79 et des xénogreffes Rb 102 comparées au module de compressibilité du modèle M3.

C.4.2. Comportement interfacial des extraits lipidiques issus du fractionnement des membranes des cellules Y79

La figure 79 compare les isothermes obtenues pour les différentes fractions et avec celle obtenue pour l'extrait lipidique total des cellules Y 79.

Les résultats montrent que le profil de l'isotherme des extraits lipidiques totaux des membranes Y79 est fortement influencé par celui de la fraction du reticulum endoplasmique et des membranes plasmiques. Ceci se confirme dans les valeurs du module de compressibilité (figure 80). Mais on remarque également que l'isotherme des extraits lipidiques totaux est fortement expansée et que l'aire occupée est voisine de celle de la fraction mitochondrie.

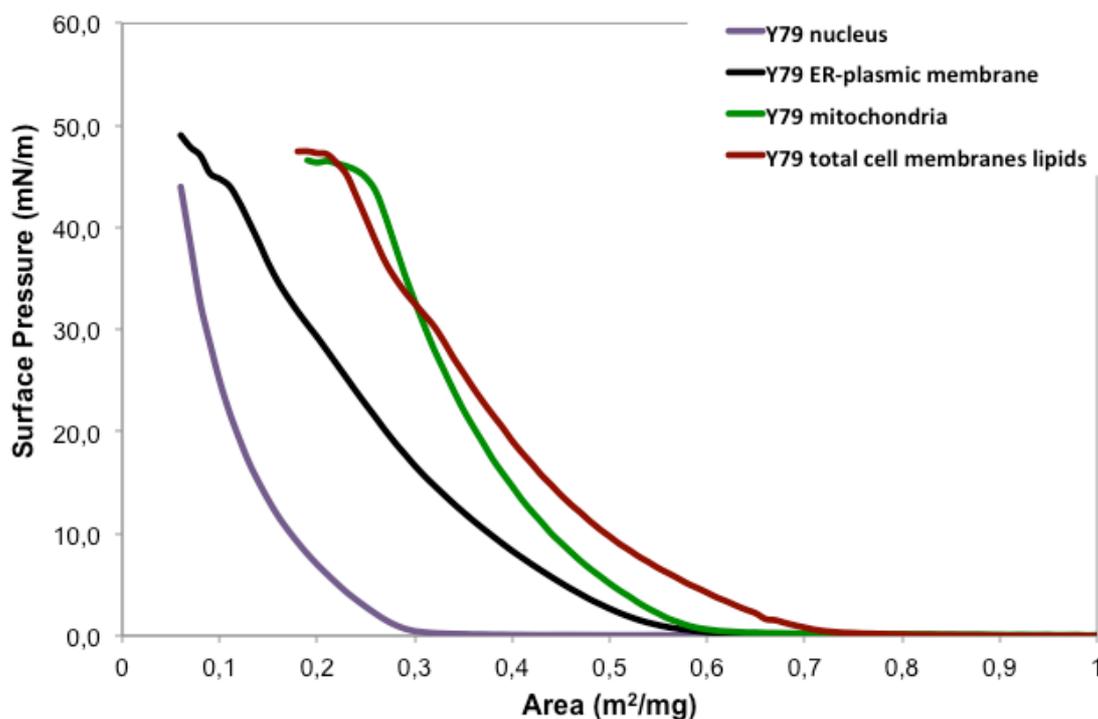


Figure 79 : isothermes de compression des lipides membranaires extraits des différentes fractions cellulaires de Y79 comparées à l'isotherme de compression des lipides totaux extraits des cellules Y79.

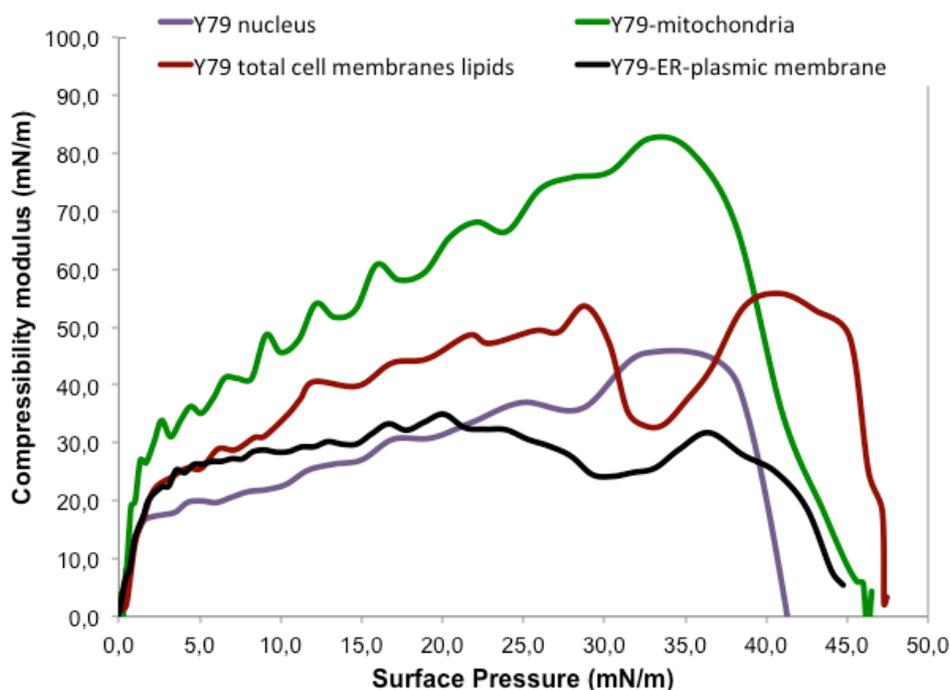


Figure 80 : module de compressibilité des lipides membranaires extraits des différentes fractions intracellulaires de Y79 comparées aux modules de compressibilité des lipides totaux extraits des cellules Y79 et du modèle M3.

C.4.3. Formulation d'un nouveau modèle artificiel

A la suite de ces résultats, un nouveau modèle (M4) a été proposé qui prend en compte le ratio massique des composants principaux des extraits lipidiques totaux des membranes de cellules Y79 (d'après le tableau 13) et qui tient compte également de la longueur de chaîne insaturée de certains lipides, notamment la PC. Ce modèle est constitué de 1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, (SDHAPC), SOPE, SOPS, CHOL en proportion massique (49 :26 :8 :17). L'isotherme correspondant à ce mélange est présentée dans la figure 81 et comparée à l'isotherme des extraits lipidiques totaux Y79 et au modèle M3 précédent. C'est la seule comparaison qui a pu être réalisée, car comme indiqué plus haut, il n'a pas été possible, faute de temps, de déterminer les ratios respectifs des lipides dans la fraction réticulum endothélial-membrane plasmique qui auraient été plus adaptés à la formulation du modèle.

Les modifications apportées au ratio des différents constituants et à la nature de la PC utilisée n'ont pas produit beaucoup d'effet en ce qui concerne l'aire limite moyenne occupée par les molécules et la pression de surface au collapse. Toutefois,

la comparaison des modules de compressibilité de la figure 82, montre que le modèle M4 a un état d'organisation plus faible que le modèle M3 et se rapproche, en cela, des extraits lipidiques totaux.

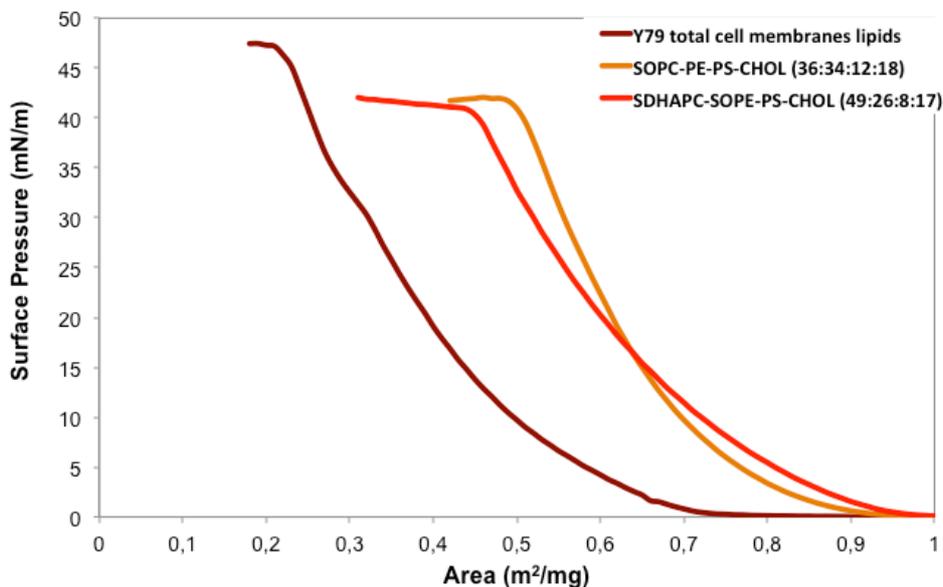


Figure 81 : isotherme de compression du modèle SDHAPC-SOPE-PS-CHOL (49 :26 :8 :17) et comparaison avec le modèle M3 et l'isotherme des extraits lipidiques totaux des membranes Y79.

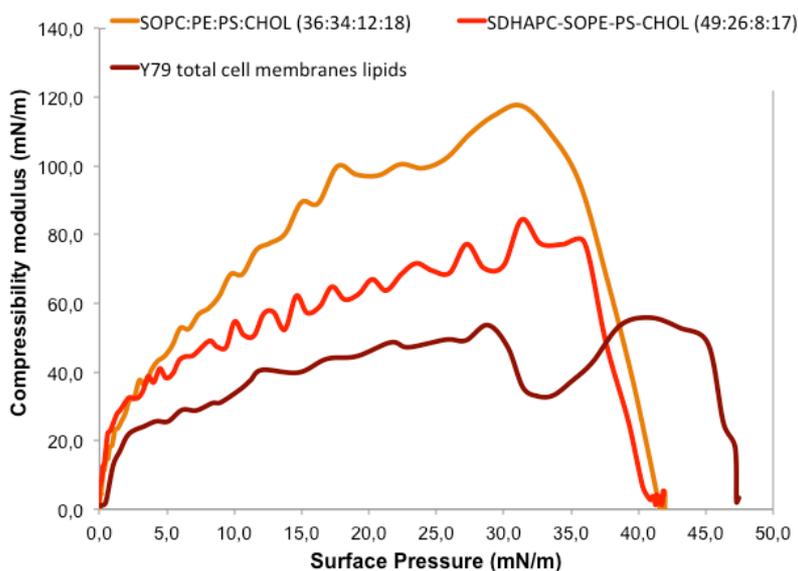


Figure 82 : module de compressibilité du modèle SDHAPC-SOPE-PS-CHOL (49 :26 :8 :17) et comparaison avec ceux du modèle M3 et des extraits lipidiques totaux des membranes Y79.

Références :

Bligh, EG., and Dyer, WJ., A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917(1959).

Blume, A., A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 557, 32-44 (1979).

Davies JT., Rideal, EK., *Interfacial phenomena* 2nd ed., Academic Press, New York, :265 (1962).

Fliesler, SJ., Anderson, RE., Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. Lipid Res.* 22, 79–131 (1983).

Folch, J., Lees, M., and Stanley, GHS., A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509 (1957).

Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol.* 18, 165–173 (2008).

Henon, S., Meunie, J., Microscope at the Brewster angle - Direct observation of first order phase transitions in monolayers, *Review of scientific instruments* [0034-6748] Vol. :62 :936 - 939 (1991).

Huster, D., Arnold, K., and Gawrisch, K., Influence of Docosahexaenoic Acid and Cholesterol on Lateral Lipid Organization in Phospholipid Mixtures, *Biochemistry* 37, 17299–17308, (1998).

Huster, D., Arnold, K., and Gawrisch, K., Strength of Ca(2+) binding to retinal lipid membranes: consequences for lipid organization. *Biophys. J.* 78, 3011–3018, (2000).

Imbert, L., Gaudin, M., Libong, D., Touboul, D., Abreu, S., Loiseau, P.M., Laprévotte, O., Chaminade, P., Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for a lipidomic analysis of *Leishmania donovani*. *J Chromatogr A* 1242, 75–83 (2012).

Lee, M.H., Lee, G.H., Yoo, J.S., Analysis of ceramides in cosmetics by reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry with collision-induced dissociation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17, 64–75 (2003).

Lodish, HF., *Biologie moléculaire de la cellule* (De Boeck Supérieur) (1997).

Makky, A., Thèse "Analyse des mécanismes de pénétration intramembranaire de porphyrines glycoconjuguées utilisables en thérapie photodynamique des cancers : modélisation des interactions spécifiques et non-spécifiques." Université Paris-Sud (2010).

Makky, A., Michel, J-P., Ballut, S., Kasselouri, A., Briand, E., Maillard, Ph., Rosilio, V., Evaluation of the specific interactions between glycodendrimeric porphyrins, free or incorporated into liposomes, and concanavalin A by fluorescence spectroscopy, surface pressure, and QCM-D measurements. *Langmuir* 26, 12761–12768 (2010).

Makky, A., Michel, J-P., Ballut, S., Kasselouri, A., Maillard, Ph., Rosilio, V., Effect of cholesterol and sugar on the penetration of glycodendrimeric phenylporphyrins into biomimetic models of retinoblastoma cells membranes. *Langmuir* 26, 11145–11156 (2010).

Makky, A., Michel, J-P., Maillard, P. & Rosilio, V. Biomimetic liposomes and planar supported bilayers for the assessment of glycodendrimeric porphyrins interaction with an immobilized lectin. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 656–666 (2011).

Yorek, MA., Figard, PH., Kaduce, TL., Spector, AA., A comparison of lipid metabolism in two human retinoblastoma cell lines. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26, 1148–1154 (1985).

Discussion générale

La PDT est un mode de traitement qui repose sur l'effet conjugué d'un PS et de la lumière. L'excitation du PS conduit à la formation d'oxygène singulet responsable de la mort cellulaire. L'une des conditions nécessaires pour l'efficacité du traitement est la pénétration intracellulaire du PS. Deux mécanismes sont possibles : la diffusion passive et le transport médié par une protéine. A l'institut Curie, un protocole d'évaluation des PS sur culture cellulaire a été mis au point. Il est appliqué à la détermination de l'efficacité potentielle de PS applicables pour le rétinoblastome. Ce protocole permis de cribler plusieurs séries de dérivés de la tétraphénylchlorine et de la tétraphénylporphyrine (Maillard et al. 2007). Il a mis en évidence le processus actif de passage transmembranaire de PS glycoconjugués et plus particulièrement celui de PS mannosylés et galactosylés. Ce passage repose sur la présence de récepteurs à sucre, encore non identifiés au début de cette thèse. Des porphyrines glycodendrimériques ont été synthétisées par l'équipe du Dr Maillard (Ballut et al. 2012) pour cibler ces récepteurs. Au même moment dans notre laboratoire, une stratégie de modélisation des membranes biologiques par le couplage de monocouches, vésicules et bicouches planes lipidiques était développée. Ces modèles artificiels étaient destinés à l'étude des mécanismes spécifiques et non spécifiques de pénétration intramembranaires de substances médicamenteuses. Un modèle lipidique de membrane du rétinoblastome, composé de trois phospholipides (SOPC/SOPE/SOPS) et de cholestérol en proportion variable (10-30%), a été mis au point par Ali Makky pour l'évaluation du mécanisme non spécifique et a été complété par le greffage d'une lectine (concanavaleine A) pour l'évaluation du mécanisme spécifique. L'application de la plateforme de modèles membranaires a permis de discriminer trois porphyrines dendrimériques, dont deux glycodendrimériques (Makky et al. 2010a, 2010b, 2011). En revanche, l'évaluation cellulaire par le protocole mise au point à l'Institut Curie n'a pas permis de démontrer leur efficacité, ni même de discerner la différence d'interaction des molécules avec les cellules. Or, l'évaluation cellulaire est nécessaire pour statuer sur le « Go » ou « no Go » des PS vers l'évaluation animale. À ce jour, la molécule qui a franchi ce cap est TPP-(DegMan)₃ (Poyer et al. 2012).

L'objectif de mon travail de thèse était de poursuivre l'étude des mécanismes d'interaction de ces porphyrines dendrimériques glycoconjuguées avec la membrane

cellulaire de rétinoblastome, afin (1) de valider les résultats obtenus avec le modèle membranaire précédemment établi, et (2) d'améliorer ce modèle en affinant sa composition lipidique.

Nous avons dans un premier temps renouvelé les évaluations cellulaires en testant deux protocoles: celui de D. Carrez et A. Croisy, d'une part et celui décrit par Laville et al. (2006). Ces deux protocoles se distinguent par la quantité de sérum de veau fœtal à ajouter au milieu de culture (20% dans un cas et 2% dans l'autre) et le temps d'incubation des porphyrines avec les cellules (24h ou 4h, respectivement), avant illumination. Nos travaux n'ont pas permis davantage que les précédents de valider les résultats obtenus avec le modèle membranaire. Les porphyrines libres se sont avérées non phototoxiques dans la gamme de concentration étudiée (0-7,5 μM) et peu cytotoxiques vis à vis des cellules Y79, en comparaison avec la porphyrine TPP-(DegMan)₃. Aucune discrimination entre les molécules portant des sucres et la porphyrine dendrimérique témoin non sucrée n'a pu être observée. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces résultats.

Les cellules Y79 sont des cellules suspensives qui poussent en grappe et il est possible que cette configuration limite l'accès des PS aux cellules situées au centre de ces grappes. En outre, une forte concentration en sérum de veau fœtal est nécessaire pour leur survie et leur multiplication (20%) (J. Portoukalian, communication personnelle). Or, les protéines présentes dans le sérum interagissent fortement avec les photosensibilisateurs. Cette interaction a déjà été observée avec le médicament Photofrin[®], qui interagit principalement avec les LDL, altérant la distribution des PS dans l'organisme (Candide et al. 1986). Plus récemment, une étude par spectroscopie de fluorescence avec quenching a montré la forte influence de la structure moléculaire des dérivés porphyriniques et de leurs propriétés physico-chimiques sur leur partage entre la membrane de liposomes et l'albumine (Ibrahim et al. 2011). Nous savons également que les porphyrines glycodendrimériques se lient fortement aux lipoprotéines (LDL et surtout HDL) responsables du transport du cholestérol (B. Chauvin, 2011), alors que les porphyrines triglycoconjuguées non dendrimériques comme TPP-(DegMan)₃ préfèrent se lier à l'albumine (Wang et al. 2012). Cette capacité à se lier aux lipoprotéines avant interaction avec les cellules Y79 modifie sans doute le mécanisme et l'importance de la pénétration des

porphyrines dendrimériques dans les cellules. Pourtant, il a été démontré que le nombre de récepteurs aux lipoprotéines est plus élevé dans les membranes de cellules cancéreuses que dans les cellules saines (Gal et al. 1981, Maziere et al. 1981, Wojtyk et al. 2006, Sharman et al. 2004). Comment dans ce cas, expliquer la faible efficacité des porphyrines dendrimériques ? Une compétition entre récepteurs aux lipoprotéines et récepteurs au mannose est possible. Cela expliquerait pourquoi les expériences de culture cellulaire ne permettent pas de discriminer les porphyrines selon la présence ou non de mannose, puisque la liaison aux récepteurs des lipoprotéines n'implique pas le même mécanisme d'interaction.

Une autre hypothèse pouvant expliquer les différences d'IC₅₀ entre la molécule de référence TPP-(DegMan)₃ et les porphyrines glycodendrimériques serait une localisation intracellulaire différente. En effet, Séverine Ballut a étudié la localisation subcellulaire de ces molécules après 24h d'incubation avec des cellules d'adénocarcinome du colon HT 29 qui expriment aussi des récepteurs spécifiques du mannose. Elle a observé une localisation cytoplasmique diffuse pour TPP-(DegMan)₃ et ponctuelle pour les porphyrines glycodendrimériques. Aucune de ces porphyrines ne se trouvaient dans les lysosomes, ni dans les mitochondries. Cette différence de localisation traduit une distribution cytoplasmique moins uniforme pour les porphyrines glycodendrimériques, diminuant probablement leur pouvoir photocytotoxique. Des études de microscopie confocale réalisées sur les cellules Y79 fourniraient des informations complémentaires, même si la petite taille des cellules Y79 et leur gros noyau risquent de limiter la visualisation de la localisation cytoplasmique précise des molécules fluorescentes.

Comment travailler sans SVF tout en maintenant les cellules en vie ? La QCM-D nous a permis de nous affranchir des protéines sériques. Des expériences réalisées dans les mêmes conditions qu'avec le modèle artificiel, mais avec des cellules cette fois, ont confirmé *in situ* les interactions spécifiques entre les porphyrines incorporées dans des liposomes de DMPC et des cellules Y79. Non seulement la reconnaissance moléculaire sucre-récepteur à sucre a été démontrée, mais les composés étudiés ont pu être discriminés selon la présence ou non de mannose et la longueur de l'espaceur. Ces résultats confirment pleinement ceux

obtenus par Ali Makky avec les modèles membranaires sous forme de liposomes et bicouches planes, et valident le modèle membranaire comme modèle pertinent pour l'étude des interactions *spécifiques* entre porphyrines glycoconjuguées et membrane plasmique des cellules du rétinoblastome.

Pourrait-on utiliser cette expérience de QCM-D en remplacement de l'analyse par les cultures cellulaires ? Cela semble peu raisonnable.

En effet, la privation de sérum de veau foetal entraîne très probablement une altération du métabolisme cellulaire. L'adhésion des cellules Y79 qui sont des cellules naturellement suspensives sur le capteur de QCM-D amplifie certainement cette altération. Toutefois, comme le montre la figure 82, le profil de la courbe Δf en fonction de ΔD obtenue après adhésion des cellules Y79 sur le capteur est semblable à celle obtenue par Fredriksson et al. (1998), pour des cellules adhérentes MKE (Monkey Kidney Epithelium) et CHO (Chinese Hamster Ovary), sur une surface de polystyrène.

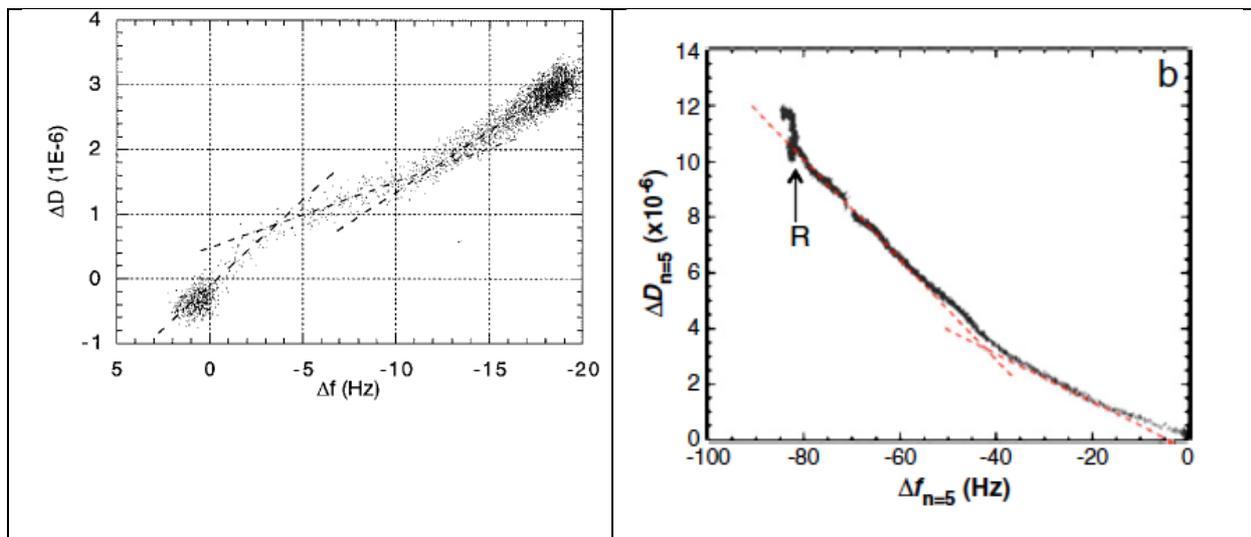


Figure 82 : Variation de dissipation en fonction de la variation de fréquence, R = rinçage. (a) résultat obtenu par Fredriksson après adhésion de cellules CHO sur le cristal de quartz recouvert de polystyrène, (b) résultat obtenu dans notre expérience après adhésion des cellules Y79 sur un cristal recouvert de poly-L-lysine.

Les auteurs ont identifié cinq étapes dans le processus d'adhésion cellulaire dans un milieu sans sérum : le contact physique initial, la sécrétion de microexsudats, l'étalement des cellules sur la surface, la modification des propriétés

d'adhésion, et le changement du cytosquelette. La réponse fournie par la QCM-D pendant l'adsorption et l'adhésion de cellules dépend évidemment de la nature des cellules et de la surface utilisée. Cependant, il est probable que les cellules Y79 subissent des changements morphologiques similaires à ceux décrits par Fredriksson.

Si l'adhésion cellulaire semble un processus bien contrôlé, nous avons observé une forte mortalité cellulaire une heure après la fin de l'interaction avec les porphyrines. La durée de vie des cellules adsorbées sur le capteur est donc limitée et si elle a été suffisante pour mettre en évidence l'interaction, elle ne permettrait pas de visualiser l'internalisation ni de procéder à une illumination des cellules après incubation. La QCM-D ne peut pas remplacer l'expérience sur cellules vivantes.

Les cinétiques de capture des porphyrines dendrimériques par les cellules Y79 ont été mesurées par cytométrie en flux. La comparaison entre ces cinétiques à 4 et 37°C a révélé un mode de capture différent selon la présence ou non de sucres. L'interaction entre les porphyrines glycodendrimériques et les cellules Y79 est médiée par un récepteur avec un mécanisme saturable, ce qui n'a pas été mis en évidence pour la porphyrine non mannosylée TPP-1c. Ceci confirme que les porphyrines glycodendrimériques sont bien reconnues par un ou plusieurs récepteurs à sucre. La cinétique de capture de TPP-2 est plus rapide que celle de TPP-1, probablement grâce à son espaceur plus long (TEG) permettant la liaison à plusieurs récepteurs à la fois. En ce qui concerne TPP-1c et surtout TPP-(DegMan)₃, les résultats de nos expériences sont moins concluants. Pour TPP-1c, la différence de fluorescence aux deux températures pourraient indiquer un transport médié, si elle est bien liée à un blocage de l'internalisation à 4°C et non à un artéfact.

Comme indiqué plus haut, nous savons que les porphyrines dendrimériques étudiées s'associent aux lipoprotéines du sérum (surtout les HDL) (Ibrahim et al., 2011, Chauvin et al., 2013, Wang et al., 2012) qui elles-mêmes se lient à leurs récepteurs à la surface des membranes cancéreuses. Ceci pourrait être une voie d'internalisation pour la porphyrine TPP-1c et peut-être aussi pour les porphyrines glycodendrimériques. Dans leur cas, il y aurait compétition entre les récepteurs à

sucre et les récepteurs aux HDL. Des études complémentaires sont envisagées pour répondre à cette question.

Nos mesures n'ont pas pu confirmer une capture médiée par un récepteur pour la porphyrine trimannosylée TPP-(DegMan)₃. Laville et al. (2006) ont montré comme nous, et par la même technique (mais pas le même appareil, ni les mêmes conditions), que le profil de fluorescence lié à la capture de cette porphyrine augmente en fonction du temps sans atteindre de saturation, même après 4 heures d'incubation avec les cellules Y79. Les faibles fluorescences enregistrées à 4°C ne nous permettent pas de conclure sur le mécanisme de pénétration de cette porphyrine. Pourtant, en pré-incubant les cellules Y79 avec de l'albumine mannosylée (1h à 37°C, 2,6 mg/mL), Laville et al. (2006) ont montré que leur interaction avec TPP-(DegMan)₃ entraînait une diminution de la fluorescence de 45% par rapport à la même expérience sans pré-incubation d'albumine mannosylée. Ceci indique bien un transport médié.

De notre côté, nous avons réalisé une expérience de compétition en incubant les cellules avec du mannose pour bloquer leurs récepteurs, avant de les mettre en contact avec les porphyrines. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois avec TPP-1 et TPP-2 et devrait être renouvelée pour être vraiment significative. Mais les résultats obtenus pour les deux porphyrines vont dans le même sens : ils montrent un ralentissement des cinétiques qui indiquent le blocage, partiel au moins, des récepteurs au mannose. Cette expérience pourrait être réalisée avec TPP-(DegMan)₃ et nous permettrait enfin de la comparer de manière satisfaisante aux porphyrines dendrimériques.

Le dernier objectif de notre travail consistait à déterminer la composition lipidique des membranes cellulaires de rétinoblastome, afin de valider la pertinence de notre modèle membranaire pour l'étude des interactions non spécifiques, et d'affiner sa composition. Les principaux lipides entrant dans la composition du modèle ont tous bien été retrouvés dans les extraits naturels. Nous n'avons pas observé de différences qualitatives dans la composition des lipides identifiés entre les membranes de cellules Y79 et celles de xéno greffes, ou d'une xéno greffe à l'autre. En revanche, au niveau quantitatif, nous avons pu noter une grande

différence : la quantité de lipides non identifiés est significativement plus élevée pour les membranes issues des xénogreffes que pour celles des cellules Y79. Ces lipides non identifiés pourraient inclure des acides gras liés à la présence d'une gangue grasseuse autour des xénogreffes, mais il se pourrait aussi que des lipides spécifiques soient également présents. Nous avons par exemple réussi à identifier le céramide Cer IIIb dans les membranes cellulaires de Y79 : peut être est-il présent en plus grande quantité, ou totalement absent dans les membranes des xénogreffes ? Des analyses complémentaires en LC-MS seront nécessaires pour déterminer la structure moléculaire de ces lipides, en utilisant d'autres colonnes de séparation que celle utilisée précédemment afin de mieux séparer les pics non identifiés.

Les autres différences significatives observées entre les lipides membranaires extraits des cellules Y79 et des xénogreffes concernent les phospholipides à tête PC et PE, plus présents dans les membranes de cellules Y79 que dans les xénogreffes. L'analyse des lipides extraits des différents organites n'a pas pu être menée jusqu'à son terme. Il faudrait la compléter sur le plan qualitatif et quantitatif, en particulier sur la fraction contenant les membranes plasmiques.

Les résultats tirés des analyses des lipides extraits des membranes totales nous ont permis de modifier la composition lipidique du modèle membranaire : 49% de PC avec une longue chaîne insaturée (22 :6 DHA) et une autre plus courte et saturée, 26% seulement de SOPE, 8% de SOPS, et 17 % de cholestérol : c'est le modèle M4. La comparaison des isothermes des lipides totaux des cellules Y79 et du nouveau modèle montre que le modèle M4 est encore trop expansé par rapport aux membranes naturelles. Cela peut être dû à la présence d'acides gras libres dans les lipides extraits des membranes totales (Funari et al. 2003). En revanche, nous avons réussi à abaisser considérablement le module de compressibilité du modèle, le rapprochant ainsi de celui des lipides membranaires des cellules Y79. Ce paramètre est important : nous cherchons à modéliser la capacité de pénétration des porphyrines dans une membrane, et c'est la compressibilité du mélange qui peut influencer le plus sur la pénétration de molécules exogènes par diffusion passive. Mais il ne faut pas perdre de vue non plus que les membranes naturelles sont très riches en protéines (près de 50%) et que la présence de ces dernières est susceptible de

rigidifier les membranes. Dans ce cas, le modèle M3 pourrait être biomimétique d'une membrane totale. Mais cela sera sans doute difficile à vérifier.

Références :

Ballut, S., Makky, A., Chauvin, B., Michel, JP., Kasselouri, A., Maillard, Ph., Rosilio, V., Tumor targeting in photodynamic therapy. From glycoconjugated photosensitizers to glycodendrimeric one. Concept, design and properties. *Org. Biomol. Chem.* 10, 4485–4495 (2012).

Candide, C., Morlière, P., Mazière, J.C., Goldstein, S., Santus, R., Dubertret, L., Reyftmann, J.P., and Polonovski, J., In vitro interaction of the photoactive anticancer porphyrin derivative photofrin II with low density lipoprotein, and its delivery to cultured human fibroblasts. *FEBS Letters* 207, 133–138, (1986).

Chauvin, B., Thèse, "Physico-chimie de méso-tétraphénylporphyrines glycoconjuguées pour la Photothérapie Dynamique : vers une meilleure compréhension de la distribution plasmatique et de la localisation subcellulaire ?", Université Paris Sud, (2011).

Fredriksson, C., Khilman S., Kasemo, B., Steel, DM., In Vitro Real-time Characterization of Cell Attachment and Spreading, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 9, no. 12, 785–788 (1998).

Funari, SS., Barceló, F., Escribá, PV., Effects of oleic acid and its congeners, elaidic and stearic acids, on the structural properties of phosphatidylethanolamine membranes, *J. Lipid Res.* 44, 567–575 (2003).

Gal, D., Macdonald, PC., Porter, J.C., Simpson, ER., Cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. III. Low-density lipoprotein metabolism, *International Journal of Cancer* 28, 315–319, (1981).

Ibrahim, H., Kasselouri, A., You, C., Maillard, P., Rosilio, V., Pansu, R., Prognon, P., Meso-tetraphenyl porphyrin derivatives: The effect of structural modifications on binding to DMPC liposomes and albumin, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 217, 10–21, (2011).

Laville, I., Pigaglio, S., Blais, JC., Doz, F., Loock, B., Maillard, Ph., Grierson, DS., Blais, J. Photodynamic efficiency of diethylene glycol-linked glycoconjugated porphyrins in human retinoblastoma cells. *J. Med. Chem.* 49, 2558–2567 (2006).

Maillard Ph., Loock B., Grierson DS, Laville I., Blais J., Doz F., Desjardins L., Carrez D., Guerquin-Kern JL., Croisy A., In vitro phototoxicity of glycoconjugated porphyrins and chloris in colorectal adenocarcinoma (HT 29) and retinoblastoma (Y79) cell lines, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 4 261-268 (2007).

Makky, A., Michel, J-P., Ballut, S., Kasselouri, A., Briand, E., Maillard, Ph., Rosilio, V., Evaluation of the specific interactions between glycodendrimeric porphyrins, free or incorporated into liposomes, and concanavalin A by fluorescence spectroscopy, surface pressure, and QCM-D measurements. *Langmuir* 26, 12761–12768 (2010).

Makky, A., Michel, J-P., Ballut, S., Kasselouri, A., Maillard, Ph., Rosilio, V., Effect of cholesterol and sugar on the penetration of glycodendrimeric phenylporphyrins into biomimetic models of retinoblastoma cells membranes. *Langmuir* 26, 11145–11156 (2010).

Makky, A., Michel, J-P., Maillard, P., Rosilio, V. Biomimetic liposomes and planar supported bilayers for the assessment of glycodendrimeric porphyrins interaction with an immobilized lectin. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 656–666 (2011).

Maziere, JC., Santus, R., Morliere, P., Reyftmann, JP., Candide, C., Mora, L., Salmon, S., Maziere, C., Gatt, S., Dubertret, L., Cellular uptake and photosensitizing properties of anticancer porphyrins in cell membranes and low and high density lipoproteins, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 6, 61–68, (1990).

Poyer F., Thomas CD., Garcia G., Croisy A., Carrez D., Maillard Ph., Lupu M., Mispelter J., PDT induced bystander effect on human xenografted colorectal tumors as evidenced by sodium MRI, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 9, 303-309 (2012).

Sharman, WM., van Lier, JE., Allen, CM. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 53–76 (2004).

Wang, ZJ., Chauvin, B., Maillard, Ph., Hammerer, F., Carez, D., Croisy, A., Sandré, C., Chollet-Martin, S., Prognon, P., Paul, JL., Blais, J., Kasselouri, A., Glycodendrimeric phenylporphyrins as new candidates for retinoblastoma PDT: blood carriers and photodynamic activity in cells. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 115, 16–24 (2012).

Wojtyk, JTC., Goyan, R., Gudgin-Dickson, E., Pottier, R., Exploiting tumour biology to develop novel drug delivery strategies for PDT. *Medical Laser Application* 21, 225–238 (2006).

Conclusion générale

Au début de ce travail, nous n'avions qu'une expérience de QCM-D sur des bicouches artificielles pour démontrer que les trois porphyrines dendrimériques TPP-1, TPP-2 et TPP-1c interagissaient de manière différente avec une membrane et que, dans le cas des porphyrines glycodendrimériques, la présence d'un récepteur à mannose orientait l'interaction. Il semblait également évident d'après les résultats que l'interaction spécifique était prédominante sur l'interaction non-spécifique. Nous avons démontré par notre approche innovante d'adhésion de cellules Y79 sur un capteur de QCM-D que nous pouvions reproduire les résultats obtenus avec le modèle synthétique. Non seulement les porphyrines glycodendrimériques reconnaissent un récepteur à mannose (Con A), mais elles reconnaissent le récepteur naturel porté par les cellules Y79. La cytométrie en flux a confirmé ces résultats et laisse penser, de plus, qu'un ou des récepteurs différents des récepteurs à sucre sont également impliqués dans le transport intracellulaire des PS.

Si ces expériences en QCM-D et cytométrie en flux ont mis en évidence et précisé les interactions, elles n'ont pas permis toutefois de statuer sur l'efficacité photodynamique de ces molécules.

A côté de l'interaction spécifique porphyrine-récepteur, il existe une interaction non spécifique porphyrine-lipides qu'Ali Makky avait mis en évidence à l'aide d'un modèle en monocouche. L'analyse lipidomique a été utilisée pour affiner la composition du modèle artificiel et comparer deux xénogreffes, Rb 102 et Rb200, qui ne répondent pas de la même façon au traitement. Cette analyse a montré que la lignée Y79 est un bon modèle biologique du rétinoblastome, car peu de différences ont été observées entre la composition lipidique de ces cellules et celles des deux xénogreffes. Il n'a pas été possible de distinguer de différences entre les profils lipidiques des xénogreffes, en tout cas en ce qui concerne les lipides identifiés. L'explication des différences de réponse au traitement se trouve peut-être dans la composition des lipides non identifiés ou des protéines. L'analyse lipidomique devra être poursuivie pour permettre l'identification totale et la quantification des lipides des membranes des organites, notamment la membrane plasmique. C'est seulement à ce moment-là que l'on pourra bâtir le modèle biomimétique de cette membrane, incluant éventuellement le ou les récepteurs identifiés et isolés.

Annexes

Annexe 1 : Courbes d'étalonnage LC-DEDL

Une courbe d'étalonnage effectuée en LC-DEDL répond à la fonction de puissance de type $y = am^b$. Les coefficients de corrélation nous permettent de valider cet étalonnage. Les figures A1-A8 présentent les courbes d'étalonnage établies pour les 8 lipides étudiés.

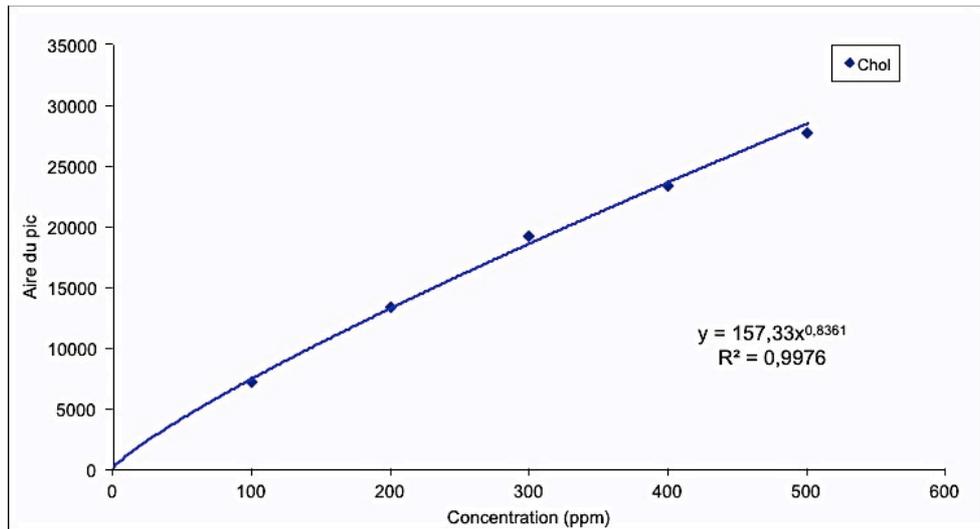


Figure A1 : courbe d'étalonnage du cholestérol.

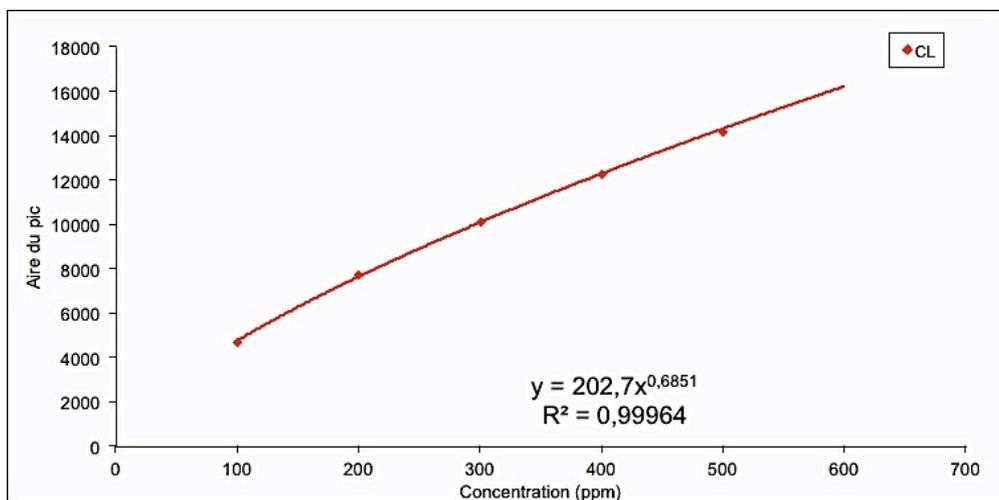


Figure A2 : courbe d'étalonnage de la cardiolipine.

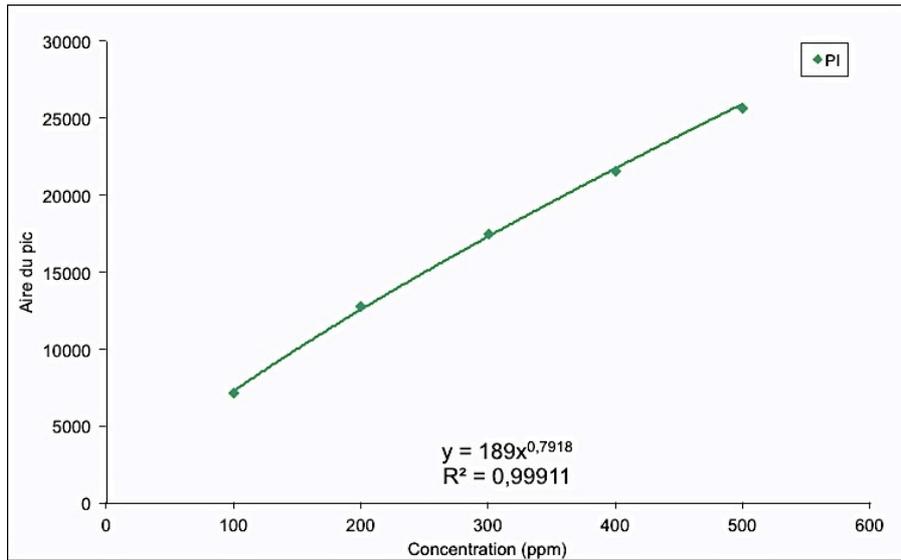


Figure A3 : courbe d'étalonnage du phosphatidylinositol.

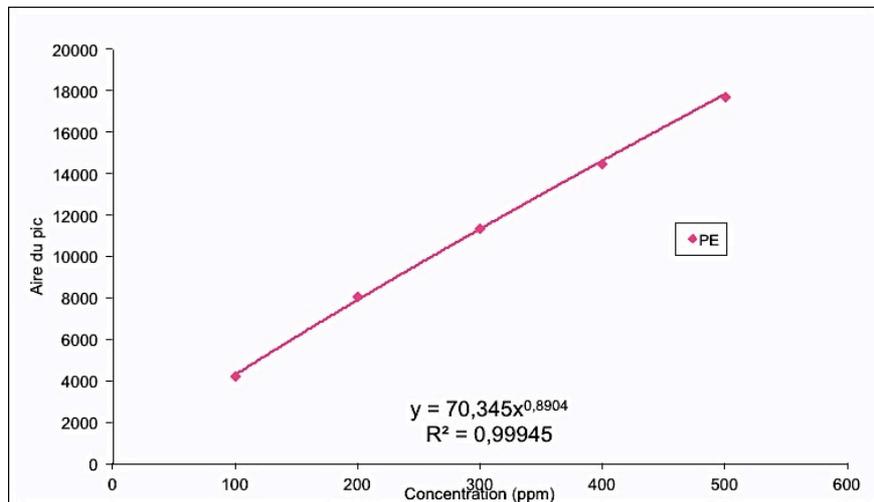


Figure A4 : courbe d'étalonnage de la phosphatidyléthanolamine.

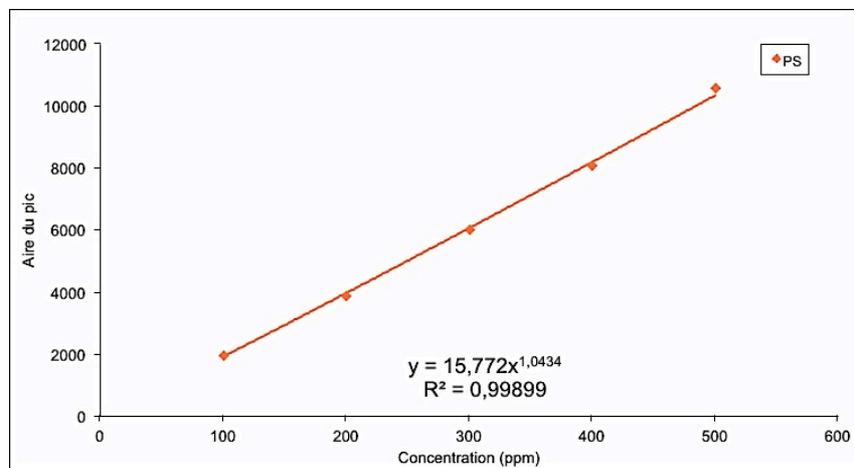


Figure A5 : courbe d'étalonnage de la phosphatidylsérine.

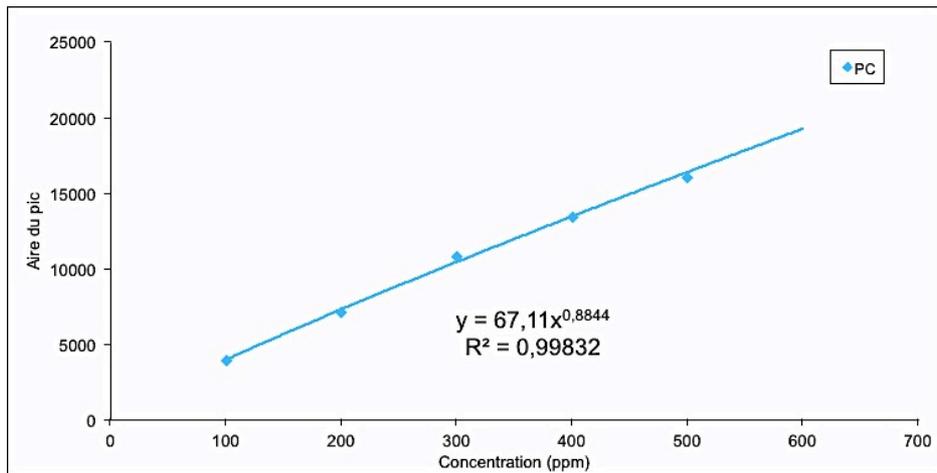


Figure A6 : courbe d'étalonnage de la phosphatidylcholine.

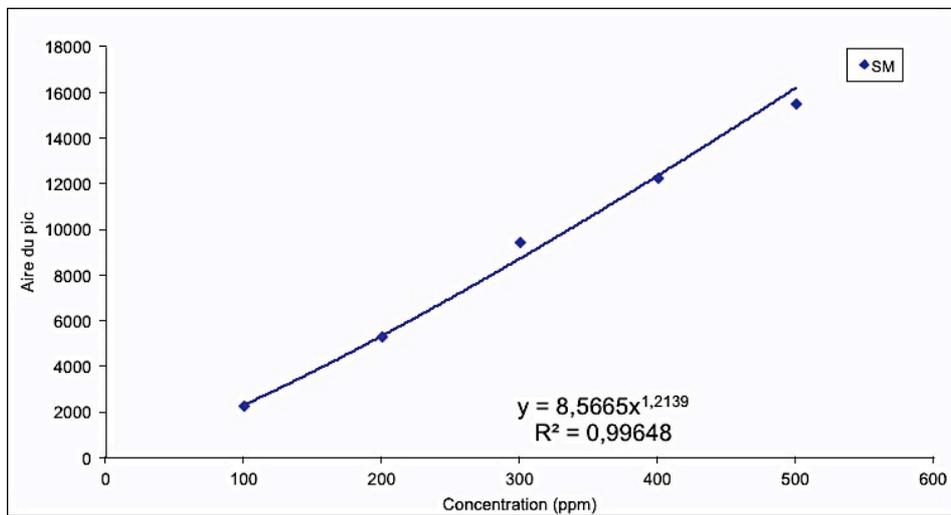


Figure A7 : courbe d'étalonnage de la sphingomyéline.

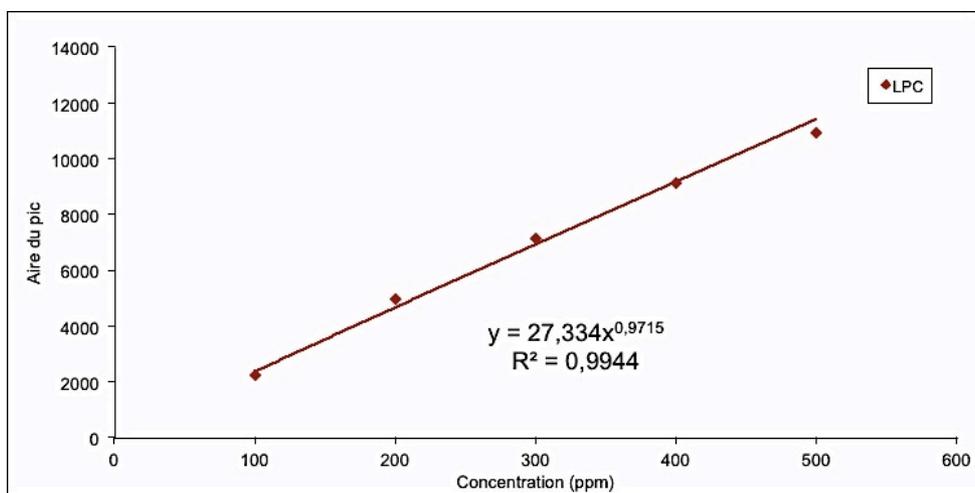


Figure A8 : courbe d'étalonnage de la lysophosphatidylcholine.

Annexe 2 : droite d'étalonnage du cholestérol en GC-MS

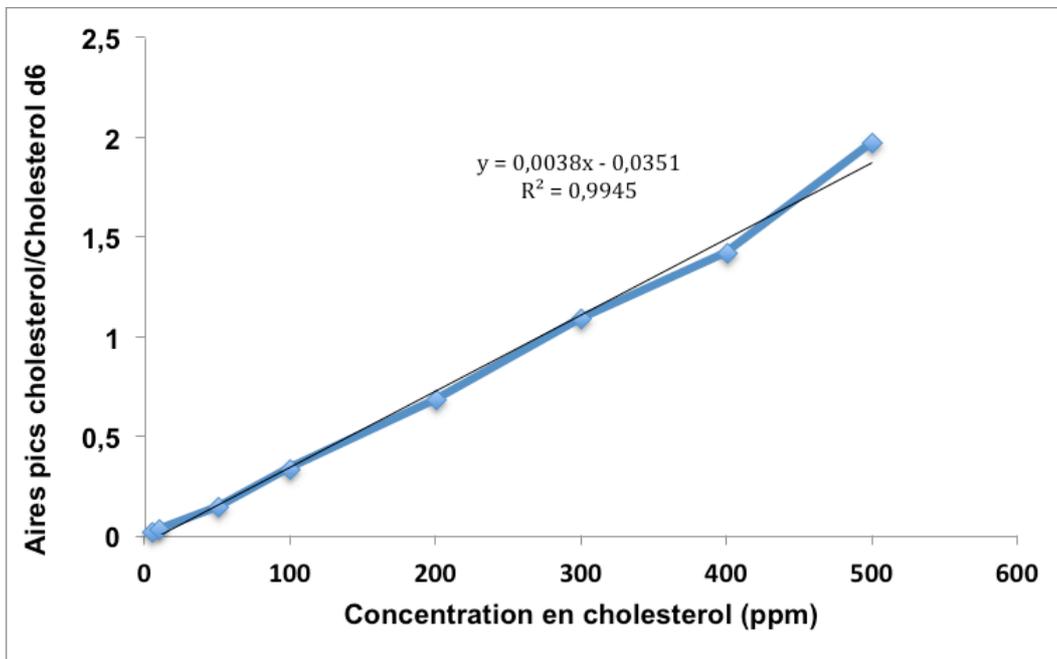


Figure A9 : courbe d'étalonnage du cholestérol.

La thérapie photodynamique (PDT) constitue une approche prometteuse pour le traitement de tumeurs cancéreuses accessibles à la lumière, en particulier pour la réduction des effets indésirables comparés à la chimiothérapie classique. Particulièrement intéressante pour le traitement du rétinoblastome, cancer le plus fréquent chez le jeune enfant, elle nécessite le développement de nouveaux photosensibilisateurs dont la structure est mieux adaptée aux spécificités des cellules ciblées. Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié des dérivés porphyriniques à structure dendrimérique pour amplifier leur caractère amphiphile et créer un cluster de sucres. Cette structure pourrait favoriser la reconnaissance de ces molécules par des récepteurs membranaires, interactions déjà mises en évidence grâce à des modèles membranaires artificiels. L'objectif de cette thèse était de déterminer les mécanismes d'interactions spécifiques et non spécifiques de ces molécules avec la membrane plasmique et de valider la pertinence des modèles artificiels. Si la culture cellulaire s'est avérée inadaptée pour cette détermination, une approche innovante utilisant une microbalance à cristal de quartz et des expériences de cytométrie en flux ont confirmé la capacité des porphyrines dendrimériques à interagir avec un ou plusieurs récepteurs spécifiques. Une analyse de la composition lipidique des membranes cellulaires de la lignée Y79 et de deux xénogreffes a été également entreprise afin de mieux caractériser ces membranes et de contribuer à l'élaboration d'un modèle lipidique artificiel davantage biomimétique du rétinoblastome.

Mots-Clés :

Photosensibilisateur - Porphyrines glycodendrimériques - Thérapie photodynamique - Rétinoblastome - Modèles membranaires - Spectrométrie de Fluorescence - Culture cellulaire- Cytométrie en flux - Analyse Lipidomique - LC MS- LC DEDL- infusion de masse - DLS - QCMD- Monocouches - Liposomes -Bicouches planes supportées - Concanavaleine A .

Institut Galien - UMR CNRS 8612

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex