



HAL
open science

Photosensibilisateurs pour la thérapie photodynamique (PDT) des cancers : impact des modifications structurales sur leur interaction avec des membranes

Donia Essaid

► **To cite this version:**

Donia Essaid. Photosensibilisateurs pour la thérapie photodynamique (PDT) des cancers : impact des modifications structurales sur leur interaction avec des membranes. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS042 . tel-02426229

HAL Id: tel-02426229

<https://theses.hal.science/tel-02426229v1>

Submitted on 2 Jan 2020

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.

NNT : 2016SACLS042

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
"UNIVERSITE PARIS SUD"

ECOLE DOCTORALE N° (571)
Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes

Spécialité de doctorat (Chimie)

Par

Mme Donia Essaid

Photosensibilisateurs pour la thérapie photodynamique (PDT) des cancers: impact des modifications structurales sur leur interaction avec des membranes

Thèse présentée et soutenue à « Chatenay Malabry », le « 04-03-2016 » :

Composition du Jury :

Mr, Chaminade Pierre
Mr, Afonso Carlos,
Mr, Sockalingum Ganesh.D
Mme, Rogalska Ewa
Mme, Kasselouri Athena
Mme, Rosilio Véronique

Professeur, Université Paris Sud
Professeur, Université de Rouen
Professeur, Université de Reims
Professeur, Université de Lorraine
Maitre de conférences, Université Paris Sud
Professeur, Université Paris Sud

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directrice de thèse
Co-directrice de thèse

A mon petit pays...tient bon...

REMERCIEMENTS

De nature discrète et réservée, il n'est pas évident de rédiger ces lignes. Bien que ce soit délicat, cela reste un point de passage important. Ainsi, je me lance.

Je tiens à remercier, dans un premier temps, Pr. Pierre Chaminade, qui m'a accueillie dans le premier laboratoire Lip(Sys)² et m'a fait l'honneur d'être le président de mon Jury de thèse. Ce fut un plaisir de travailler avec vous dans le cadre de mes deux premières publications. Je vous remercie pour vos recommandations avisées et tout ce que vous m'avait appris en analyse chromatographique, en analyse par spectrométrie de masse et surtout en chimiométrie.

J'exprime ma gratitude aux professeurs Carlos Afonso et Ganesh Sockalingum. Je les remercie d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie également Pr Ewa Rogalska d'avoir accepté de faire partie du Jury en tant qu'examinatrice.

Je remercie Dr Athena Kasselouri, avec qui j'ai débuté ma thèse. Je la remercie pour l'opportunité que représentent cette thèse et le projet Synchrotron qui a permis de l'enrichir. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance pour l'approbation d'une co-direction au bon moment.

Pour ma deuxième année de thèse, j'ai eu le plaisir d'intégrer une autre équipe de recherche, celle de Physico-chimie de surfaces de l'UMR 8612, afin d'être co-dirigée par Pr Véronique Rosilio. Je remercie professeur Rosilio pour la contribution qu'elle a apportée au projet et pour m'avoir permis de travailler sur une thématique passionnante. Ce fut un vrai plaisir de travailler avec vous durant deux ans de ma thèse. Vous vous êtes montrée toujours présente et disponible pour m'écouter, me conseiller et faire progresser le travail. J'admire votre analyse scientifique, vos remarques toujours pertinentes, vos réponses rapides à mes mails... et surtout vos qualités humaines. Je dois l'avouer, sans vous, cette thèse n'aurait pas abouti au même résultat.

C'est sans surprises que je m'attarde aussi pour remercier chaleureusement Dr Ali Tfayli. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris en spectroscopie, commençant par l'acquisition des spectres, aux pré-traitements jusqu'au traitement des données. Je te remercie également pour tout le temps que tu m'as consacré et pour tous les échanges scientifiques qui ont apporté

leurs fruits ; tu t'es toujours impliqué avec une extrême gentillesse. J'espère que tu retrouves dans ces lignes l'expression de ma vive reconnaissance.

J'ai eu également un grand plaisir à travailler avec Audrey Solgadi qui m'a formée sur l'Orbitrap et m'a fait découvrir le monde des phospholipides. Le travail sur la plateforme était l'un des moments que j'ai le plus apprécié. Je te remercie pour ta patience, pour tes explications aisées et récurrentes et je te remercie surtout pour ta bonne humeur.

Je voudrais consacrer un petit paragraphe au Pr Arlette Baillet, je suis ravie d'avoir eu l'occasion d'échanger avec vous sur le projet du Synchrotron. Il est fort dommage que ce ne soit pas assez. J'aurais bien aimé travailler plus avec vous. Je vous remercie d'avoir participé à la résolution du problème de financement à la fin de ma thèse.

A Philippe Maillard, je vous remercie pour toutes ces porphyrines qui ont fait l'objet de mes travaux. Je vous remercie également pour votre aide en ce qui concerne les expériences du $\log P$. Ce fut un plaisir de collaborer avec vous.

J'adresse mes remerciements aux autres collaborateurs du projet réalisé au Synchrotron Soleil, Florent Poyer, Carole Thomas et Mihaela Lupu de l'Institut Curie. Je remercie également Christophe Sandt pour m'avoir appris l'utilisation de l'appareil de microspectroscopie infrarouge sur la ligne SMIS. Je vous remercie pour tout le temps consacré à répondre à toutes mes questions.

Je garderai en mémoire que j'ai passé beaucoup de temps à faire du marathon entre les tours B, D2 et E2 (merci Reebok !). Cependant, le bon côté de cette course reste le fait d'avoir travaillé avec plusieurs chercheurs et ingénieurs. J'adresse mes sincères remerciements à Vincent Faivre et David Chaperon pour la DSC, à Sana Tfayli, qui s'est montrée toujours disponible pour répondre à toutes mes petites questions (ACP et spectroscopie), à Juliette Vergnaud de m'avoir remise sur les rails en culture cellulaire et m'avoir formée en western blot, à Marilyne Moulin pour le temps consacré pour répondre à mes questions sur le fractionnement cellulaire et pour m'avoir prêté tous les anticorps dont j'avais besoin, à Ronny Herzog, que je ne connais pas en personne, mais avec qui j'ai pas mal échangé à distance ce qui m'a permis de me lancer dans l'identification des lipides avec LipidXplorer. Je remercie également tous les étudiants et les permanents des deux équipes, voire même d'autres équipes de l'Institut Galien, avec qui j'ai pu échanger et qui ont facilité indirectement mon travail.

Je remercie très chaleureusement Ali Makky, pour toutes les discussions que nous avons eues concernant la science, la recherche et d'autres sujets passionnants... J'admire ta motivation et ta passion pour ce que tu fais. Je te remercie pour m'avoir supportée quand je débarquais dans ton bureau pour râler. Tu as toujours essayé de me raisonner. Enfin Je te remercie pour tous les cafés offerts lors de mes crises de migraines.

Je remercie tous mes amis rencontrés à la fac et ailleurs. Je les remercie pour leur soutien et leur compassion et pour avoir supporté mes sauts d'humeur. Certains sont déjà partis loin un peu partout en France (Brest, Lyon, Tours, Bordeaux..), mais je n'oublierai pas tous les bons moments passés ensemble. Je remercie Sarra et Yosr pour tous les fous rires, Oumaima, Ines, Imen, Ahba, Harona, Oussama (K), Anis, Xiao, Spiro pour votre amitié très sincère.

Enfin, je termine par ceux qui me sont chers dans ce monde, ceux qui sont toujours là où je me trouve, mes parents Hédia et Béchir ; merci pour tout le soutien moral et financier depuis le jour où je vous ai appris mon départ à l'étranger. Merci à ma tante Latifa pour tout l'amour qu'elle m'a apportée depuis mon enfance. J'adresse par la même occasion un grand Merci à mes sœurs Nedra et Amira (tu sais bien que j'adore Sousou).

Nomenclature et Abréviations

π	Pression de surface
C_s^{-1}	Module de compressibilité
γ	Tension superficielle
ΔH	Enthalpie
T_m	Température de transition
η	Indice de réfraction
δ	Vibration de déformation
ν	Vibration d'élongation ou valence
ν	Fréquence
λ	Longueur d'onde
ACP	Analyse en Composantes Principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ATR	Réflexion totale atténuée
C8 /C18	Phase stationnaire à groupements octadécyl
Chol	Cholestérol
CL	Cardiolipine
Corona-CAD	Corona-Charged Aerosol Detector
DEG	Diéthylèneglycol
DSC	Calorimétrie Différentielle à balayage
EMSC	Extended Multiplicative Signal Correction
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HILIC	Hydrophilic Interaction LIquid Chromatography
HPLC ou CLHP	High- performance liquid chromatography
IAM	Immobilized Artificial Membrane
IR	Infrarouge
FT-IR	Infrarouge à transformée de Fourier
LPC	Lyso- Phosphatidylcholine
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
MSC	Multiplicative scattering effect
PA	Phosphatidic acid
PCA	Analyse en composantes principale
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholine
PDT	PhotoDynamic Therapy (ou thérapie photodynamique)
PE	Phosphatidylétanolamine
PI	Phosphatidylinositol
PG	Phosphatidylglycerol
PLS-DA	Partial Least Square Discriminant Analysis
PSr	Photosensibilisateur
PS	Phosphatidylserine
RE ou ER	Réticulum endoplasmique
SDHAPC	1-stearoyl-2-docosahexaenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
SAPE	1-octadecanoyl-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine

SM	Sphingomyéline
SOPC	1-stearoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
SOPE	1-stearoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanolamine
SOPS	1-stearoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylsérine
TPP	tetraphényl porphyrine
WB	Western Blot

TABLE DES MATIÈRES

Introduction générale	5
Etat de l'art.....	7
1. Les photosensibilisateurs (PSr) pour la photothérapie dynamique (PDT).....	7
2. Principe de la PDT	8
3. La bio-distribution du PSr et le déroulement de la PDT	11
4. La PDT est-elle une alternative pour le rétinoblastome ?	12
5. Les porphyrines pour une application dans le traitement du rétinoblastome	14
6. Evaluation des porphyrines :	16
6.1. Les lignées cellulaires de rétinoblastome.....	16
6.1.1. Caractéristiques du matériel biologique	16
6.1.2. Photocytotoxicité, photoactivité et capture cellulaire.....	17
6.2. Les modèles murins	18
6.3. Modèles membranaires et étude de leurs interactions avec les PSr.....	18
7. Références Bibliographiques.....	21
Chapitre 1 : Analyse de l'interaction porphyrine-IAM par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	25
Lipophilicity of porphyrins and their retention in IAM, C8-C18 and HILIC chromatographic systems (Article)	26
Chapitre 2 : De la membrane cellulaire aux modèles membranaires : analyse lipidomique de cellules Y79 et ARPE-19 pour la construction d'un modèle artificiel appliqué à l'étude de l'interaction porphyrine-membrane:	54
1. La membrane biologique.....	55
2. Isolement de la membrane biologique	55
3. Les lipides et la lipidomique :	56
3.1. Les lipides et leurs fonctions biologiques :	56
3.2. La lipidomique et les bases de données	57
4. La classification des lipides.....	59
4.1. Les acides gras	59
4.2. Les glycérolipides	59

4.3. Les glycérophospholipides.....	59
4.4. Les sphingolipides	60
4.5. Les lipides stérols.....	61
4.6. Autres lipides	61
5. Structure de la membrane cellulaire : rôle des lipides.....	61
6. Localisation subcellulaire des lipides:.....	64
7. Analyse des lipides par spectrométrie de masse (MS)	65
7.1. La spectrométrie de masse	65
7.2. Le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Velos Pro.....	68
8. Modèles membranaires et monocouches lipidiques.....	69
8.1. La balance de Langmuir.....	70
8.2. Tensiomètre.....	71
9. Conception d'un modèle artificiel de membrane plasmique sous forme de monocouche, à partir d'une analyse lipidomique des cellules Y79 et ARPE-19.	71
Artificial Plasma Membrane Models Based on Lipidomic Profiling (Article).....	72
10. Résultats complémentaires	107
10.1. Optimisation du protocole du fractionnement.....	107
10.1.1. Protocole initial de fractionnement.....	107
10.1.2. Optimisation du protocole	109
10.2. Western Blot.....	110
10.3. Dosage des protéines	111
10.4. Identification des lipides	114
10.5. Extraction des lipides de membranes par fixation des cellules sur la poly-lysine :	117
10.6. Interaction porphyrine-modèle membraire en monocouches.....	118
11. Références bibliographiques.....	119
Chapitre 3 : Analyse de l'interaction Lipides-Porphyrines et Cellules-Porphyrines par spectroscopie infrarouge	127
1. Thermodynamique de la bicouche lipidique	129
2. Technique d'analyse thermique : La calorimétrie différentielle à balayage (DSC)....	130
2.1. Principe	130
2.2. Instrumentation DSC	130
3. Spectroscopie infrarouge.....	131

3.1.	Principe de l'absorption infrarouge	132
3.2.	Types des spectromètres infrarouge.....	133
3.3.	Modes de mesures infrarouge	133
3.4.	Instrumentation FT-IR ATR	134
3.5.	Microspectroscopie FTIR couplée au rayonnement Synchrotron.....	135
4.	Préparation des échantillons.....	135
4.1.	Lipides-TPP	135
4.2.	Cellules-TPP	136
5.	Conditions expérimentales des mesures.....	137
6.	Méthodologie d'analyse des spectres	138
6.1.	Pré-traitements	138
6.1.1.	Élimination des spectres aberrants	138
6.1.2.	Lissage	139
6.1.3.	Correction de la ligne de base.....	139
6.1.4.	Normalisation	139
6.1.5.	La diffusion de Mie (Mie scattering).....	140
6.1.6.	Extended Multiplicative Signal Correction (EMSC).....	140
6.1.7.	Dérivées	141
6.2.	Outils chimiométriques.....	141
6.2.1.	Analyse en composantes principales (ACP).....	141
6.2.2.	Analyse discriminante par Régression en moindres carrées partielles PLS-DA (Partial Least Square Discriminant Analysis).....	142
7.	Attribution des bandes spectrales en infrarouge.....	142
8.	Résultats et Discussion.....	145
8.1.	Analyse des mélanges TPP-lipides par DSC et ATR-FTIR	145
8.1.1.	Résultats obtenus par DSC	145
8.1.2.	Résultats de l'étude par FTIR ATR.....	150
8.1.2.1.	Spectres d'absorption de la SOPC et des porphyrines.....	150
8.1.2.2.	Etude de l'interaction de la SOPC avec les porphyrines	152
8.1.2.3.	Analyse des spectres SOPC- TPP _{mOH₄} à différents rapports molaires... 155	
8.1.2.4.	Analyse des spectres SOPC-TPP(<i>p</i> DEGMan) ₃ à différents rapports molaires.....	157
8.1.2.5.	Comparaison des aires	158

8.2. Analyse des modèles lipidiques en présence des porphyrines par microspectroscopie IR	160
8.2.1. Analyse de l'homogénéité des préparations	160
8.2.2. Analyse de SOPC-TPP mOH_4 ou SOPC-TPP($pDEGMan$) ₃ (10 :1) par microspectroscopie IR.....	161
8.2.3. Etude de l'effet de l'hydratation	164
8.2.4. Comparaison des modèles lipidiques	166
8.2.5. Modèles lipidiques mimant les membranes plasmique et mitochondriale – porphyrines.....	169
8.3. Discussion de l'étude d'interaction porphyrines-lipides synthétiques.....	173
8.4. Analyse, par microspectroscopie infrarouge couplée au Synchrotron, des cellules traitées par les porphyrines.	175
8.4.1. Correction de l'effet Mie	176
8.4.2. Analyse multivariée des données spectrales des cellules	177
8.4.2.1. Discrimination entre les lignées cellulaires :	177
8.4.2.2. Cellules Y79	184
8.4.2.3. Cellules WERI-Rb1	186
8.4.2.4. Cellules ARPE-19.....	187
8.4.2.5. Comparaison de toutes les lignées traitées et non traitées	188
8.4.3. Discussion.....	188
9. Références bibliographiques :	191
10. Annexes	194
Discussion générale	199
Conclusion générale et perspectives.....	210

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La Photothérapie dynamique (PDT) est considérée une technique prometteuse de traitement de certains cancers. De nos jours, la PDT trouve une large application, principalement en dermatologie pour le traitement de pré-cancers et certains cancers de la peau. Elle est aussi appliquée dans le traitement d'autres types de tumeurs comme celles de l'œsophage, du poumon, de la vessie, de la prostate... ainsi que dans celui d'autres tumeurs non malignes accessibles à la lumière.

La PDT repose sur l'effet d'une substance photosensibilisante accumulée préférentiellement dans les cellules cancéreuses et qui est capable d'absorber la lumière à une longueur d'onde précise, induisant ainsi une succession de réactions chimiques provoquant la mort cellulaire. Cette technique se présente comme une alternative à certaines thérapies mutagènes telles que la chimiothérapie ou la radiothérapie. L'un des défis majeurs de la PDT est de trouver une substance photoactivable, par exemple un dérivé de porphyrine, capable de pénétrer dans les cellules cancéreuses à une dose faible, mais suffisante pour exercer son effet cytotoxique. Le mécanisme d'internalisation cellulaire est crucial. Il est donc intéressant de caractériser l'interaction de la porphyrine avec la membrane cellulaire afin de mieux évaluer son mécanisme d'action et son efficacité en PDT.

C'est dans ce contexte que se situe le travail décrit ci-après. L'objectif de cette thèse est d'étudier l'interaction de porphyrines avec des lipides membranaires en utilisant plusieurs modèles et techniques complémentaires, permettant de localiser cette interaction au niveau des phospholipides et des composants des cellules de rétinoblastome. Le but ultime est de proposer un ou plusieurs modèles lipidiques biomimétiques. Ces modèles seront construits à partir de l'analyse du lipidome des cellules de rétinoblastome et pourront servir au criblage de nouvelles porphyrines.

Ce manuscrit est divisé en trois chapitres. Le premier chapitre, présenté sous forme d'une publication, décrit l'analyse de l'interaction de 26 dérivés de tétraphényl-porphyrines (TPP) avec une colonne chromatographique « membrano-mimétique » IAM en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Afin de pouvoir étudier finement cette interaction, nous avons modélisé le système de la colonne IAM par d'autres colonnes permettant de mettre en évidence les interactions apolaires et polaires séparément.

Dans le deuxième chapitre, nous analysons le profil lipidomique (des phospholipides en particulier) d'une lignée cellulaire de rétinoblastome de référence (Y79) afin de bâtir et optimiser un modèle de membrane en monocouche ayant les mêmes propriétés de compressibilité que les mélanges de lipides cellulaires. L'objectif est de rendre davantage biomimétique le modèle proposé par Ali Makky (thèse 2010) qui s'appuyait sur des données anciennes de la littérature (Yorek et al. 1985). Le lipidome des cellules de rétinoblastome est analysé et comparé à celui des cellules de l'épithélium rétinien (ARPE-19).

Dans le troisième chapitre de cette thèse, nous avons utilisé une méthode analytique spectroscopique pour localiser l'interaction de deux porphyrines avec les protéines et les lipides de trois lignées cellulaires, dont deux de rétinoblastome. Cette étude a été précédée par des mesures de DSC et des analyses par ATR-FTIR sur des lipides simples ou des modèles lipidiques afin de faciliter l'interprétation des résultats sur les cellules, mais aussi étudier plus spécifiquement par infrarouge notamment, l'interaction TPP- lipides.

ETAT DE L'ART

1. Les photosensibilisateurs (PSr) pour la photothérapie dynamique (PDT).

L'effet thérapeutique de la lumière a été exploité depuis l'antiquité. En effet, la lumière solaire était utilisée pour le traitement de maladies comme le vitiligo, le psoriasis, le rachitisme ou le cancer de la peau (Spikes 1985). Les premiers essais de la PDT remontent à l'année 1905, quand le groupe de Tappeiner a utilisé des sondes (colorées) telles que l'éosine et la fluorescéine pour le traitement de certaines maladies de la peau. Le PSr le plus connu est l'hématoporphyrine (Hp) qui a été produite pour la première fois en 1841 sous forme impure. Quelques années plus tard, le spectre de cette substance rouge a été décrit par Thudichum (Moan and Peng 2003). Elle doit son nom à Hoppe-Seyler (1871). Ses dérivés, moins hydrophobes, ont été ensuite privilégiés. En 1924, Policard a observé pour la première fois la fluorescence de la porphyrine dans des tumeurs expérimentales, mais il a fallu attendre quelques années pour réaliser que cette fluorescence n'était pas due à des bactéries. L'accumulation effective de la porphyrine dans des tumeurs a été étudiée pour la première fois en 1942 par Auler et Banzer. Les études se sont ensuite succédées et ont conduit à la synthèse de dérivés de l'hématoporphyrine, (HpD) ayant une meilleure capacité d'accumulation dans les tumeurs que l'Hp impure. Ces dérivés ont été utilisés plus tard par Linson pour des études cliniques à visée thérapeutique. Analysées par HPLC et par fluorescence, ces HpD sont des mélanges complexes de *monomères* fluorescents qui ne s'accumulent pas dans la tumeur, de *dimères* qui, eux, s'y accumulent, mais sont moins fluorescents et d'un dernier groupe d'*agrégats* non fluorescents mais avec de meilleures propriétés pour se localiser dans les tumeurs. Dougherty et ses collaborateurs ont légèrement purifié les HpD en éliminant les monomères et ont ainsi obtenu le Photofrin[®]. Etudié chez des patients, ce nouveau dérivé a causé une nécrose souvent complète des cellules tumorales (Moan and Peng 2003). Photofrin[®] est approuvé pour la PDT et est le PSr le plus connu et le plus utilisé cliniquement de nos jours.

En raison de l'hydrophobicité de Hp, de sa complexité, de la faible pureté de ses dérivés, ainsi que de son absorption maximale à 630 nm ne permettant qu'une faible pénétration de la lumière dans le tissu, des PSr de deuxième génération ont été synthétisés comme la tetraphenyl porphine sulfonate (TPPS), les phtalocyanines ou la tetra (meta-hydroxyphenyl) chlorin (*m*-THPC). En 1987, Malik et ses collaborateurs ont introduit un nouveau concept de

PDT reposant sur la production de protoporphyrine IX (PpIX) endogène, à partir d'acide aminolévulinique exogène (Konan et al., 2002). Les PSr de cette génération étaient de bons candidats pour la PDT. Ils étaient purs, mieux caractérisés avec un large spectre d'absorption entre 650-800 et capables de générer un taux élevé d'oxygène singulet. En revanche, l'hydrophobicité élevée de la plupart de ces molécules, ainsi que leur faible sélectivité tumorale, constituait un frein à leur utilisation. Il a été suggéré qu'un caractère hydrophile soit nécessaire pour que le PSr traverse la membrane lipidique et s'accumule dans la cellule. Ceci a été à l'origine du développement d'une troisième génération de PSr. De multiples systèmes sont développés : des dispersions lipidiques, des liposomes, des nanoparticules, des PSr conjugués à des polymères, des lipoprotéines ou des anticorps monoclonaux (Konan et al., 2002). Cette nouvelle génération fonctionne sur le principe du ciblage passif ou actif.

2. Principe de la PDT

Quel que soit le PSr utilisé, une fois internalisé et accumulé dans les cellules, il est exposé à la lumière d'un laser. Suite à l'absorption de cette lumière, le PSr à l'état singulet ^1PSr au repos, est activé et passe à un état singulet excité $^1\text{PSr}^*$ instable. Pour revenir à l'état d'équilibre, le PSr pourrait céder de l'énergie en émettant de la fluorescence, ce qui peut être cliniquement exploité pour la photodétection. Cependant, pour avoir un effet photo thérapeutique, le PSr doit passer par un état intermédiaire triplet $^3\text{PSr}^*$. C'est à cet état que le PSr interagit avec les éléments cellulaires par deux mécanismes nécessitant la présence d'oxygène dans les tissus cibles (figure 0.01):

- Un mécanisme direct dans lequel le PSr excité interagit directement avec un substrat par transfert de protons ou électrons produisant ainsi des radicaux libres toxiques avant d'être dégradé ;
- Un mécanisme indirect dans lequel l'excès d'énergie est transféré directement à l'oxygène formant ainsi de l'oxygène singulet ; cette forme d'oxygène est très destructive grâce à sa capacité d'oxyder les acides aminés, les acides nucléiques et les chaînes lipidiques des membranes cellulaires. Dans ce deuxième mécanisme, le PSr revient à son état d'équilibre et est susceptible d'être à nouveau excité par la lumière (Triesscheijn et al., 2006).

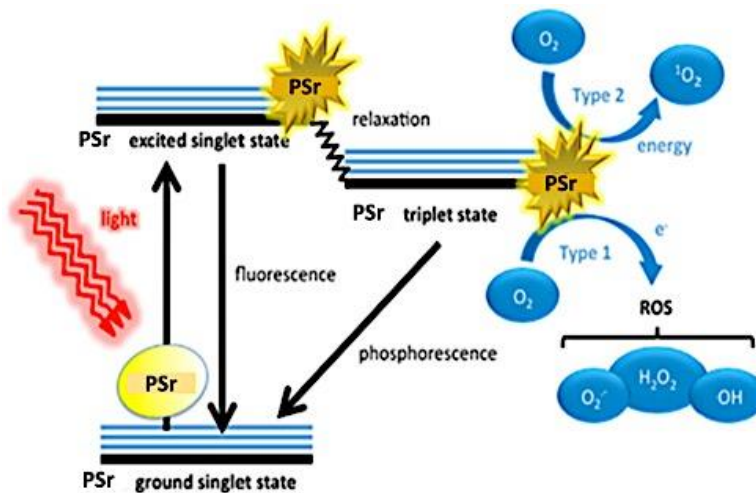


Figure 0.01 : Principe de la PDT, d'après (Dai et al., 2012)

Un photosensibilisateur optimal devrait posséder certaines caractéristiques (Allison et al., 2010), (Agostinis et al., 2011):

- Un caractère amphiphile permettant une administration systémique et facilitant le transport du PSr vers sa cible à travers la circulation sanguine.
- Une sélectivité élevée pour les tumeurs.
- Une non-toxicité en l'absence de toute activation par la lumière.
- Une fluorescence permettant de mieux le localiser après accumulation dans les tissus.
- Une forte absorption spectrale entre 620 - 800 nm (dans le rouge) afin de permettre une pénétration tissulaire optimale (figure 0.02)
- Un rendement quantique d'oxygène singulet élevé. La capacité à engendrer une réaction photodynamique de type II est devenu un critère clinique.

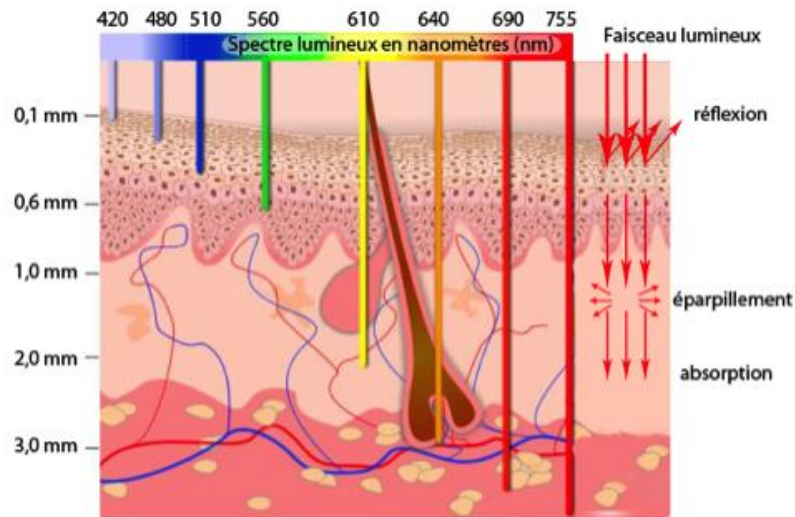


Figure 0.02 : Propagation de la lumière à différentes longueurs d'ondes dans les tissus.

Il est également important qu'un photosensibilisateur soit disponible sur le marché et accessible aux patients. Actuellement, seules quelques molécules sont cliniquement approuvées et utilisées en tant que PSr pour la PDT. D'autres molécules sont en phase d'essais pré-cliniques Tableau 0.01

- Le Photofrin® (porfimer sodium) est le premier médicament approuvé pour la PDT en 1993 pour le traitement du cancer de la vessie.
- L'acide aminolévulinique (Levulan®) est indiqué chez les patients présentant des cas de kératoses actiniques.
- L'aminolévulinate de méthyle (Metvix®), approuvé en Canada, est utilisé pour le traitement des kératoses actiniques fines et non pigmentées et des carcinomes basocellulaires superficiels primitifs du visage et du cuir chevelu.
- Le meso-tetra-hydroxy- phenyl-chlorin (Foscan®) est indiqué dans le traitement palliatif des carcinomes épidermoïdes avancés de la tête et du cou, après échec des traitements antérieurs, ou chez les patients qui ne peuvent pas être traités par radiothérapie, chirurgie ou chimiothérapie systémique.

Tableau 0.01 : liste des principaux photosensibilisateurs approuvés ou en phase d'essais (Agostinis et al., 2011).

PHOTOSENSITIZER	STRUCTURE	WAVELENGTH, nm	APPROVED	TRIALS	CANCER TYPES
Porfimer sodium (Photofrin) (HPD)	Porphyrin	630	Worldwide		Lung, esophagus, bile duct, bladder, brain, ovarian
ALA	Porphyrin precursor	635	Worldwide		Skin, bladder, brain, esophagus
ALA esters	Porphyrin precursor	635	Europe		Skin, bladder
Temoporfin (Foscan) (mTHPC)	Chlorine	652	Europe	United States	Head and neck, lung, brain, skin, bile duct
Verteporfin	Chlorine	690	Worldwide (AMD)	United Kingdom	Ophthalmic, pancreatic, skin
HPPH	Chlorin	665		United States	Head and neck, esophagus, lung
SnEt2 (Purlytin)	Chlorin	660		United States	Skin, breast
Talaporfin (LS11, MACE, NPe6)	Chlorin	660		United States	Liver, colon, brain
Ce6-PVP (Fotolon), Ce6 derivatives (Radachlorin, Photodithazine)	Chlorin	660		Belarus, Russia	Nasopharyngeal, sarcoma, brain
Silicon phthalocyanine (Pc4)	Phthalocyanine	675		United States	Cutaneous T-cell lymphoma
Padoporfin (TOOKAD)	Bacteriochlorin	762		United States	Prostate
Motexafin lutetium (Lutex)	Texaphyrin	732		United States	Breast

3. La bio-distribution du PSr et le déroulement de la PDT :

Injecté dans le sang, le PSr est transporté jusqu'aux cellules tumorales. Cette bio-distribution est réalisée grâce aux lipoprotéines plasmatiques LDL qui se lient préférentiellement au photosensibilisateur (Richter et al., 1993). Les lipoprotéines jouent aussi un rôle même si le PSr est injecté sous forme vectorisée. Sous l'effet de la densité élevée des lipoprotéines (HDL) la durée de vie d'un liposome dans le plasma est de quelques minutes. Sa structure est déstabilisée (surtout si la concentration du cholestérol est faible), ce qui augmente sa perméabilité et facilite le relargage du PSr et sa fixation aux LDL qui vont le mener jusqu'aux tumeurs. Il a été démontré une surexpression des récepteurs LDL au niveau des tumeurs, ce qui suggère que ceux-ci jouent un rôle dans la reconnaissance spécifique PSr-cellules tumorales. Des études ont prouvé qu'un PSr mélangé à des lipoprotéines LDL avant son administration augmente l'efficacité de la PDT (Konan et al., 2002). Outre cette administration combinée avec les LDL, d'autres stratégies sont basées sur le couplage du PSr avec des ligands (comme des anti-corps par exemple) pour cibler certains récepteurs ou antigènes surexprimés à la surface des cellules tumorales (Denis & Hamblin, 2014). Parmi ces récepteurs, on trouve les lectines, qui reconnaissent spécifiquement des sucres (Naeem et al., 2007). A ce jour, quatre lectines extracellulaires (C-type, R-type, I-type or et S-type appelées

aussi Galectines), et quatre lectines intracellulaires (P-type, M-type, L-type et la famille des Calnexines) sont connues. Les lectines de type C sont les plus répandues. Elles sont divisées en deux familles selon le type de sucre reconnu : lectine spécifique du mannose et du fucose (MRC1, MRC2 or DC- SIGN) ou spécifique du galactose/*N*-acetylgalactosamine (MGL) (Gupta et al., 2009). Le ligand passe à l'intérieur de la cellule par endocytose, puis la lectine est recyclée à la surface.

Quel que soit le mode de délivrance, une fois le PSr parvenu au niveau des cellules tumorales et excité par la lumière, il induit la nécrose et/ou l'apoptose tumorale. Tout dépend de la dose du PSr, de sa localisation dans la tumeur et de la concentration de l'oxygène dans le milieu environnant. La PDT affecte aussi les vaisseaux sanguins du tissu tumoral. En effet, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), altèrent la vascularisation en privant les tissus d'oxygène et de nutriments. Cet effet vasculaire provoque une inflammation qui stimule à son tour le système immunitaire ; il s'ensuit une réaction immunitaire faisant intervenir principalement les leucocytes (des neutrophiles et des cellules dendritiques) (Castano, et al 2006).

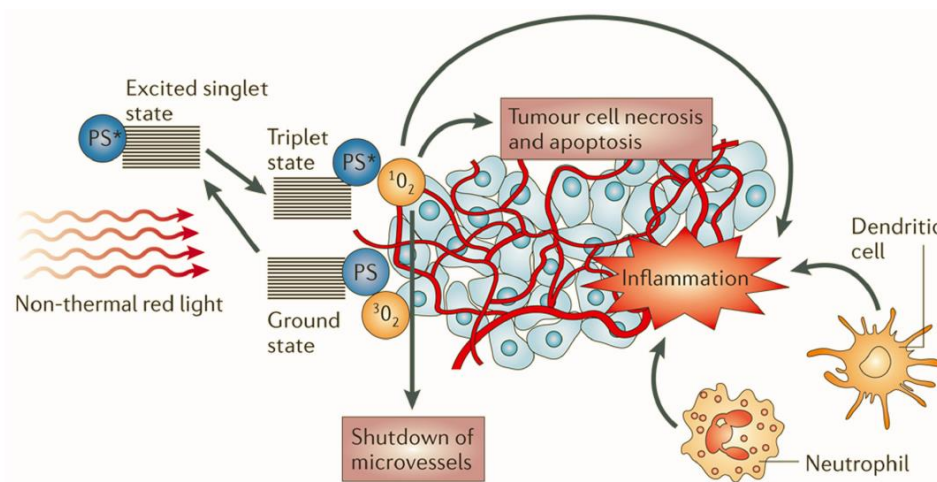


Figure 0.03 : Effets de la PDT : nécrose et/ou apoptose tumorale, dommages vasculaires, réaction inflammatoire et stimulation du système immunitaire.

4. La PDT est-elle une alternative pour le rétinoblastome ?

Bien que la PDT ne soit pas mutagène, elle n'est appliquée que dans le traitement d'un nombre restreint de cancers. Pour les maladies oculaires, elle est pratiquée dans le cas de la DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age) depuis les années 2000. Le rétinoblastome est une forme de tumeur oculaire affectant 1/20 000 enfants à la naissance avec une prévalence de 3-4% de l'ensemble des tumeurs (Parkin et al., 1988). Il se développe dans les 5 premières années de la vie et peut être uni- ou bilatéral. Il se manifeste par la présence d'une leucocorie (un reflet blanchâtre de la pupille) au niveau de la rétine. Dans les pays en développement, le taux de mortalité est considéré élevé : faute des moyens de traitement, il atteint jusqu'à 70% dans les pays de l'Afrique (Dimaras et al., 2012). Le rétinoblastome est lié à un gène RB1 situé sur le chromosome 13 (13q14). La tumeur est exprimée si une perte, ou une délétion ou alors une mutation des deux allèles est produite au niveau de ce gène (Mendoza & Grossniklaus, 2015). Cette maladie est d'ores et déjà traitée par la cryothérapie (pour les petites tumeurs de 3mm), par la thermochimiothérapie, la chimiothérapie ou alors la radiothérapie. Dans les cas les plus graves, une intervention chirurgicale « énucléation » est précédée et qui induit l'ablation de l'œil.

Plusieurs études ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité de PSr dans le cas du rétinoblastome. L'hématoporphyrine fut la première molécule étudiée *in vitro* en 1979. L'étude a montré que la mort cellulaire était fonction du temps de l'exposition à la lumière blanche. D'autres molécules ont par la suite été évaluées tels que Photofrin (Winther & Overgaard., 1989), la verteporfin (Stephan et al., 2008), et récemment la tétrahydroporphyrin-tetratosylat (Walther et al., 2014) qui a prouvé sa capacité à ralentir la croissance cellulaire en fonction de la dose et de temps du traitement ; ces travaux ont été validés sur deux lignées cellulaires de rétinoblastome Y79 et/ou WERI-Rb1. Par ailleurs, l'efficacité du PSr a été aussi testée *in vivo* sur des xénogreffes (Aerts et al., 2010; Winther & Overgaard, 1989). Ces travaux ont permis de confirmer l'efficacité de la PDT et de conclure que mis à part la toxicité cellulaire, les vaisseaux sanguins et les tissus normaux adjacents à la tumeur (par exemple la cornée) peuvent aussi être endommagés (Winther & Overgaard, 1989), ce qui est considéré comme une des limites de cette technique. La PDT a été aussi testé chez des enfants et son efficacité a été démontrée pour les tumeurs de petites dimensions. Cependant pour celles qui sont plus étendues, il faudrait combiner la PDT avec un second traitement comme la radiothérapie (Ohnishi et al., 1986). La localisation des PSr dans les cellules de rétinoblastome est encore peu connue. Cependant, grâce à l'imagerie, Schmitt et ses

collaborateurs ont réussi à localiser les dérivés de la porphyrine areneruthenium (II) (un PSr organométallique) accumulés dans le cytoplasme de cellules humaines de mélanomes sous forme de granules autres que les lysosomes (Schmitt et al., 2008).

5. Les porphyrines pour une application dans le traitement du rétinoblastome

En dépit de toutes les recherches décrites plus haut, le rétinoblastome n'est pas encore traité par la PDT. Néanmoins, les recherches se poursuivent afin de trouver le PSr adéquat. L'équipe de Philippe Maillard, nos collaborateurs à l'Institut Curie, ont entrepris depuis plusieurs années une stratégie de développement de PSr ayant comme précurseur la tetraphenyl-porphyrine (TPP). Cette molécule est constituée d'un macrocycle pyrrolique à 22 électrons π , lui conférant une certaine stabilité. Grâce à sa structure tetrapyrrolique, la porphyrine a une longue durée de vie à l'état triplet excité. Afin d'améliorer sa solubilité et sa spécificité, la TPP a été modifiée par glycoconjugaison. Il s'agit de lier par une liaison covalente un ou plusieurs groupements sucres au carbone *meso* du macrocycle. L'intérêt de ceci est double : rendre la porphyrine plus amphiphile et cibler spécifiquement les lectines surexprimées au niveau des cellules tumorales (Ballut et al., 2012). Plusieurs générations de porphyrines glycoconjuguées ont ainsi vu le jour :

- La première génération de porphyrine D-glycoconjuguées diffère par la nature du sucre (glucose, galactose, maltose, glucosamine, fucose), la position de substitution (*ortho*-, *meta* ou *para*-) sur le carbone *meso*, le nombre de sucres (1, 2, 3 ou 4) et la nature des substituants *meso* (phényles, chaînes alkyles, et pentafluorophényles). Les études *in vitro* ont démontré que la phototoxicité de ces molécules varie selon leur structure chimique. A titre d'exemple, un PSr glycoconjugué ayant 3 sucres liés en position *para* des phényles, possède la meilleure activité photosensibilisante. Les caractéristiques pharmacocinétiques de l'une de ces molécules ont été étudiées *in vivo* et il a été démontré une élimination plus rapide des composés glycoconjugués par rapport aux composés non glycoconjugués (Desroches et al., 2006).

- La deuxième génération est caractérisée par l'insertion d'un bras espaceur entre le macrocycle et le sucre, permettant une certaine mobilité au sucre. Le galactose et le mannose ont été utilisés pour cette génération, avec deux espaceurs (monoéthylène glycol MEG et diéthylène glycol DEG). Les études d'évaluation ont permis de conclure quant à la meilleure

photoactivité des PSr avec les espaceurs DEG et de mettre en évidence un transport actif pour les PSr avec mannose (Laville et al., 2006). La TPP-(pDEGMan)₃ est apparue comme une molécule photosensibilisante potentiellement intéressante, avec une IC₅₀ à 0,35µM, seulement.

- La troisième génération été conçue afin d'améliorer l'interaction PSr-lectine et a introduit le concept de l'effet « cluster » par la présence de structures glycodendrimériques. Lee & Lee (1995) ont démontré qu'une structure à effet « cluster » augmentera cette affinité. Ceci consiste à avoir un ligand présentant plusieurs sucres ayant chacun une certaine orientation et un espacement donné. L'augmentation du nombre des unités de sucres permet d'améliorer l'affinité lectine-porphyrine. Toutefois, pour les porphyrines, la forme dendrimérique n'a pas présenté une meilleure photocytoxicité comparée aux composés de la deuxième génération avec mannose. De plus, aucune différence n'a été observée selon que la structure dendrimérique porte ou non des sucres.

Ainsi, à l'issue de ces synthèses, la porphyrine TPP-(pDEGMan)₃ demeure le meilleur PSr (thèse Ballut, 2010).

- La quatrième génération est assez récente. Elle a été développée au cours des cinq dernières années afin de remédier à la faible pénétration de la lumière dans les tissus vivants. En effet, les porphyrines monomériques ont cinq bandes d'absorption à un photon entre 400 et 700 nm et leur absorption est très faible entre 700 et 1300 nm. Pour contourner ceci, les chercheurs ont pensé à utiliser des porphyrines dimériques qui permettent une absorption à deux photons. Une meilleure pénétration du faisceau lumineux est ainsi possible et pourrait être une solution pour augmenter l'efficacité des photosensibilisateurs. Le spectre d'excitation des porphyrines dimériques est étendu jusqu'au proche infrarouge. Les cellules peuvent être irradiées à 760 nm (Hammerer et al., 2014). L'efficacité de ces molécules co-encapsulées avec un anticancéreux (la camptothécine) dans des nanoparticules de silice mésoporeuse greffées de mannoses a été évaluée sur des cellules de rétinoblastome. Les résultats ont démontré une efficacité en PDT et ont été considérés prometteurs, bien que la photoactivité des molécules testées soit deux fois moindre que celle des porphyrines absorbant à un seul photon (Gallud et al., 2013).

6. Evaluation des porphyrines :

Toute porphyrine synthétisée *de novo* est caractérisée par RMN, mais aussi évaluée *in vitro* et *in vivo* afin de déterminer son efficacité pour la PDT. Son mécanisme d'interaction avec une membrane biologique peut-être étudié de manière approfondie à l'aide de modèles membranaires artificiels.

6.1. Les lignées cellulaires de rétinoblastome

6.1.1. Caractéristiques du matériel biologique

Les porphyrines synthétisées sont évaluées *in vitro* en utilisant des lignées de rétinoblastome de référence. Les lignées les plus fréquemment utilisées dans la littérature sont Y79 (ATCC® HTB-18™) et WERI-Rb1(ATCC® HTB-169™). Ce sont les seules lignées commerciales tumorales d'origine humaine provenant de la rétine. Y79 et WERI-Rb1 ont été respectivement établies pour la première fois par Reid en 1974 et McFall en 1977 (Reid et al., 1974 ; McFall et al., 1977). Elles dérivent toutes les deux de la rétine d'un enfant. Des études génétiques ont démontré une délétion partielle du gène Rb1 dans les cellules Y79 et une délétion totale du même gène dans les cellules WERI-Rb1 (Bookstein et al., 1988 ; Choi et al., 1993).

Busch et al. (2014) ont analysé de nombreuses lignées de rétinoblastome ; Ils ont étudié particulièrement la mutation du gène Rb1, la cinétique de croissance des cellules, les niveaux endogènes d'apoptose et le potentiel de formation de colonies, ainsi que les capacités de formation de métastases. Ces auteurs ont confirmé le taux de multiplication rapide des cellules Y79 par rapport à celles de WERI-Rb1 (47h vs 50h) et à celles de toutes les autres lignées étudiées. Leurs résultats justifient l'utilisation courante de la lignée Y79 dans le domaine de recherche du rétinoblastome. Mises en culture, les cellules Y79 et WERI-Rb1 croissent en suspension et présentent une morphologie en grappes multicellulaires. McFall et al. (1978), avait attribué ce type de croissance en grappe à une charge négative très élevée au niveau de la membrane cellulaire. D'autres pensent que c'est un phénomène plus répandu dans les cellules malignes que saines (Green et al., 1979). De petite dimension (10 µm) avec peu de cytoplasme et un large noyau, les cellules tumorales Y79 sont de caractère invasif et métastatique (Green et al., 1979). Les paramètres de croissance de Y79 sont présentés dans le tableau 0.02 (Li et al., 1995).

Les lignées Y79 et WERI-Rb1 ont été utilisées dans notre projet, ainsi qu'une troisième lignée, ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™), qui a servi de contrôle et dérive de l'épithélium pigmentaire rétinale d'un adulte mâle de 19 ans. C'est la seule lignée humaine saine provenant de l'œil qui est commercialisée. Ses cellules sont adhérentes. Ses paramètres de croissance ont été caractérisés par Assanga (2013) (Tableau 0.02)

Tableau 0.02 : Paramètres de croissance des lignées cellulaires Y79 et ARPE-19.

Paramètres	Y79	ARPE-19
	Milieu de culture MEM+ 15% FBS (Li et al., 1995)	Milieu de culture DMEM+ 10% FBS (Assanga, 2013)
Période de latence (Lag)	72 h	72 h
Temps de multiplication	46 h	55-65 h
Taux de croissance μ	0.015 h ⁻¹	0.0070 h ⁻¹
Densité de saturation	10±1.7	

6.1.2. Photocytotoxicité, photoactivité et capture cellulaire

Pour la plupart des porphyrines synthétisées, la concentration inhibitrice 50 (concentration nécessaire pour abaisser de moitié la viabilité cellulaire) sont bien déterminées (Maillard et al., 2007). Les IC₅₀ sont établies à l'obscurité et après irradiation des cellules. Outre la phototoxicité et la photoactivité, le captage cellulaire est aussi un paramètre important pour caractériser la pénétration de la porphyrine. Il peut être évalué en mesurant l'intensité de la fluorescence des cellules par cytométrie de flux. D'autres expériences peuvent aussi être réalisées comme la détermination de la localisation subcellulaire par imagerie de fluorescence ou l'évaluation de l'affinité pour certains récepteurs à sucre (Laville et al., 2006).

6.2. Les modèles murins

Des souris affectées du rétinoblastome sont développées à l'Institut Curie et servent pour les études *in vivo*. Une tumeur humaine (issue d'enfants malades) est greffée chez des souris Nude. Trois types de xénogreffes sont actuellement utilisées : Rb 111, Rb 200 et Rb 102 (Thomas et al., 2015). Huit semaines après l'implantation de la tumeur, cette dernière est traitée par le photosensibilisateur à étudier. Le traitement consiste en une injection du PSr à une dose donnée, suivie d'une exposition à la lumière (514 nm) 10 minutes plus tard. Cependant, ce protocole n'est pas suffisant pour une pénétration de la TPP dans les cellules et le traitement est seulement anti-vasculaire : il ne touche que les vaisseaux sanguins autour de la tumeur où le PSr s'est accumulé. Afin d'assurer une pénétration cellulaire du PSr, un second protocole est proposé (Poyer et al., 2012; Thomas et al., 2015). Il consiste en une double injection du PSr avec un intervalle de 3h entre les deux doses, avant une exposition à la lumière 10 minutes après la 2^e injection. La première dose permet d'obtenir un effet cytotoxique (PSr dans la cellule) et la seconde dose, un effet anti-vasculaire. L'évaluation de l'efficacité de la PDT est vérifiée par diverses techniques sur des sections de la tumeur.

6.3. Modèles membranaires et étude de leurs interactions avec les PSr

Le modèle membranaire est un système simplifié de la membrane biologique. Il permet la caractérisation physico-chimique d'une membrane lipidique et l'analyse de son interaction avec des molécules exogènes, comme les photosensibilisateurs, par exemple. Un modèle membranaire est formé par une bicouche lipidique artificielle renfermant ou pas des protéines. Les avantages de tels systèmes résident dans la possibilité de modification de la composition lipidique, la modulation de la géométrie et de la taille (dans certains systèmes) et le contrôle de son environnement (température, pH...). Ces systèmes ont été développés afin de mieux appréhender les systèmes biologiques complexes (Eeman & Deleu, 2010).

Il existe plusieurs types de modèles : monocouche, liposomes ou bicouches planes supportées ou suspendues (Tableau 0.03). Selon le type de modèle, plusieurs techniques ont été développées et apportent une bonne compréhension des systèmes lipidiques.

Tableau 0.03 : techniques d'études des différents systèmes de modèles membranaires (Bourgau & Couvreur, 2014)

Model membrane	Main techniques of study
<i>Langmuir monolayers at air-water interface</i>	
Bidimensional systems with planar geometry	Surface pressure-area isotherms
Ideally smooth, uncorrugated, substrate	Brewster angle microscopy
Temperature and surface pressure controlled	Fluorescence microscopy
Ion content and pH of the subphase controlled	X-ray or neutron reflectivity, grazing-incidence X-ray or neutron scattering
<i>Liposomes</i>	
Giant unilamellar vesicles (GUVs): geometry and dimensions close to that of cells	Scattering techniques: quasi-elastic light scattering, small angle X-ray (or neutron) scattering, wide angle X-ray scattering
Temperature controlled	Cryo-transmission electron microscopy, fluorescence microscopy
Ion content and pH of the aqueous phase controlled	Spectroscopic techniques: UV-visible, fluorescence, Raman, NMR... Differential scanning calorimetry (DSC)
<i>Supported monolayers or bilayers</i>	
Stability and well defined geometry of the membrane (planar or spherical for bilayers)	Atomic force microscopy (AFM), fluorescence microscopy
Asymmetric bilayers possible	X-ray or neutron reflectivity, grazing-incidence X-ray or neutron scattering
Stacks of parallel bilayers possible	
Ion content and pH of the aqueous phase controlled	Quartz crystal microbalance (QCM-D), surface plasmon resonance (SPR), UV-vis sum-frequency generation (SFG), second harmonic generation (SHG)

Certains systèmes ont été utilisés dans des travaux antérieurs afin de mettre en évidence des interactions spécifiques et non spécifiques des porphyrines.

Les travaux réalisés dans le cadre de la thèse d'Ali Makky (2010) se sont concentrés sur l'étude de l'interaction spécifique porphyrine-récepteur en utilisant un modèle membranaire (Makky et al., 2010a ; Makky et al., 2011). Ce modèle biomimétique composé de phospholipides, cholestérol et d'une lectine, la concanavaleine A (spécifique au mannose), a été construit sous forme de bicouche plane et de liposomes, puis mis en présence de porphyrines dendrimériques portant des résidus mannose. Les porphyrines glycodendrimériques incorporées dans la membrane de liposomes ont été capables d'interagir avec la lectine (Ballut et al. 2009 ; Makky et al. 2010a), tandis que ceux portant une porphyrine simplement dendrimérique ne l'ont pas été. L'interaction porphyrine-lectine a été mise en évidence par des mesures sur microbalance à cristal de quartz (QCM-D). La microbalance contient un capteur constitué d'une lame de quartz recouverte d'une couche d'or ou de silicium. Soumise à un courant, la lame de quartz vibre avec une fréquence de résonance connue. La mesure de la fréquence de résonance est reliée à la masse de substance qui adhère au capteur de la microbalance. La mesure de la dissipation d'énergie après arrêt de la stimulation électrique fournit des informations sur les propriétés viscoélastiques de la couche adsorbée. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus lorsque la bicouche artificielle

a été remplacée par des cellules de rétinoblastome (Makky et al. 2012). Cette méthode a permis de discriminer des porphyrines dendrimériques selon la présence ou l'absence de sucres et en fonction de la longueur de l'espaceur entre le sucre et la branche dendrimère.

L'interaction non spécifique modèles artificiel-porphyrine a aussi été évaluée (Makky et al., 2010 b). Dans ces travaux, trois modèles membranaires différant par le ratio molaire du cholestérol ont été proposés et étudiés en présence de porphyrines. Il a été démontré que la pénétration des porphyrines est impactée par la structure chimique des molécules, qu'elle est limitée par la pression latérale de la bicouche et que le cholestérol, même à forte concentration a peu d'effet sur cette pénétration. Ces travaux témoignent de la capacité potentielle des porphyrines à être internalisées non seulement par transport facilité à travers la membrane cellulaire, mais aussi par diffusion passive.

Dans la continuité de ces travaux, une optimisation du modèle membranaire à partir de l'analyse du lipidome des cellules de Y79 a été initiée par Katia Daghildjian, (thèse 2013). Elle a proposé un nouveau modèle artificiel, composé des mêmes classes lipidiques, mais avec un nombre des carbones et d'insaturations plus élevé pour le lipide majoritaire, une phosphatidylcholine PC[18:0/22:6], ce qui a permis d'améliorer la compressibilité du modèle artificiel. Par ailleurs, elle a démontré que toutes les porphyrines glycoconjuguées ne sont pas forcément internalisées par transport facilité par le récepteur à mannose. Certaines, comme la TPP(DegMannose)₃, ne semblent passer que par diffusion passive comme les porphyrines non glycoconjuguées.

Dans la continuité de ce qui a précédé, et dans cette présente thèse, l'objectif est d'étudier l'interaction porphyrine-membrane en utilisant des outils analytiques et physico-chimiques et des modèles plus ou moins complexes de la membrane cellulaire. Nous avons utilisé une membrane artificielle chromatographique (un seul lipide, décomposé en groupements polaires et apolaires), un modèle lipidique artificiel à 4 lipides en monocouche, et des cellules pour étudier l'interaction porphyrines/membrane. Le modèle lipidique a été optimisé en tenant compte des résultats d'une analyse du lipidome de la membrane plasmique et des mitochondries des cellules de rétinoblastome Y79. Cette même lignée ainsi que celles de ARPE-19 et WERI-Rb1 ont été utilisées pour l'étude de l'interaction porphyrine-cellule par microspectroscopie infrarouge.

7. Références Bibliographiques

- Aerts I., Leuraud P., Blais J., Pouliquen A.L., Maillard P., Houdayer C., Couturier J., Sastre-Garau X., Grierson D., Doz F., Poupon M.F., In vivo efficacy of photodynamic therapy in three new xenograft models of human retinoblastoma. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 7 (2010) 275–283.
- Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn SM, Hamblin M.R, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson B.C., Golab J., Photodynamic Therapy of Cancer : An Update. *CA Cancer J. Clin.* 61 (2011) 250–281.
- Allison R.R., Sibata C.H., Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 7 (2010) 61–75.
- Assanga I., Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res.* 4 (2013) 60–70.
- Ballut S., Makky A., Chauvin B., Michel J.P., Kasselouri A., Maillard P., Rosilio V., Tumor targeting in photodynamic therapy. From glycoconjugated photosensitizers to glycodendrimeric one. Concept, design and properties. *Org. Biomol. Chem.* 10 (2012) 4485–4495.
- Bookstein R., Lee E, To H., Young L., Sery T.W., Hayes R.C., Friedmann.T., Lee W., Human retinoblastoma susceptibility gene: Genomic organization and analysis of heterozygous intragenic deletion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(1988) 2210–2214.
- Bourgaux C., Couvreur P., Interactions of anticancer drugs with biomembranes: What can we learn from model membranes?. *J. Control. Release* 190 (2014) 127–138.
- Busch M., Philippeit C., Weise A., Dünker N., Re-characterization of established human retinoblastoma cell lines. *Histochem. Cell Biol.* 143 (2015) 325-338.
- Castano A., Mroz P., Hamblin M., Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* 6(2006) 535–545.
- Dai T., Fuchs B.B., Coleman J.J., Prates R.A., Astrakas C., St. Denis T.G., Ribeiro M.S, Mylonakis E, Hamblin M.R., Tegos G. P., Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front. Microbiol.* 3 (2012) 1–16.
- Daghildjian K. 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).

- Denis T., Hamblin M.R., Synthesis, bioanalysis and biodistribution of photosensitizer conjugates for photodynamic therapy. *Bioanalysis* 5 (2013) 1099–1114.
- Desroches M.C., Bautista-Sanchez A., Lamotte C., Labeque B., Auchère D., Farinotti, R., Maillard P., Grierson D.S., Prognon P., Kasselouri A., Pharmacokinetics of a tri-glucocojugated 5,10,15-(meta)-trihydroxyphenyl-20-phenyl porphyrin photosensitizer for PDT. A single dose study in the rat. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 85 (2006) 56–64.
- Dimaras H., Kimani K., Dimba E.A.O., Gronsdahl P., White A., Chan H.S.L., Gallie B.L., Retinoblastoma. *Lancet* 379 (2012) 1436–1446.
- Gallud A., Warther D., Maynadier M., Sefta M., Poyer F., Thomas C.D., Rouxel C., Mongin O., Blanchard-Desce M., Morère A., Raehm L., Maillard P., Durand J.O., Garcia M., Gary-Bobo M., Identification of MRC2 and CD209 receptors as targets for photodynamic therapy of retinoblastoma using mesoporous silica nanoparticles. *RSC Adv.* 5 (2015) 75167–75172.
- Gallud A., Functionalized Nanoparticles for Drug Delivery, One- and Two-photon Photodynamic Therapy as a Promising Treatment of Retinoblastoma. *J.Clin. Exp. Ophthalmol.* 4 (2013) doi:10.4172/2155-9570.1000288.
- Green A. L.W., Meek E.S., White D.W., Stevens R.H., Ackerman L.D., Judisch G.F., Patil S. R., Retinoblastoma Y79 cell line: a study of membrane structures. *Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* 211 (1979) 279–287.
- Gupta A., Gupta R.K., Gupta G.S., Targeting cells for drug and gene delivery: Emerging applications of mannans and mannan binding lectins. *J. Sci.Ind. Res.* 68(6) (2009) 465–483.
- Hammerer F., Garcia G., Chen S., Poyer F., Achelle S., Fiorini-Debuisschert C., Teulade-Fichou M.P., Maillard P., Synthesis and characterization of glycoconjugated porphyrin triphenylamine hybrids for targeted two-photon photodynamic therapy. *J. Org. Chem.* 79 (2014) 1406–1417.
- Konan Y. N., Gurny R., Allemann E., State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 66 (2002) 89–106.
- Laville I., Pigaglio S., Blais J.C., Doz F., Loock B., Maillard P., Grierson D.S., Blais J., Photodynamic efficiency of diethylene glycol-linked glycoconjugated porphyrins in human retinoblastoma cells. *J. Med. Chem.* 49 (2006) 2558–2567.
- Lee Y.C., Lee R.T., Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.* 28 (1995) 321-327.
- Li A., Lane W.S., Johnson L.V., Chader G.J., Tombran-Tink J., Neuron-Specific Enolase : Factor in the Retinal. *J.Neurosci.* 15 (1995) 385-393.

- Eeman M., Deleu M., From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 14(2010) 719–736.
- Makky A., Michel J.P., Kasselouri A., Briand E., Maillard P., 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 (2010a) 12761–12768.
- Makky A., Michel J.P., Kasselouri A., Briand E., Maillard P., Rosilio V., Effect of cholesterol and sugar on the penetration of glycodendrimeric phenylporphyrins into biomimetic models of retinoblastoma cells membranes. *Langmuir* 26 (2010b) 11145–11156.
- 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(2011) 656–666.
- Maillard P., Looock 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 Photodyn Ther.* 4, (2007) 261–268.
- McFall R.C., Sery T.W., Makadon M., Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma. *Cancer Res.* 37(1977)1003–1010.
- Mendoza P.R., Grossniklaus H.E., The Biology of Retinoblastoma. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 134 (2015) 503-516
- Moan J., Peng Q., An outline of the hundred year history of PDT. *Anticancer Res.* 23 (2003) 3561–3600.
- Naeem A., Saleemuddin M., Khan R.H., Glycoprotein targeting and other applications of lectins in biotechnology. *Curr. Protein Pept. Sci.* 8 (2007) 261–271.
- Ohnishi Y., Yamana Y., Minei M., Photoradiation therapy using argon laser and a hematoporphyrin derivative for retinoblastoma a preliminary report. *Jpn. J. Ophthalmol.* 30(1986) 409–419
- Parkin D.M., Stiller C A., Draper G.J., Bieber C.A., The international incidence of childhood cancer. *Int.J.Cancer* 42 (1988) 511–520.
- Poyer F., Thomas C.D., Garcia G., Croisy A., Carrez D., Maillard P., Lupu M., Mispelter J., PDT induced bystander effect on human xenografted colorectal tumors as evidenced by sodium MRI. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 9 (2012) 303–309.
- Reid T.W., Albert D.M., Rabson A.S., Russell P., Craft J., Chu E.W., Tralka T.S., Wilcox J.L., Characteristics of an established cell Line of retinoblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 53(1974) 347-360.

- Richter A.M., Waterfield E., Jain A.K., Canaan A.J., Allison B.A., Levy J.G., Benzoporphyrin Derivative Monoacid Ring A (Bpd), To Tumor Tissue In A Mouse Tumor Model. *Photochem. Photobiol.* 57(1993)1000–1006.
- Schmitt F., Govindaswamy P., Süß-Fink G., Ang W.H., Dyson P.J., Juillerat-Jeanneret L., Therrien B., Ruthenium porphyrin compounds for photodynamic therapy of cancer. *J. Med.Chem.* 51 (2008) 1811–1816.
- Spikes J.D., The historical development of ideas on applications of photosensitised reactions in health sciences., *Primary Photoprocesses in Biology and Medicine*, Plenum Press, New York. (1985) 209-227.
- Stephan H., Boeloeni R., Eggert A., Bornfeld N., Schueler A., Photodynamic therapy in retinoblastoma: effects of verteporfin on retinoblastoma cell lines. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49(2008) 3158–63.
- Thomas C.D., Poyer F., Maillard P., Chauvin B., Lupu M., Mispelter J., Cellular density, a major factor involved in PDT cytotoxic responses: Study on three different lines of human retinoblastoma grafted on nude mice. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 12 (2015) 267–275.
- Triesscheijn M., Baas P., Schellens J. H. M., Stewart F.A., Photodynamic Therapy in Oncology. *Oncologist* 11 (2006) 1034–1044.
- Walther J., Schastak S., Dukic-Stefanovic S., Wiedemann P., Neuhaus J., Claudepierre T., Efficient photodynamic therapy on human retinoblastoma cell lines. *PLoS ONE* 9 (2014) 1–12.
- Winther J., Overgaard J., Photodynamic therapy of experimental intraocular retinoblastomas—dose-response relationships to light energy and photofrin II. *Acta Ophthalmol.* 67 (1989) 44–50.

CHAPITRE 1 : ANALYSE DE L'INTERACTION PORPHYRINE-IAM PAR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) est une technique analytique classique. Elle a été largement utilisée pour la séparation de composés, leur purification, ou encore des études d'interaction ou d'affinité...

La HPLC trouve jusqu'aujourd'hui un large spectre d'applications grâce au développement de différents types de phases stationnaires, avantageuses pour l'analyse de mélanges de plus en plus complexes. Parmi les toutes dernières colonnes développées et étudiées, on peut citer la membrane d'affinité mitochondriale décrite par Habicht et coll. en 2015. Les auteurs ont fixé des mitochondries cellulaires à un support et ont ainsi étudié l'interaction de substances avec des protéines exprimées à membranes interne ou externe des mitochondries. Le support utilisé est la membrane artificielle mimétique IAM (Immobilized Artificial Membrane). Le concept de la colonne IAM est apparu dans les années 80 ; L'idée était de fixer des composés membranaires afin de mimer les cellules et plus spécifiquement la bicouche lipidique membranaire. Les toutes premières colonnes étaient greffées de lécithine. Elles ont été conçues par l'équipe de Pidgeon (Pidgeon & Venkataram, 1989). Depuis, ce type de colonne a connu plusieurs modifications et applications dans la recherche biomédicale : ciblage des médicaments, purification des échantillons biologiques, études de l'interaction protéines-lipides, etc.

Dans cette thèse, nous avons choisi la colonne IAM, mais aussi quatre autres colonnes chromatographiques, afin de déterminer les facteurs liés à la polarité et la structure de 26 porphyrines glycoconjuguées ou non, sur leur interaction avec un modèle analytique simple de colonne chromatographique greffée de lipides mimant la membrane cellulaire. Ce travail a fait l'objet d'un article intitulé : Lipophilicity of porphyrins and their retention in IAM, C8-C18 and HILIC chromatographic systems, Essaid D. et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 114 (2015) 227-240.

Lipophilicity of porphyrins and their retention in IAM, C8-C18 and HILIC chromatographic systems

D. ESSAID^a, P. CHAMINADE^a, Ph. MAILLARD^{b,c}, A. KASSELOURI^a

^a Lipides, Systèmes Analytiques et Biologiques, ex EA4041, Faculté de Pharmacie, Univ. Paris-Sud, 92296 Châtenay Malabry Cedex, France

^b Institut Curie, Centre de Recherche, Centre Universitaire, Univ. Paris-Sud, F-91405 Orsay, France

^c CNRS, INSERM, UMR 9187-U 1196, Centre Universitaire, Univ. Paris-Sud, F-91405 Orsay, France

TEL : +(33) 1.46.83.5476, E.mail : donia.essaid@u-psud.fr

Abstract

Porphyrins are a class of photosensitizers used in photodynamic therapy (PDT). Understanding the interaction of porphyrins with cell membrane components is important in order to improve this therapy. Many analytical methods can be used for this aim. High performance liquid chromatography technique (HPLC) was used for the separation of porphyrins on RP and HILIC stationary phases as well as on a biomimetic membrane IAM phase. Twenty-six tetraphenyl porphyrins (TPP) were successfully separated on an IAM column, a C18 Gravity RP column, a C8 Gravity RP column, a PolarTec RP column and a HILIC column. Stationary phases were chosen as the most appropriate to cover the study of different types of interactions. Elution was performed with a 45 min linear gradient. Obtained gradient retention times were converted to gradient chromatography hydrophobicity index (CHI) and to apparent retention factor (k_{app}). The partition coefficients ($\log P$) of the 26 compounds were measured in a 2-octanol/PBS system and estimated *in silico*. Correlation between k_{app} values was studied. Moreover, a multivariate analysis was performed to explain columns relationships. Obtained results show that porphyrins are separated mainly according to hydrophobic interactions that are relative to their structure (sugar number and the disposition around the porphyrin macrocycle).

Keywords: Porphyrin; HPLC-gradient elution; lipophilicity; RP-LC; HILIC; IAM.

1. Introduction

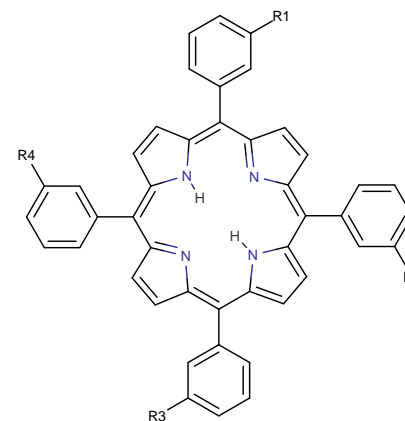
In drug discovery, it is important to measure the physico-chemical properties like solubility, permeability and lipophilicity of potentially active compounds. The lipophilic character of a compound informs about the biological behavior such as transport via cell membrane, bioavailability... This property has often been measured by the partition

coefficient $\log P$ (unionized species) or the distribution coefficient $\log D$ (ionized and unionized species) in a liquid/liquid system. Otherwise, it can be estimated in a solid/liquid system as in the case of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) [Rutkowska et al. 2013].

In HPLC a large variety of stationary phases can be used [Snyder et al. 2007], so it is possible to highlight various types of interaction. Some stationary phases have a particular interest as they mimic biological constituents of a cell membrane like proteins or phospholipids. For example, an Immobilized Artificial Membrane (IAM) stationary phase is considered as a model of membrane thanks to a phospholipid monolayer which is covalently immobilized on an inert silica support [Regis Technologies, 2015]. Therefore, the retention on an IAM phase reveals the interactions of the studied compound with phospholipids. IAM phases have been largely used to study drug-membrane interactions [Yen et al. 2005; Stewart and Chan 1998; Grumetto et al. 2012]. Herein, IAM column was used to study the retention of porphyrins. Nevertheless, because of its complex structure, investigation of the types of interaction is needed. Therefore, in order to understand IAM retention, different reverse stationary phases were used: first of all, two columns with high density of grafted C8 and C18 alkyl chains that allow highlighting the hydrophobic interactions. Then, a C18 with embedded polar groups (abbreviated C18-PG) column to study the contribution of a polar group grafted at the bottom of a C18 chain. And finally, a HILIC column was used to study hydrophilic interactions. All these stationary phases were used to characterize the interaction of a series of glycoconjugated photosensitizers that were designed by Maillard [Ballut et al. 2012]. In the last 15 years, numerous compounds were synthesized by glycoconjugation of the tetraphenyl porphyrin (TPP) unit in order to increase photosensitizers affinity for cancer cells, and so achieve an enhanced activity in the photodynamic therapy (PDT) of cancers [Lupu et al. 2009; Maillard et al. 2007]. PDT is defined as a treatment modality that combines the administration of a photoactivable molecule or photosensitizer (usually a porphyrin) followed by the exposure of the pathological area to appropriate visible light. The photosensitizer absorbs light generating photochemical reactions that eliminate cancer cells [Robertson et al. 2009].

Groups	Structure Name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Position
Sugar free	1. TPPmOH ₃	-OH	-OH	-OH	-H	<i>meta</i>
	2. TPPmOH ₄	-OH	-OH	-OH	-OH	<i>meta</i>
	3. m-THPC	-OH	-OH	-OH	-OH	<i>meta</i>
	4. TPPpOH ₃	-OH	-OH	-OH	-H	<i>para</i>
	5. TPPpOH ₄	-OH	-OH	-OH	-OH	<i>para</i>
One sugar	6. TPP(mGluOH) ₁	-OβGluOH	-H	-H	-H	<i>meta</i>
	7. TPP(pGluOH) ₁	-OβGluOH	-H	-H	-H	<i>para</i>
Two sugars	8. TPP(mGluOH) ₂ 5-10	-OβGluOH	-OβGluOH	-H	-H	<i>meta</i>
	9. TPP(mGluOH) ₂ 5-15	-OβGluOH	-H	-OβGluOH	-H	<i>meta</i>
	10. TPP(pGluOH) ₂ 5-10	-OβGluOH	-OβGluOH	-H	-H	<i>para</i>
	11. TPP(pGluOH) ₂ 5-15	-OβGluOH	-H	-OβGluOH	-H	<i>para</i>
Three/four sugars	12. TPP(mGluOH) ₃	-OβGluOH	-OβGluOH	-OβGluOH	-H	<i>meta</i>
	13. TPP(mGluOH) ₄	-OβGluOH	-OβGluOH	-OβGluOH	-OβGluOH	<i>meta</i>
	14. TPP(pGalOH) ₃	-OβGalOH	-OβGalOH	-OβGalOH	-H	<i>para</i>
	15. TPP(pGalOH) ₄	-OβGalOH	-OβGalOH	-OβGalOH	-OβGalOH	<i>para</i>
	16. TPP(pGluOH) ₄	-OβGluOH	-OβGluOH	-OβGluOH	-OβGluOH	<i>para</i>

a) *meta* position



b) *para* position

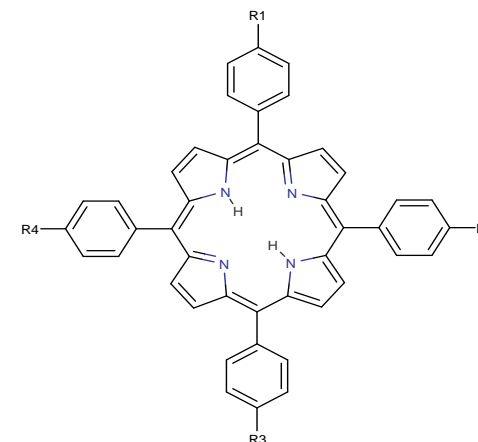


Figure 1.01. a, b : First generation porphyrins

Table 1.01: Tested porphyrins. Figure 1.01. (a and b) First generation.

Groups	Structure Name	n	R
spacer	17.	TPP(pMEG-L-Fuc) ₃	1 -αLfucOH
	18.	TPP(pMEG-D-Fuc) ₃	1 -αDfucOH
	19.	TPP(pMEGMan) ₃	1 -αManOH
	20.	TPP(pDEGGlu) ₃	2 -βGluOH
	21.	TPP(pDEGGal) ₃	2 -βGalOH
	22.	TPP(pDEGMan) ₃	2 -αManOH

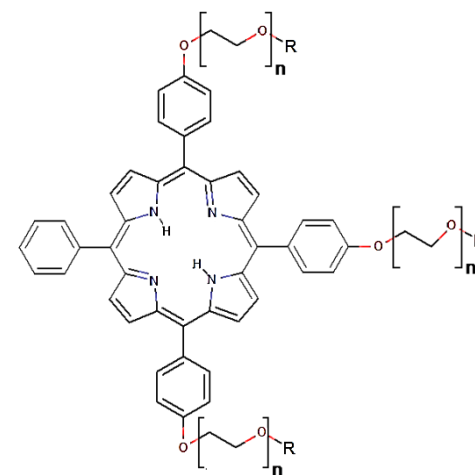


Figure 1.01c : Second generation porphyrins

Group	Structure Name	n	R
dendrimeric	23.	TPP[p-dendr(DEGOH) ₃]	2 -OH
	24.	TPP[p-dendr(MEGMan) ₃]	1 -αManOH
	25.	TPP[p-dendr(DEGMan) ₃]	2 -αManOH
	26.	TPP[p-dendr(TEGMan) ₃]	3 -αManOH

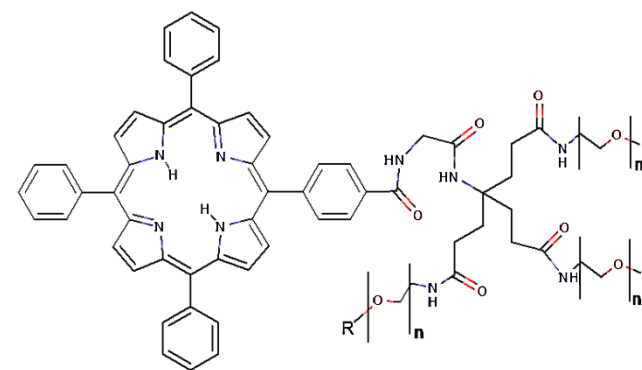


Figure 1.01d : Third generation porphyrins

Table 1.01: Tested porphyrins. Figure 1.01. (c) Second generation, and (d) third generation.

In the current work, twenty-six compounds illustrated in the Figure 1.0 1, were studied and can be divided into three groups. The first generation of porphyrins includes compounds bearing OH groups **1-5** and/or sugars directly linked to the phenyl groups (on *meta* or *para* position) **6-16**, presenting a constrained structure (1a and 1b). The second generation contains compounds **17-22** having a spacer between the phenyl and the glycosyl moieties that induces a flexible structure (1c). And the last generation, is composed of compounds with three sugar units linked via three spacers on the same phenyl group conferring a dendrimeric structure **23-26** (1d); a dendrimeric configuration should increase tumor targeting via a sugar cluster effect [Kiessling and Pohl 1996; Mammen et al. 1998; Kiessling et al. 2000; Monsigny et al. 2000; Röckendorf and Lindhorst 2001; Chabre and Roy 2008]. A number of studies have already been performed on the photophysical and physicochemical properties of these compounds [Makky et al. 2010; Ibrahim et al. 2011]. Furthermore, the efficiency of some derivatives has been demonstrated in cells [Laville et al. 2006; Maillard et al. 2007], or *in vivo* [Lupu et al. 2009]. The objective of the present study is to rank these compounds as a function of their lipophilicity, and to get a better insight into their interactions with phospholipids.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and Reagents

Acetonitrile was purchased from VWR International (France). Pure water was delivered by a Milli-Q Direct 8 ultrapure water purification system (Merck Millipore). Ammonium acetate was provided by VWR Prolabo. The first set of standards consists of toluene and ethylbenzene purchased from Merck (Germany), butylbenzene, n-pentylbenzene, uridine and thiourea delivered by Sigma-Aldrich (France), and quinine purchased from Janssen (France).

For the second set, the Acros Organics (Belgium) theophylline, indole, valerophenone and propiophenone, the Sigma-Aldrich (France) octaphenone and heptaphenone, the Carlo Erba (Italy) acetophenone, the Merck (Germany) butyrophenone and the Fluka acetanilide were used for CHI calibration.

2.2 Equipment

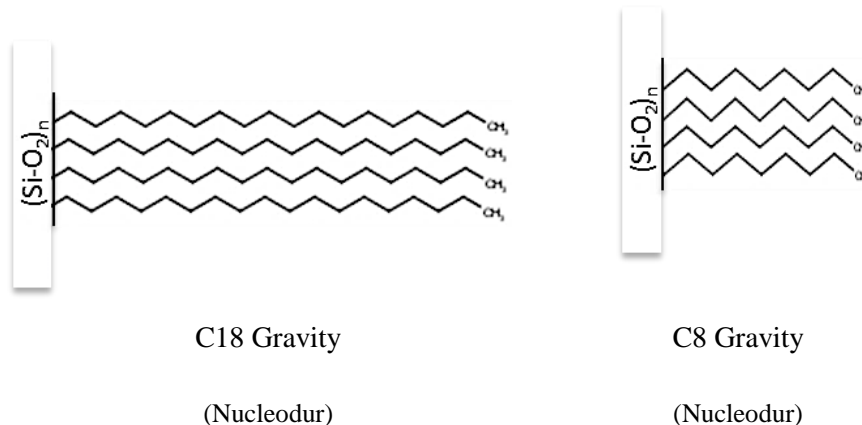
Analyses were performed with a HPLC system of Bio-Tek Kontron (Serlabo Technologies). It is constituted of a Bio-Tek 565 autosampler, a ternary pump Bio-Tek system

535, a Bio-Tek Instruments 582 Column Thermostat, a Bio-Tek (Kontron) 545V Diode array detector and a Bio-Tek (Kontron) degasser 3499 of mobile phase. The UV-visible detection wavelengths were set at 254 nm (standard detection) and 417 nm (porphyrin detection). Data acquisition and instrument control were carried out using Geminix software (1.91).

2.3. Tested columns

Five different chromatographic columns were tested. The first four are Nucleodur® columns (Gravity C18, Gravity C8, PolarTec and HILIC), having the same dimensions (125 mm × 4.0 mm, 5 μm), and purchased from Macherey-Nagel (Germany). Nucleodur® phases have a surface area of 340m²/g and a pore size of 110Å [Macherey-Nagel, 2015]. Average bonding density of Nucleodur® phases are: C18 Gravity ~ 3.8 μmol/m² (18% C); C8 Gravity ~ 3.8 μmol/m² (11% C); PolarTec ~ 3.0 μmol/m² (15.5% C); HILIC ~ 2.5 μmol/m² (7% C) (Macherey-Nagel, personal communication).

The fifth column is an IAM.PC.DD.2 column (30mm x 4.6mm, 10μm) purchased from Regis Technologies (Chicago, USA). The average bonding density of phosphatidylcholine (PC) is approximately 98 μmoles/g. The bonding density of C10 and C3 alkyl chains is 48.6 and 28 μmoles/g respectively [Ong and Pidgeon, 1995]. The surface area of the silica is 101 m²/g. (Regis Technologies, Inc., personal communication). More details about columns structure are illustrated in Figure 1.0 2.



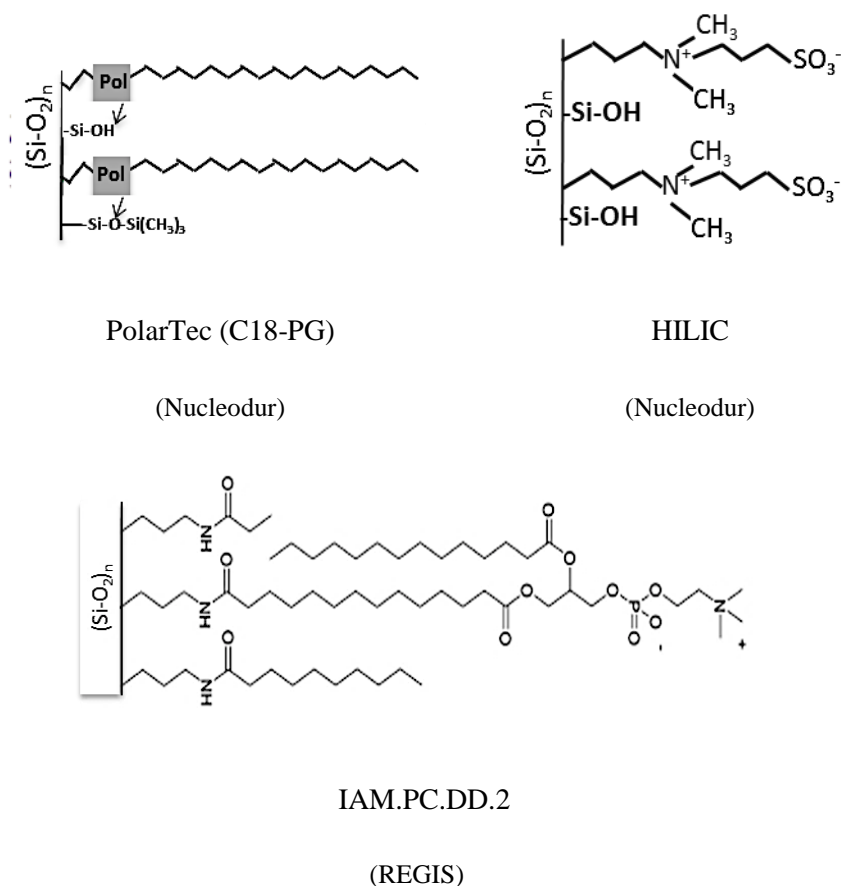


Figure 1.02: Columns structure

2.4. Tested solutes

Twenty-five derivatives of porphyrins were synthesized in the laboratory of Dr Ph. Maillard (Institut Curie, Orsay). These products are characterized by a tetraphenyl porphyrin core (TPP) and differ by the number, position and nature of a grafted sugar (table 1.01).

In addition to these synthesized porphyrins, the *m*-THPC [tetra-(*meta*-hydroxyphenyl)-chlorin, Foscan[®]] **3**, purchased from Frontier Scientific Inc. (U.S.A), was included in the study. *m*-THPC has a similar structure to TPP(*m*OH)₄ **2** but they differ by the saturation of one pyrrole double bond. Figures 1a, 1b, 1c, 1d illustrate details related to porphyrin structures.

2.5 *logP*

A solution of porphyrin in DMF (1mg/100μL) was added to a mixture of 2-octanol/PBS (1/1, v/v) (pH = 7.4) in a reactor at 20°C. Then the two phases were decanted, separated and diluted in methanol to avoid aggregates. The absorbance (A) of each phase was measured at 420 nm. *logP* was evaluated as : $\log P = \log(A_{2\text{-octanol}}/A_{\text{PBS}})$

2.6. Chromatographic conditions

The chromatographic analyses were performed with a constant flow rate of mobile phase 1 mL/min at 25°C. To obtain an efficient separation of the homologous series of porphyrins having a wide-range lipophilicity, samples were eluted with a long gradient. For the experiments on C18, C8, C18-PG and IAM columns, the mobile phase was acetonitrile/aqueous 20 mM ammonium acetate (pH 7.0). The following gradient program was applied: 0-15.5 min 5% acetonitrile, 15.5-60 min 5-100% acetonitrile, 60-80 min 100% acetonitrile. The dead time for these columns was measured using thiourea. Porphyrins were diluted in methanol, at a concentration of $\sim 2 \cdot 10^{-6}$ M, and injected on each column. We included internal standards in each run, so the reproducibility of the applied gradient was ascertained. The set of standards used for reverse phase columns contains toluene, ethylbenzene, n-butylbenzene and n-pentylbenzene. For the elution on HILIC column, the mobile phase was also acetonitrile/aqueous ammonium acetate (20 mM) at pH 7.0. Another gradient was applied: 0-15.5 min 3% aqueous phase, 15.5-45 min 3%-40% aqueous phase, 45-60 min 40% aqueous phase. The dead time was determined using toluene. To ensure reproducibility, a hydrophilic set of standards was mixed with porphyrins: uridine, quinine and thiourea. The dwell volume V_d (3.18 mL) of the system was determined by a 10 min gradient with 2 ml/min using 0.2% acetone in water. The mean gradient retention times (t_g) of porphyrins were calculated for 3 randomized runs.

2.7. Software employed

logP prediction was performed using Marvin software of ChemAxon. The VG function based on the atomic *logP* increments given in [Viswanadhan et al. 1989; ChemAxon 2014], was used. Statistical analysis was performed with the R software (v 3.0.2). Simca-p v 12 (Umetrics, Umeå, Sweden) was used for PCA plots.

3. Results and discussion

Porphyrins were injected on the columns listed in the previous section at the running conditions described above. In addition to chromatographic analysis, that will be discussed later, measurement of experimental *logP* values and calculation of *logP in silico* were performed. For a better comprehension of the results, the first generation of porphyrins (Fig

1a, b) is further divided into four groups according to their number of sugars (sugar free **1-5**, one sugar **6-7**, two sugars **8-11**, three/four sugars **12-16**). Hereafter, the second generation porphyrins (Fig 1c) are named “spacer” group **17-22** and the third generation porphyrins (Fig 1d) are the “dendrimeric” group **23-26**. In total six groups are considered as mentioned in Table 1.01.

3.1. *logP*

The partition coefficient (*P*) is a widely used quantitative descriptor of lipophilicity. It is defined as the ratio of a compound concentration in two immiscible solvents (organic and aqueous). The shake flask procedure is a classic method that allows to estimate *logP* [Fujita et al. 1964]. Herein, *logP* was determined according to the protocol of Kessel [1977] using 2-octanol and PBS. *logP* values of some derivatives were already published by Maillard and coll. in previous works [Croisy et al. 2005; Laville et al. 2006; Ballut et al. 2011; Ballut et al. 2012], according to the same protocol.

In addition, *logP* of porphyrins can be estimated by means of various computer softwares based on different algorithms [Chauvin, 2011]. Herein, the Marvin software was used, and *logP* was predicted with the VG function which is based on the atomic *logP* increment. Then, predicted *clogP* values and measured *logP_{exp}* values were compared in table 1.02.

Table 1.02. Predicted and experimental *logP* values (Bold: higher values. italic: lower values)

Structure Name	<i>logP_{exp}</i> (±0.3)	<i>clogP</i> (VG)
1. TPP <i>m</i> OH ₃	1.21	10.66
2. TPP <i>m</i> OH ₄	0.77	10.38
3. <i>m</i> -THPC	> 3.00 ^a	9.56
4. TPP <i>p</i> OH ₃	0.40	10.66
5. TPP <i>p</i> OH ₄	0.91	10.38
6. TPP(<i>m</i> GluOH) ₁	0.52	8.57
7. TPP(<i>p</i> GluOH) ₁	2.34	8.57
8. TPP(<i>m</i> GluOH) ₂ 5-10	0.86	5.62
9. TPP(<i>m</i> GluOH) ₂ 5-15	0.30	5.62
10. TPP(<i>p</i> GluOH) ₂ 5-10	1.15	5.62
11. TPP(<i>p</i> GluOH) ₂ 5-15	0.77	5.62
12. TPP(<i>m</i> GluOH) ₃	1.80 ^b	2.67
13. TPP(<i>m</i> GluOH) ₄	0.30 ^b	-0.28
14. TPP(<i>p</i> GalOH) ₃	0.62 ^a	2.67
15. TPP(<i>p</i> GalOH) ₄	-0.74 ^a	-0.28
16. TPP(<i>p</i> GluOH) ₄	0.30 ^b	-0.28

17. TPP(<i>p</i> MEG-L-Fuc) ₃	1.21	5.43
18. TPP(<i>p</i> MEG-D-Fuc) ₃	0.56	5.43
19. TPP(<i>p</i> MEG-Man) ₃	0.78 ^c	2.18
20. TPP(<i>p</i> DEG-Glu) ₃	0.76 ^b	1.68
21. TPP(<i>p</i> DEG-Gal) ₃	0.23 ^c	1.68
22. TPP(<i>p</i> DEG-Man) ₃	0.02 ^c	1.68
23. TPP[<i>p</i> -dendr(DEG-OH) ₃]	1.60 ^{b,d}	4.49
24. TPP[<i>p</i> -dendr(DEG-Man) ₃]	-0.65 ^{b,d}	-1.86
25. TPP[<i>p</i> -dendr(MEG-Man) ₃]	-0.66 ^{b,d}	-1.37
26. TPP[<i>p</i> -dendr(TEG-Man) ₃]	-0.94 ^{b,d}	-2.36

(a) [Croisy et al. 2005] ; (b) [Ballut et al. 2011] ; (c) [Laville et al. 2006] ; (d) [Ballut et al. 2011]

The highest *clogP* values are for sugar free compounds (10.66; 9.56) **1-5** followed by the monoglycoconjugated ones (8.57) **6, 7**. The most polar compounds seem to be the glycodendrimeric derivatives (-2.36; -1.37) **24-26** followed by the tetraglycoconjugated **13, 15-16** (-0.28). Thus the polarity scale according to *clogP* can be established: dendrimeric > four sugars > spacer > three sugars > two sugars > one sugar > sugar free. Compounds containing fucose have higher *clogP* values than other compounds of the spacer family; this sugar is less polar than mannose, glucose and galactose. Nevertheless, this polarity range does not fit to that obtained with “shake flask” experience. In fact, *logP_{exp}* vary in a narrow range. Correlation coefficient between *logP_{exp}* and *clogP* is low $r = 0.6660$. This difference could be due to difficulties encountered on each method.

Firstly, Marvin calculator does not take into account the substitution position and gives the same values for *meta* and *para* derivatives. This is more obvious in the case of diglycoconjugated derivatives **8-11**: the 5-10 or 5-15 substitution gives to the molecule a completely different geometry but Marvin calculator, based on molecule fragmentation, cannot detect the difference.

Secondly, most of the porphyrins are highly hydrophobic (due to the TPP core) and, in experimental *logP* determination, they aggregate in aqueous media; the type of aggregates depends on the molecule geometry [Ibrahim et al. 2011]. Furthermore, the studied porphyrins have an amphiphilic character and the shake flask method may not be adequate for their study [OECD Guideline, 1995]. Consequently, experimental *logP* values are more difficult to classify, however similarities with *clogP* can be observed, especially concerning the most hydrophobic (sugar free and one sugar TPP) and the most polar (dendrimers and TPP with four sugars) compounds.

Taking into account these reasons, neither $clogP$ nor $logP_{exp}$ seem to be adequate for characterizing porphyrins. In literature, another parameter is used as an alternative; it is the chromatographic hydrophobicity index (CHI). This index was first used by Valkó et al. [Valkó et al. 1997]. They have showed a good correlation between the CHI of 52 compounds and their corresponding $clogP$.

3.2. Retention data evaluation

For chromatographic analysis, the gradient elution was chosen to cover the whole polarity range of porphyrins. Reproducibility of measured retention time is good for all columns, presenting low standard deviations (see appendices table A1.01). Obtained gradient retention times were converted to other parameters as Chromatographic Hydrophobicity Index (CHI) and apparent retention factor (k_{app}). The management of data was processed by a statistical study.

3.2.1 Chromatographic Hydrophobicity Index CHI

In reversed phase chromatography and in isocratic conditions, the retention factor is usually defined as:

$$\log k = \log k_w - S\varphi$$

where φ is the organic solvent volume fraction. S is the slope of the regression plot and $\log k_w$ is a parameter of lipophilicity (the extrapolated retention factor to zero organic phase concentration). When $\log k = 0$, φ_0 can be calculated. It denotes the organic solvent concentration at which the quantity of analyte in mobile and stationary phase is equal.

Valkó and co-authors evidenced a linear correlation between φ_0 values and the gradient retention time (t_g) of compound in a rapid gradient elution. Hence, φ_0 can be approximated by the chromatographic hydrophobicity index (CHI), calculated by the linear relationship $CHI = At_g + B$. A and B are respectively the slope and intercept of the plot of the gradient retention time (t_g) of a calibration set of compounds against isocratic φ_0 values.

Herein, the methodology of Valkó et al. was adapted to evaluate the CHI values, but using a long gradient. The set of standards of well-known CHI values that were previously determined in literature, were analyzed at the same conditions as porphyrins (45 min, pH 7 and 25°C). t_g values of porphyrins were then converted to gradient CHI according to the equation $CHI = At_g + B$. CHI values of standards obtained for C18 column [Valkó et al. 1997]

were used here to calibrate C18 as well as C8 and C18-PG reverse phase systems. Another set of standards was used for IAM column calibration; CHI_{IAM} values were obtained from Valkó [Valkó et al 1998]. The standards CHI values as well as their retention times (t_g) used herein are given in appendices Table A1.02.

In order to verify that experimental conditions fit CHI methodology, determination coefficient of standards curve $CHI = A t_g + B$ on each column was calculated. For C18 and C8 and IAM columns, high coefficients were obtained ($r^2 = 0.981$, $r^2 = 0.985$ and $r^2 = 0.980$ respectively) in agreement with Valkó et al. [Valkó et al. 1997]. Consequently, it was suggested that the CHI method could be applied in the case of a long gradient for these listed columns. The coefficient is slightly lower for C18-PG ($r^2 = 0.962$).

Obtained porphyrin CHI values can be found in appendices (Table A1.03). As calculated CHI values approximate φ_0 , they should be between (0-100) [Valkó et al. 1997]. However, in practice, values slightly higher than 100 can be accepted.

On C8 and C18 stationary phases, CHI values were very high (>110) for sugar free porphyrins **1-5**, for porphyrins with just “one sugar” **6-7**, and for the non-glycosylated dendrimer **23**. Thus, these compounds cannot be characterized with the CHI methodology, probably due to their high hydrophobicity. Otherwise, dendrimeric compounds **24-26** with sugars have CHI values between (110-120) on C18 column, and around 100 on the C8 phase. For all other compounds CHI values on C18 and C8 can be used as a measure of hydrophobicity in accordance with a previous work [Chauvin et al. 2013]. On C18-PG column, sugar free compounds **1-5** are not eluted even at 100% acetonitrile; consequently t_g values and CHI values for these compounds cannot be determined. For the rest of groups, CHI-C18-PG values are 10 and 15 units higher than those for CHI-C18 and CHI-C8 respectively. Thus, according to the lower regression coefficient for standards and high values of CHI porphyrins, it is suggested that CHI values of standards used for C18-PG column calibration are not adequate; in this case the values must be determined on C18-PG in isocratic before using them for porphyrin characterization with CHI methodology in gradient. For IAM column, CHI standards range does not exceed 50 units (see Table A1.02). Thus, compounds having CHI values much higher than 50 (sugar free **1-5**, one sugar **6-7**, two sugars **8-11**, dendrimeric **24-26**) cannot be considered. For including these compounds in CHI_{IAM} determination, other standards must be introduced to the set used in IAM, in order to cover a larger polarity range.

It is important to notice that retention times on HILIC column cannot be converted to CHI. Therefore, in order to compare retention of all compounds in reverse phase and HILIC columns, another parameter was chosen, the apparent capacity factor (k_{app}).

3.2.2 k_{app}

The apparent capacity factor k_{app} (or k'_g) was defined by Krass et al.[1997] as:

$$k_{app} = \frac{V_g - V_d - V_m}{V_m}$$

where V_g is the retention volume in the gradient, V_m the column dead volume and V_d the system delay volume. The obtained values are given in appendix (table A1.04). The correlation matrix (table 1.03), highlights the relationship of k_{app} values of all columns with $\log P$.

Table 1.03. Correlation matrix of k_{app} and $\log P$. * without “sugar free” compounds

	k_{app} -C18	k_{app} -C8	k_{app} -C18-PG*	k_{app} -IAM	k_{app} -HILIC	$\log P$
k_{app} -C18	1	0.9897	0.9899	0.8465	-0.7637	0.6749
k_{app} -C8		1	0.9854	0.8866	-0.7965	0.6770
k_{app} -C18-PG*			1	0.9229	-0.7891	0.6080
k_{app} -IAM				1	-0.7894	0.7136
k_{app} -HILIC					1	-0.9737
$\log P$						1

An excellent correlation between k_{app} -C18 and k_{app} -C8 stationary phases is noticed; therefore, all porphyrins have similar selectivity to these stationary phases. C18-PG phase has proved to have a high affinity for “sugar free” group of porphyrins as they are too much retained. However when excluding this group from the data, C18-PG column correlates strongly with C8/C18 for the remaining porphyrin structures. The correlation coefficient is low for k_{app} -IAM versus others columns: this is due to the difference of this stationary phase structure compared to other columns (**Figure 1.02**). k_{app} -HILIC is negatively correlated to all RP columns, its correlation coefficient varies from $r = -0.7637$ to $r = -0.7965$. With HILIC system, the preponderant interactions are polar, contrary to C18, C8 and IAM columns mainly governed by hydrophobic interactions. A low correlation is observed between k_{app} RP

columns and calculated $clogP$, and even less with $logP_{exp}$ values. Nevertheless, a good correlation was obtained between $clogP$ values and k_{app} -HILIC column ($r = -0.9737$).

According to these results and this analysis, we suggest that k_{app} is very useful to characterize the lipophilicity of porphyrins on all tested columns.

3.3 Porphyrins retention mechanisms

3.3.1 Retention on C18 stationary phase

C18 is a highly hydrophobic phase. The studied molecules are amphiphilic, composed of a hydrophobic TPP unit and polar substituents. The obtained order of retention is: three/four sugars < spacer < glycodendrimeric < sugar free < one sugar (Figure 1.03, Appendices table A4). Compounds bearing three sugars via a spacer ("spacer" group) are more retained than those with a constrained structure, unlike to $clogP$ classification. Spacer induces a flexibility that allows a better TPP-hydrophobic chains interaction. Compounds of the "two sugars" family (**8-11**) are well separated (Table A1.04). Contrarily to $clogP$, reversed phase retention distinguishes between symmetric di-glycoconjugated **9** and **11** compounds that are less retained than asymmetric **8** and **10**. The latter present two-adjacent free phenyls, and a greater surface of the TPP unit can be exposed to hydrophobic stationary phase. Dendrimeric compounds **24-26** are well retained in spite of the presence of three sugars and polar ligands (Figure 1.0 1d). High retention of dendrimeric compounds is in contradiction with their low $logP_{exp}$ and $clogP$ values. It is to note that the derivatives bearing only "one sugar" (**6-7**) are the most retained compounds (Figure 1.03). Dendrimeric and "one sugar" compounds have three free phenyl groups making possible TPP unit insertion into the stationary phase. It is to note that in all families of *meta* derivatives are more retained than the corresponding *para*. This fact can be explained by the different conformation of derivatives [Chauvin et al. 2013], the *meta* ones favor the exposure of the hydrophobic TPP unit to the stationary phase. As a conclusion, retention of porphyrin on C18 depends on i) the presence of polar substituents like sugars ii) the accessibility of the TPP unit to the stationary phase. The later factor is the cause of the low correlation coefficient between k_{app} -C18 and $logP$ values (Table 1.03).

3.3.2 Comparison of C18 with retention on C8, C18-PG, and IAM phases

Retention times are shorter on **C8**, due to the shorter hydrophobic chains. As a consequence, when comparing retention on C8 and C18 phases, a deviation from the diagonal is observed (Figure 1.03) for porphyrins and for standards (toluene, ethylbenzene butylbenzene and pentylbenzene). Deviation is more important for dendrimeric **23** and compounds with one sugar **6-7** (Fig1.0.3); that is derivatives bearing three free phenyl groups. The depth of fully solvated aliphatic chains (% acetonitrile > 40%) is estimated to 0.8 nm for C8 phase and 1.6 nm for C18 chains [Rafferty et al. 2012]. TPP unit has a length of about 1.7 nm. We suggest that for dendrimeric and one sugar compounds, TPP unit is inserted vertically between the hydrophobic chains and interacts with the entire chain.

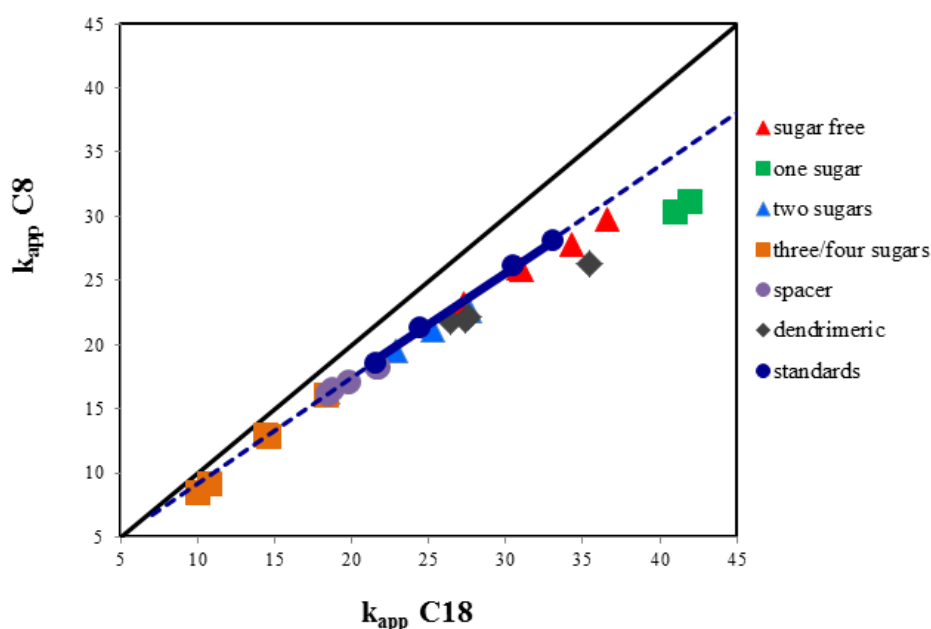


Figure 1.03. Retention of porphyrins on C8 versus C18. *The black line is the diagonal.*

C18-PG phase has a slightly lower bonding density than C18 phase. As a consequence the four apolar standards present a low retention (Figure 1.0 4). Besides non-polar interactions, C18-PG phase has embedded polar groups. So different polar interactions (dipole-dipole, hydrogen-bondings, etc.) may occur [Macherey-Nagel, 2015]. On C18-PG phase, the high retention of sugar free compounds **1-5** was interesting. This is due to the presence of phenol groups. In fact, when compounds are inserted between the hydrophobic chains, the phenol group interacts with amide groups at the bottom of the stationary phase. For the other porphyrin groups retention is closer to the diagonal than the hydrophobic standards, implying

the presence of polar interactions. Dendrimeric **23-26** and TPP(*m*GluOH)₁ **6** present a retention closer to that of hydrophobic standards which means that their polar interactions are limited. Compounds having the fewest polar interactions, with polar groups embedded at the bottom of the aliphatic chains, are the dendrimeric compounds. Conversely, “sugar free” porphyrins have the highest polar interactions.

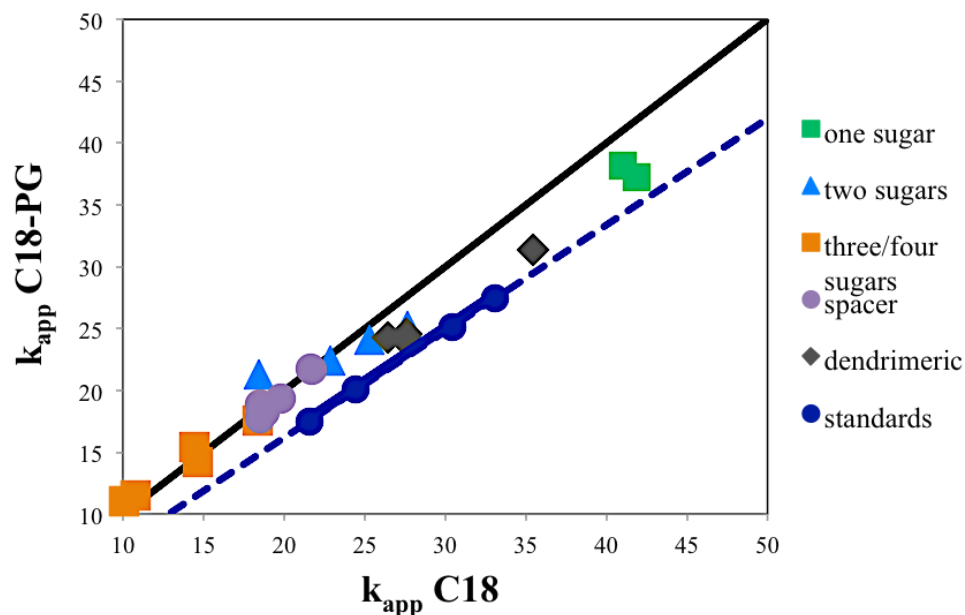


Figure 1.04. Retention of porphyrins on C18-PG versus C18. *The black line is the diagonal.*

The most important feature concerning IAM retention is that k_{app} is much higher compared to the C18. Porphyrin retention values on IAM seem aligned in a straight line considerably shifted from the line of standards (Figure 1.05). The only not aligned compounds are porphyrins with one sugar **6-7** and the dendrimer without sugar **23**, which are compounds with great availability of the TPP unit (three free phenyl groups) and small polar surface area. For all the other compounds the shift with respect to the standards seems independent of porphyrin family and is attributed to the interactions of porphyrins macrocycle with the charged IAM head groups. Sugar free compounds **1-5** are the most retained of all compounds on the IAM column, contrary to C18. It is obviously due to their interactions with the embedded amide groups, like C18-PG phase. Numerous other changes in the order of retention are observed with respect to C18. For example, some *para* derivatives are more retained than *meta* ones (see Table A1.04). Contrarily to C18/C8 and C18-PG phases, on IAM phase the glycoconjugated dendrimers (**24-26**) are more retained than the non

glycoconjugated one (**23**). This is due to the interaction of their sugars with the zwitterionic groups, an interaction that will be discussed for the HILIC column (see next section). As a conclusion, we can note that classification of porphyrins on IAM and C18 phases are not equivalent. Nevertheless, the correlation with $\log P$ remains low (table 1.03).

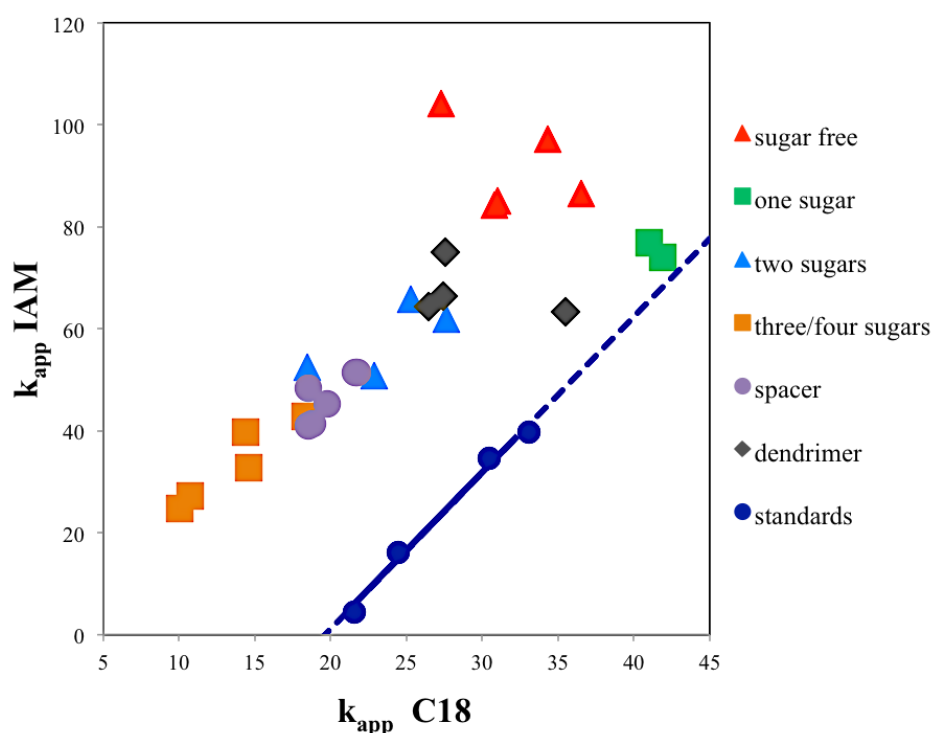


Figure 1.05. Retention of porphyrins on IAM versus C18.

3.3.3 HILIC stationary phase

The main mechanism of retention on HILIC (Hydrophilic Interaction LIquid Chromatography) columns is the partition of the studied compound between the immobilized aqueous layer at the surface of the polar stationary phase and the organic-rich mobile phase. Furthermore, direct interactions between the compound and the polar groups of the stationary phase occur [Chirita et al. 2011; Dinh et al. 2011; Kawachi et al. 2011]. **Nucleodur HILIC** column, used in this work, has a zwitterionic ammonium sulfonic acid stationary phase (Figure 1.02). Porphyrin derivatives are retained on HILIC phase as a function of their sugars

number: four sugars > three sugars > two sugars > one and sugar free (Appendice table A1.04). *Para* derivatives are always more retained than the corresponding *meta*. When compounds have similar characteristics, retention depends on the sugar nature and increases following this order: fucose < mannose < glucose < galactose. Spacers in the “spacer” family have only a minor effect on compound retention. Dendrimeric derivatives (**24-26**) have three sugars but are eluted almost together with the derivatives having four sugars, obviously due to the presence of polar amide groups in their spacer (Figure 1.01d). HILIC retention, as well as *logP*, classifies dendrimeric porphyrins among the highly polar compounds.

A strong correlation between k_{app} HILIC and *clogP* values is observed (table 1.03), suggesting that partition driven by hydrophilic interactions is the major mechanism involved in porphyrin retention. Contrarily to C8/C18 phases, retention on HILIC seems less influenced by molecular geometry and porphyrins are classified as a function of their substituents polarity.

3.4 Chemometric characterization

For a further understanding of retention relationships with all tested columns, a multivariate analysis was performed. The purpose was to reduce, if possible, the number of columns needed for characterizing porphyrins lipophilicity.

For this analysis the three values of k_{app} for each column were used to compute the PCA. We remind that no k_{app} values can be calculated for sugar free compounds **1-5** on C18-PG. As a consequence, it was decided to compute the first PCA model without this group but with all chromatographic columns and, then, to compute a second PCA model with all porphyrins (including the “sugar free” group) but excluding the C18-PG from the column dataset. Therefore, the first PCA model consisted of fifteen variables and twenty one objects (porphyrins). Results are illustrated in the score and loading plots (Figure 1.06).

On the basis of the eigenvalues, two PC were retained. PC1 explains the largest possible variation in the data 87.4%, PC2 explains over 9.7% of the residual variation. The projection of porphyrins on PC1 in the score plot shows that compounds can be classified according to the decrease of sugar number i.e. the increase of potential hydrophobic interactions: compounds with low sugar number are then more retained on C18, C8, C18-PG and IAM columns. The second axis distinguishes the dendrimeric group (**24-26**) from the other groups

with three sugars. The same axis also separates the symmetric **9, 11** “two sugar” compounds from the asymmetric ones **8,10**.

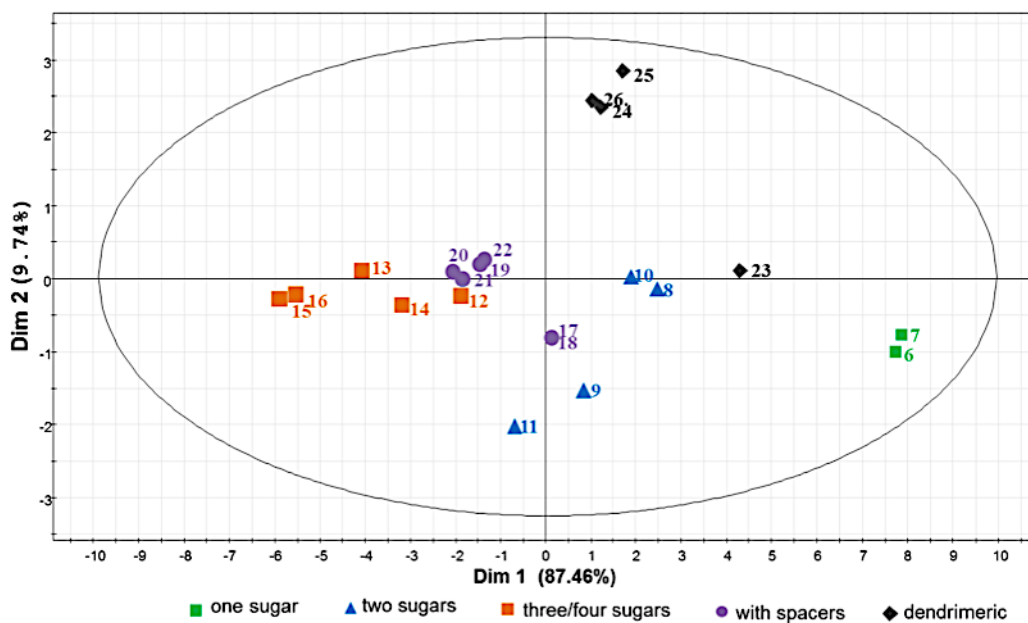


Figure 1.06 (a) PCA-1 score plot

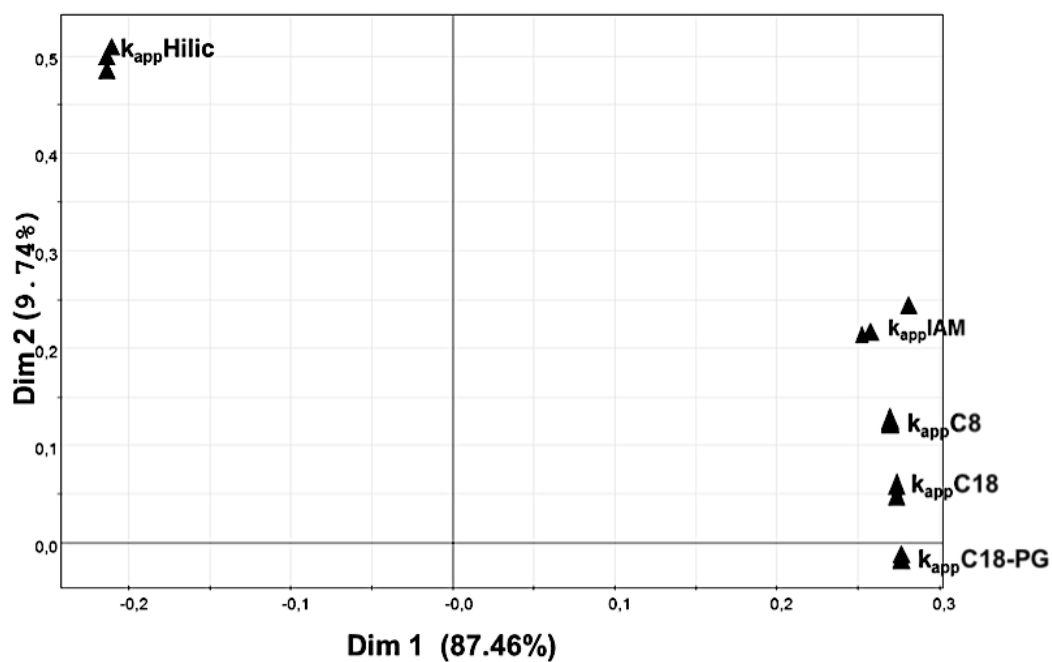


Figure 1.06 (b) PCA-1 loading plot

According to the loading plot, HILIC column is negatively correlated to all the other columns. Moreover to this contribution of HILIC column on the first axis, it has the highest loading on axis 2 too, suggesting an additional retention on this column. IAM is an interesting case: the retention appears to be mainly governed by the same mechanism than the C8/C18 stationary phases as it correlates mainly with the first axis, but it also incorporates some of the polar interactions as it presents a significant loading value on axis 2. For the dendrimeric group, as it is well represented by the second axis, it is suggested that it has a supplementary retention on the HILIC column, and a less important retention on the IAM: This retention is explained by hydrophilic interaction.

Retention on C18-PG column is excluded in the second PCA to allow studying the influence of the “sugar free” group of porphyrins. Then, PCA data matrix consists of twelve variables and twenty-six objects (porphyrins). Results are illustrated in the scores and loading plots of Figure 1.07.

PC1 explains 86.9% of the variation and PC2 explains over 7.9% of the residual variation. This second score plot appears to be very similar to the one obtained from the first dataset. The sugar free porphyrin group is located near the group of one sugar. Therefore, PC1 explains the hydrophilic interaction of compounds as a function of the sugar number. So the absence of column C18-PG does not affect the overall trend of porphyrins distribution and the introduction of the sugar free group does not influence too much the porphyrin coordinates. Dendrimeric porphyrins are at the upper part of axis 2 as with the first dataset but, in addition, *meta* and *para* compounds are separated according to PC2. This is due probably the different flexibility between *meta* and *para* compounds.

When examining the loading plot, the same hydrophilic vs hydrophobic opposition can be seen from axis 1. HILIC still also contributes significantly to axis 2; it contributes with 50%. In addition of HILIC contribution in PC2, C8 and C18 contribute slightly in this axis too. This contribution is reflected on the scores plot by a specific retention of dendrimeric groups: in fact this structure is characterized by two parts: from one side three hydrophilic spacers interacting mainly with HILIC column, and from the other side, a hydrophobic TPP core interacting with the RP phases. By including porphyrins sugar free, the contribution of IAM is abolished on the PC2.

It can be concluded from the two PCA, that the PC1, which explains the major of variation, has the same signification relative to the ability of TPP derivatives to give polar and non-polar interactions. PC2 is explained mainly by the accessibility of compounds to HILIC phase.

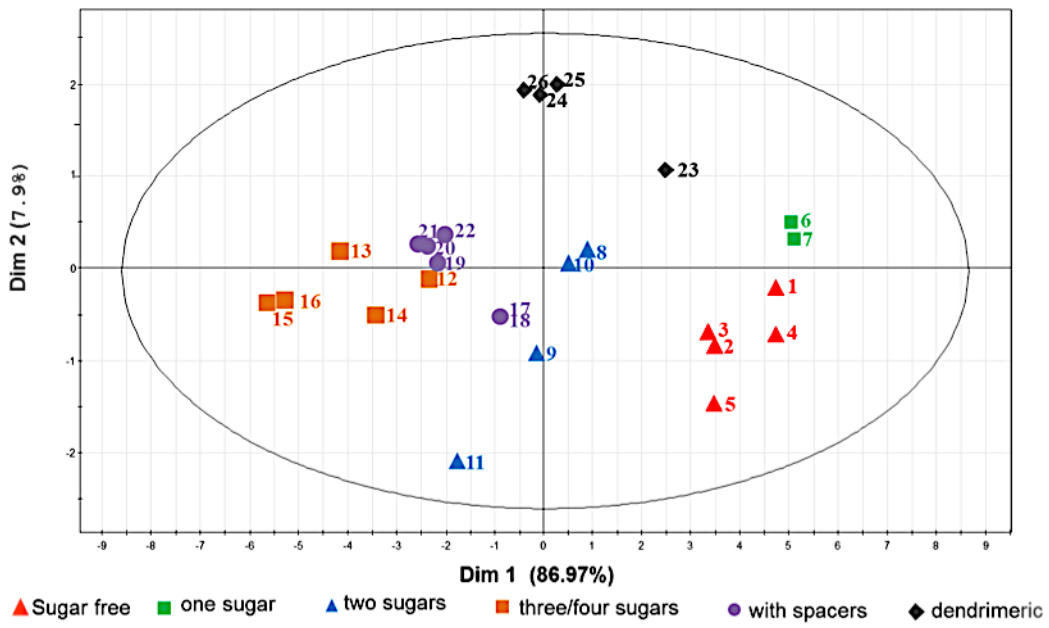


Figure 1.07 (a) PCA-2 scores plot

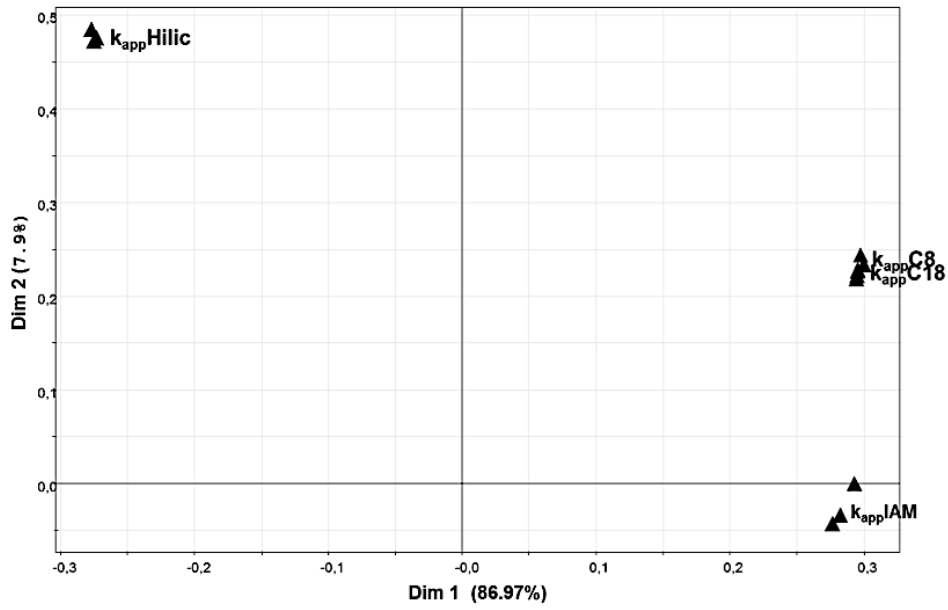


Figure 1.07 (b) PCA-2 loading plot

4. Conclusions

Our results show that compounds of sugar free group (**1-5**) have hydroxyl groups that can deeply insert into the aliphatic chains in C18-PG and IAM phases. We can reasonably suggest that these compounds can cross the phospholipid layer more easily than the others. Aliphatic chains present a great affinity for TPP unit that is favored by the number of free phenyl groups. Compounds with three free phenyl groups (“one sugar” **6,7** and “dendrimeric” **23-26**) are easily inserted between the aliphatic chains even in the IAM column: they are easily associated to phospholipid layer. Nevertheless, these compounds have only little interaction with the embedded polar groups suggesting that it is more difficult for these compounds (**6, 7**, and **23-26**) to pass through the phospholipid layer, as well as for the other glycoconjugated derivatives **8-22**. Analyses on IAM and HILIC stationary phases show that porphyrin sugars interact with the zwitterionic group, affecting porphyrin affinity to phospholipids. Furthermore, the comparison of porphyrin affinity to IAM stationary phase with respect to the affinity of standards, suggests an important contribution of the interactions between the porphyrin macrocycle and the zwitterionic group of phospholipids. It is obvious from the above results that a C18/C8 or C18-PG stationary phase is not sufficient to characterize porphyrins affinity for phospholipids. Furthermore, $\log P$ values, determined by the flask shake method or *in silico*, do not seem to be the adequate parameters to characterize porphyrin –phospholipid interaction. HILIC phase ranks very well porphyrins as a function of the substituents polarity, but it does not take into account the particularities of aliphatic chains–TPP interactions. Retention on IAM seems to be the most adequate method, taking into account i) porphyrin affinity to hydrophobic chains, ii) porphyrin easiness to cross the lipid layer iii) interactions of zwitterionic group with sugars and porphyrin macrocycle. Evaluation of the CHI_{IAM} , after an adequate selection of standards, can be used to compare porphyrins to other drugs.

5. References

- Ballut S., Naud-Martin D., Loock B., Maillard Ph., A strategy for the targeting of photosensitizers. Synthesis, characterization, and photobiological property of porphyrins bearing glycodendrimeric moieties, *J. Org. Chem.* 76 (2011) 2010–2028.
- 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 (2012) 4485–4495.
- Chabre Y.M., Roy R., Recent trends in glycodendrimer syntheses and applications, *Curr. Top. Med. Chem.* 8 (2008) 1237–1285.
- Chauvin B., Physico-chimie de méso-tétraphénylporphyrines glycoconjuguées pour la photothérapie dynamique: vers une meilleure compréhension de la distribution plasmatique et de la localisation subcellulaire ?, phd thesis, Université Paris Sud - Paris XI, 2011. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00660396/document> (accessed January 22, 2015).
- Chauvin B., Iorga B.I., Chaminade P., Paul J.-L., Maillard Ph., Prognon P., Kasselouri A., Plasma distribution of tetraphenylporphyrin derivatives relevant for Photodynamic Therapy: Importance and limits of hydrophobicity, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 83 (2013) 244–252.
- ChemAxon, ChemAxon's Calculator Plugins: logP Plugin, (2014). <https://docs.chemaxon.com/display/CALCPLUGS/logP+Plugin>.
- Chirita R.-I., West C., Zubrzycki S., Finaru A.-L., Elfakir C., Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 5939–5963.
- Croisy A., Lucas B., Maillard Ph., Les macrocycles tétrapyrroliques glycoconjugués. Utilisation en photothérapie dynamique (PDT), *Actual. Chim. Thérapeutique.* 31 (2005) 181–244.
- Dinh N.P., Jonsson T., Irgum K., Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 5880–5891.
- Fujita T., Iwasa J., Hansch C., A new substituent constant, π , derived from partition coefficients, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 5175–5180.
- Grumetto L., Carpentiero C., Barbato F., Lipophilic and electrostatic forces encoded in IAM-HPLC indexes of basic drugs: Their role in membrane partition and their relationships with BBB passage data, *Eur. J. Pharm. Sci.* 45 (2012) 685–692.
- Habicht K.-L., Singh N.S., Indig F.E., Wainer I.W., Moaddel R., Shimmo, R. The development of mitochondrial membrane affinity chromatography columns for the study of mitochondrial transmembrane proteins. *Anal. Biochem.* 484 (2015) 154–161.
- Ibrahim H., Kasselouri A., You C., Maillard Ph., Rosilio V., Pansu R., Prognon P., Meso-tetraphenyl porphyrin derivatives: The effect of structural modifications on binding to DMPC liposomes and albumin, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 217 (2011) 10–21.
- Kawachi Y., Ikegami T., Takubo H., Ikegami Y., Miyamoto M., Tanaka N., Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases:

- Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 5903–5919.
- Kessel D., Effects of photoactivated porphyrins at the cell surface of leukemia L1210 cells, *Biochemistry (Mosc.)*. 16 (1977) 3443–3449.
- Kiessling L.L., Gestwicki J.E., Strong L.E., Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4 (2000) 696–703.
- Kiessling L.L., Pohl N.L., Strength in numbers: non-natural polyvalent carbohydrate derivatives, *Chem. Biol.* 3 (1996) 71–77. doi:10.1016/S1074-5521(96)90280-X.
- Krass J.D., Jastorff B., Genieser H.-G., Determination of lipophilicity by gradient elution High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2575–2581.
- Laville I., Pigaglio S., Blais J.-C., Doz F., Looock B., Maillard Ph., Grierson D.S., Blais J. Photodynamic efficiency of diethylene glycol-linked glycoconjugated porphyrins in human retinoblastoma cells., *J. Med. Chem.* 49 (2006) 2558–67.
- Lupu M., Thomas C.D., Maillard Ph., Looock B., Chauvin B., Aerts I., Croisy A., Belloir E., Volk A., Mispelter J., ²³Na MRI longitudinal follow-up of PDT in a xenograft model of human retinoblastoma, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 6 (2009) 214–220.
- MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. (2015) <http://www.mn-net.com>.
- Maillard Ph., Looock B., Grierson D.S., Laville I., Blais J., Doz F., Desjardins L., Carrez D., Guerin-Kern J.L., Croisy A., In vitro phototoxicity of glycoconjugated porphyrins and chlorins in colorectal adenocarcinoma (HT29) and retinoblastoma (Y79) cell lines, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 4 (2007) 261–268.
- 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 (2010) 11145–11156.
- Mammen M., Choi S.-K., Whitesides G.M., Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 2754–2794.
- Monsigny M., Mayer R., Roche A.C., Sugar-lectin interactions: sugar clusters, lectin multivalency and avidity, *Carbohydr. Lett.* 4 (2000) 35–52.
- OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method, 107, (1995).
- Ong S., Pidgeon C., Thermodynamics of solute partitioning into immobilized artificial membranes, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2119–2128.
- Pidgeon C. & Venkataram U.V. Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids. *Anal. Biochem.* 176 (1989) 36–47.

- Rafferty J.L., Siepmann J.I., Schure M.R., A molecular simulation study of the effects of stationary phase and solute chain length in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1223 (2012) 24–34.
- Regis Technologies Inc., IAM Chromatography, (2015).
<http://www.registech.com/chromatography/iam-chromatography>.
- Robertson C.A., Evans D.H., Abrahamse H., Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT, *J. Photochem. Photobiol. B.* 96 (2009) 1–8.
- Röckendorf N., Lindhorst T.K., Glycodendrimers, in: P.D.F. Vögtle, D.C.A. Schalley (Eds.), *Dendrimers IV*, Springer Berlin Heidelberg, 2001: pp. 201–238.
- Rutkowska E., Pajak K., Józwiak K., Lipophilicity--methods of determination and its role in medicinal chemistry, *Acta Pol. Pharm.* 70 (2013) 3–18.
- Snyder L.R., Dolan J.W., Other Applications of Gradient Elution, in: *High-Perform. Gradient Elution Pract. Appl. Linear-Solvent-Strength Model*, Wiley-Interscience, Hoboken, N.J., 2007: pp. 323–369.
- Stewart B.H., Chan O.H, Use of immobilized artificial membrane chromatography for drug transport applications, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 1471–1478.
- Valkó K., Bevan C., Reynolds D., Chromatographic Hydrophobicity Index by fast-gradient RP-HPLC: A high-throughput alternative to log P/log D, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2022–2029.
- Valkó K., Plass M., Bevan C., Reynolds D., Abraham M., Relationships between the chromatographic hydrophobicity indices and solute descriptors obtained by using several reversed-phase, diol, nitrile, cyclodextrin and immobilised artificial membrane-bonded high-performance liquid chromatography columns, *J. Chromatogr. A.* 797 (1998) 41–55.
- Viswanadhan V.N., Ghose A.K., Revankar G.R., Robins R.K., Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 29 (1989) 163–172.
- Yen T.E., Agatonovic-Kustrin S., Evans A.M., Nation R.L., Ryand J., Prediction of drug absorption based on immobilized artificial membrane (IAM) chromatography separation and calculated molecular descriptors, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 472–478.

6. Appendices

Table A1.01 Median and maximum standard deviation of the retention times of the runs

Column	Median standard deviation (min)	Maximum standard deviation (min)
C18	0.104	0.348
C8	0.085	0.804
C18-PG	0.302	0.586
HILIC	0.150	0.642
IAM	0.141	1.378

Table A1.02 Calibration compounds t_g and CHI values

IAM set standards	CHI- IAM	t_g IAM	C18 set standards	CHI- C18	t_g C18	t_g C8	t_g C18- PG
Octaphenone	49.2	18.36	Theophylline	15.76	6.57	6.025	6.52
Heptaphenone	45.4	16.60	Acetophenone	64.9	16.50	16.285	14.53
Valerophenone	37.1	11.43	Indole	69.15	19.77	19.685	18.90
Butyrophenone	32.2	7.56	Propiophenone	78.41	20.85	20.075	19.89
Propiophenone	26.6	4.03	Butyrophenone	88.49	24.25	23.13	22.27
Acetophenone	18.3	1.80	Valerophenone	97.67	27.40	25.785	25.40

Table A1.03: CHI values calculated from the standards calibration ($\pm 95\%$ confidence interval). In *italic*, extrapolated values given for more clarity.

	CHI -C18	CHI-C8	CHI-C18-PG	CHI-IAM
1. TPP mOH_3	<i>152 \pm 17</i>	<i>134 \pm 12</i>		77 \pm 9
2. TPP mOH_4	<i>134 \pm 13</i>	<i>117 \pm 9</i>		76 \pm 8
3. <i>m</i> -THPC	<i>130 \pm 13</i>	<i>118 \pm 9</i>		76 \pm 8
4. TPP pOH_3	<i>143 \pm 15</i>	<i>126 \pm 10</i>		84 \pm 10
5. TPP pOH_4	<i>116 \pm 10</i>	107 \pm 8		88 \pm 11
6. TPP($mGluOH$) ₁	<i>173 \pm 21</i>	<i>140 \pm 13</i>	<i>177 \pm 31</i>	75 \pm 8
7. TPP($pGluOH$) ₁	<i>170 \pm 20</i>	<i>136 \pm 12</i>	<i>182 \pm 32</i>	71 \pm 7
8. TPP($mGluOH$) ₂ 5-10	<i>117 \pm 11</i>	<i>104 \pm 7</i>	<i>124 \pm 17</i>	62 \pm 6
9. TPP($mGluOH$) ₂ 5-15	<i>99 \pm 8</i>	<i>91 \pm 6</i>	<i>111 \pm 14</i>	55 \pm 5
10. TPP($pGluOH$) ₂ 5-10	<i>108 \pm 9</i>	<i>98 \pm 7</i>	<i>119 \pm 15</i>	64 \pm 6
11. TPP($pGluOH$) ₂ 5- 15	<i>82 \pm 6</i>	<i>78 \pm 5</i>	<i>106 \pm 12</i>	56 \pm 5
12. TPP($mGluOH$) ₃	<i>81 \pm 6</i>	<i>77 \pm 5</i>	<i>89 \pm 9</i>	50 \pm 4
13. TPP($mGluOH$) ₄	<i>67 \pm 5</i>	<i>63 \pm 5</i>	<i>75 \pm 7</i>	44 \pm 3
14. TPP($pGalOH$) ₃	<i>66 \pm 5</i>	<i>64 \pm 4</i>	<i>80 \pm 8</i>	48 \pm 3
15. TPP($pGalOH$) ₄	<i>49 \pm 6</i>	<i>45 \pm 6</i>	<i>61 \pm 8</i>	39 \pm 2
16. TPP($pGluOH$) ₄	<i>52 \pm 6</i>	<i>48 \pm 6</i>	<i>62 \pm 7</i>	41 \pm 2
17. TPP(p -MEG-L-Fuc) ₃	<i>94 \pm 7</i>	<i>86 \pm 5</i>	<i>108 \pm 13</i>	56 \pm 5
18. TPP(p -MEG-D-Fuc) ₃	<i>94 \pm 7</i>	<i>86 \pm 5</i>	<i>108 \pm 13</i>	56 \pm 5
19. TPP(p -MEG-Man) ₃	<i>82 \pm 6</i>	<i>77 \pm 5</i>	<i>95 \pm 10</i>	54 \pm 4
20. TPP(p -DEG-Glu) ₃	<i>83 \pm 6</i>	<i>79 \pm 5</i>	<i>92 \pm 10</i>	49 \pm 4
21. TPP(p -DEG-Gal) ₃	<i>82 \pm 6</i>	<i>77 \pm 5</i>	<i>90 \pm 9</i>	49 \pm 4
22. TPP(p -DEG-Man) ₃	<i>87 \pm 6</i>	<i>81 \pm 5</i>	<i>97 \pm 11</i>	52 \pm 4
23. TPP[<i>p-dendr</i> (DEG-OH) ₃]	<i>148 \pm 16</i>	<i>120 \pm 10</i>	<i>151 \pm 24</i>	63 \pm 6
24. TPP[<i>p-dendr</i> (DEG-Man) ₃]	<i>116 \pm 11</i>	<i>101 \pm 7</i>	<i>119 \pm 15</i>	65 \pm 6
25. TPP[<i>p-dendr</i> (MEG-Man) ₃]	<i>117 \pm 11</i>	<i>102 \pm 7</i>	<i>121 \pm 16</i>	70 \pm 7
26. TPP[<i>p-dendr</i> (TEG-Man) ₃]	<i>113 \pm 10</i>	<i>101 \pm 7</i>	<i>120 \pm 16</i>	63 \pm 6

Table A1.04 k_{app} values with standard deviation

	k_{app} C18	k_{app} C8	k_{app} C18 PG	k_{app} IAM	k_{app} HILIC
1. TPP m OH ₃	36.5 ± 0.1	29.7 ± 0.4		86.5 ± 0.3	-2 ± 0.1
2. TPP m OH ₄	31 ± 0.1	25.8 ± 0.1		85 ± 3.8	-0.6 ± 0.2
3. m -THPC	30.8 ± 0.2	25.9 ± 0.1		84.2 ± 0.4	-0.4 ± 0.2
4. TPP p OH ₃	34.3 ± 0.2	27.7 ± 0.1		97.1 ± 2.3	-1.9 ± 0.1
5. TPP p OH ₄	27.3 ± 0.1	23.2 ± 0.2		104.1 ± 1.5	-0.6 ± 0.3
6. TPP(m GluOH) ₁	41.9 ± 0.3	31.1 ± 0.8	38 ± 0.3	74 ± 1.2	-1.3 ± 0.1
7. TPP(p GluOH) ₁	41 ± 0.1	30.2 ± 0.1	39 ± 0.4	76.9 ± 0.1	-1 ± 0.1
8. TPP(m GluOH) ₂ 5-10	27.6 ± 0.1	22.6 ± 0.2	25.7 ± 0.2	61.8 ± 0.4	5 ± 0.1
9. TPP(m GluOH) ₂ 5-15	22.9 ± 0.1	19.5 ± 0.04	22.9 ± 0.1	50.8 ± 0.2	3.3 ± 0.5
10. TPP(p GluOH) ₂ 5-10	25.3 ± 0.1	21.1 ± 0.2	24.6 ± 0.3	65.8 ± 0.5	5.7 ± 0.1
11. TPP(p GluOH) ₂ 5-15	18.5 ± 0.1	16.3 ± 0.05	21.7 ± 0.4	52.4 ± 0.2	3.7 ± 0.3
12. TPP(m GluOH) ₃	18.3 ± 0.1	16 ± 0.1	17.9 ± 0.1	42.7 ± 0.2	9 ± 0.1
13. TPP(m GluOH) ₄	14.6 ± 0.2	12.8 ± 0.04	14.5 ± 0.1	32.8 ± 0.2	12.1 ± 0.2
14. TPP(p GalOH) ₃	14.4 ± 0.4	12.9 ± 0.1	15.8 ± 0.2	39.7 ± 0.2	9.8 ± 0.6
15. TPP(p GalOH) ₄	10.1 ± 0.1	8.4 ± 0.1	11.3 ± 0.1	24.8 ± 0.2	13 ± 0.2
16. TPP(p GluOH) ₄	10.8 ± 0.1	9.1 ± 0.03	11.8 ± 0.2	27.2 ± 0.4	12.6 ± 0.1
17. TPP(p -MEG-L-Fuc) ₃	21.7 ± 0.1	18.2 ± 0.04	22.1 ± 0.4	51.4 ± 0.9	5.7 ± 0.1
18. TPP(p -MEG-D-Fuc) ₃	21.6 ± 0.1	18.2 ± 0.04	22.2 ± 0.3	51.5 ± 0.2	5.7 ± 0.1
19. TPP(p -MEG-Man) ₃	18.5 ± 0.2	16.1 ± 0.1	19.3 ± 0.1	48.3 ± 0.2	9.5 ± 0.1
20. TPP(p -DEG-Glu) ₃	18.8 ± 0.2	16.5 ± 0.03	18.6 ± 0.4	41.4 ± 0.3	9.8 ± 0.1
21. TPP(p -DEG-Gal) ₃	18.5 ± 0.2	16.2 ± 0.1	18.2 ± 0.5	41 ± 0.3	10.1 ± 0.1
22. TPP(p -DEG-Man) ₃	19.8 ± 0.2	17.1 ± 0.04	19.7 ± 0.2	45.3 ± 0.6	9.7 ± 0.1
23. TPP[p -dendr(DEG-OH) ₃]	35.5 ± 0.1	26.3 ± 0.1	32.1 ± 0.6	63.3 ± 1.1	4.4 ± 0.4
24. TPP[p -dendr(DEG-Man) ₃]	27.4 ± 0.1	21.9 ± 0.2	24.6 ± 0.3	66.4 ± 1.5	11.6 ± 0.1
25. TPP[p -dendr(MEG-Man) ₃]	27.6 ± 0.2	22.1 ± 0.3	25.1 ± 0.4	75 ± 1.2	11.9 ± 0.1
26. TPP[p -dendr(TEG-Man) ₃]	26.5 ± 0.1	21.8 ± 0.1	24.3 ± 0.3	64.3 ± 0.6	12.1 ± 0.4

CHAPITRE 2 : DE LA MEMBRANE CELLULAIRE AUX MODÈLES MEMBRANAIRES : ANALYSE LIPIDOMIQUE DE CELLULES Y79 ET ARPE-19 POUR LA CONSTRUCTION D'UN MODÈLE ARTIFICIEL APPLIQUÉ À L'ÉTUDE DE L'INTERACTION PORPHYRINE-MEMBRANE:

Dans la première partie de cette thèse, nous avons étudié l'interaction porphyrine-colonne chromatographique greffée par des chaînes de phosphatidylcholine. Dans ce chapitre, nous proposons d'élaborer un modèle artificiel tenant davantage compte de la composition complexe de la membrane cellulaire et des interactions latérales entre les molécules de lipides. Ce modèle construit en monocouche sera inspiré de l'analyse lipidomique des cellules de rétinoblastome (Y79). A des fins de comparaison, le lipidome d'une lignée saine d'épithélium rétinien (ARPE-19) sera également analysé.

Notre approche consiste plus précisément à :

- Extraire les lipides des cellules Y79 ou d'ARPE-19 mises en culture, mais aussi de leurs membranes plasmiques et mitochondriales après fractionnement.
- Analyser quantitativement et qualitativement ces lipides à l'aide de la spectrométrie de masse.
- Utiliser les résultats de l'analyse du lipidome afin de sélectionner, en nombre restreint, les lipides les plus pertinents. Etant donné que les phospholipides et le cholestérol sont les composants majoritaires de toute membrane cellulaire, un intérêt particulier sera accordé à ces lipides.
- Construire des modèles en monocouche de la membrane plasmique et mitochondriale et comparer leurs propriétés de compressibilité à celles de monocouches formées par les extraits lipidiques cellulaires
- Enfin, étudier l'interaction du modèle avec une porphyrine d'intérêt.

Avant de présenter les expériences réalisées pour atteindre cet objectif, je vais dans un premier temps, introduire les lipides, la lipidomique et la spectrométrie de masse, puis les modèles membranaires en monocouche.

1. La membrane biologique

L'une des fonctions primordiales de la membrane est la séparation entre deux milieux aqueux. Ainsi, la membrane plasmique sépare les cellules du milieu extérieur et des autres cellules. Cette séparation n'est pas absolue car la membrane biologique est caractérisée par une perméabilité sélective : une perméabilité qui lui permet d'interagir avec son environnement extérieur par le passage de sels et de nutriments essentiels, par exemple, et le relargage des éléments toxiques endogènes. La membrane biologique est capable de distinguer entre les différents éléments chimiques et de reconnaître le sens de leur distribution. Outre ces fonctions de compartimentation et de régulation du transport des solutés, la membrane possède plusieurs autres fonctions, parmi lesquelles la régulation du métabolisme, la reconnaissance des antigènes, la transduction des signaux, le maintien des gradients ioniques et la fonction de site de réactions chimiques (Schindler, 1980). Il est à noter que la surface de la membrane biologique de certains organelles tels que le réticulum endoplasmique ou les mitochondries est plus importante que celle de la membrane plasmique.

Les protéines, les lipides et les carbohydrates sont les composants majoritaires de la membrane biologique. S'il est d'une certaine évidence que le taux des protéines est plus élevé que celui des lipides, ceci n'est pas le cas pour toutes les cellules : en effet, le taux de protéines peut varier de 20% à 80%.

2. Isolement de la membrane biologique

La séparation des organelles du reste de la cellule est une procédure délicate. Elle est réalisée après fractionnement des cellules. Le principe consiste à lyser les cellules dans certaines conditions tout en gardant les organelles intacts. Le fractionnement des cellules de tissus semble être plus compliqué que celui des cellules étant donné que l'organisation cytoplasmique varie d'une cellule à une autre. Aussi, il est important d'optimiser les conditions pour chaque tissu et lignée cellulaire (Howell et al., 1989).

Le fractionnement cellulaire est un processus comportant deux étapes principales : l'homogénéisation des cellules puis la séparation des organelles.

- *Homogénéisation* : La procédure la plus commune est d'effectuer l'homogénéisation dans une solution légèrement hypotonique : le tampon doit être proche de la neutralité et l'osmolarité doit être contrôlée par du saccharose (par exemple) afin d'éviter

l'agrégation ou la lyse des organelles. Cependant, certaines cellules sont difficiles à lyser et nécessitent des conditions hypotoniques (imidazole ou Tris).

- *Séparation des organelles* : plusieurs techniques ont été développées, mais les plus répandues sont (a) la centrifugation différentielle qui se base sur la différence de tailles des organelles, et (b) l'équilibre dans un gradient de saccharose, Ficoll ou Percoll après centrifugation. Ce dernier se base sur la différence de densité des organelles en fonction de la concentration de la solution hypotonique (Howell et al., 1989). Suite au fractionnement cellulaire, il est possible d'extraire les membranes des organelles, les protéines ou les lipides pour plus d'analyses biochimiques.

3. Les lipides et la lipidomique :

3.1. Les lipides et leurs fonctions biologiques :

Les lipides sont des molécules hydrophobes ou amphiphiles, de structure non polymérique contrairement aux protéines et aux acides nucléiques. Leur masse moléculaire est inférieure à 2000 g/mol (Wenk, 2010). Les lipides présentent une grande diversité structurale illustrée par la longueur de la chaîne, les substitutions réductives ou oxydatives, la nature des résidus substitués (sucres ou autre groupements fonctionnels). Tout dépend de l'origine de leur biosynthèse (Fahy et al., 2011). En effet, la majorité des lipides biologiques sont des combinaisons de chaînes aliphatiques et groupes polaires reliés à une structure de glycérol ou de sphingoside, mais peuvent aussi être composés de chaînes aliphatiques liées de manière covalente au cholestérol (Sandra and Sandra 2013).

Les lipides jouent plusieurs rôles biologiques (Rolim et al., 2014) et (Li et al.2014):

- **Stockage de l'énergie** : cette fonction est assurée principalement par les acides gras qui peuvent être saturés, mono-insaturés ou polyinsaturés. Les triacylglycérols représentent la forme de stockage d'énergie la plus abondante dans l'organisme, sous forme de dépôt dans les tissus des muscles.
- **Structure de la bicouche des membranes cellulaires** : elle est assurée par les phospholipides. Les acides gras polyinsaturés constituant ces phospholipides assurent une fluidité et flexibilité aux membranes. Ils fournissent ainsi un environnement hydrophobe pour les protéines membranaires et leurs interactions.

- Participation aux différentes voies de signalisation cellulaires en tant que messagers secondaires, d'où ils peuvent être utilisés comme des bio-marqueurs de certaines maladies.

Grâce à cette diversité structurale, à la variabilité des fonctions et surtout à l'implication dans le diagnostic de certaines maladies, la lipidomique a évolué en tant que domaine de recherche émergent.

3.2. La lipidomique et les bases de données

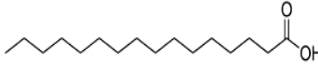
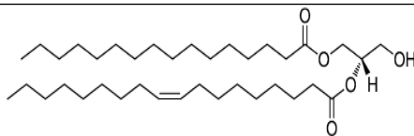
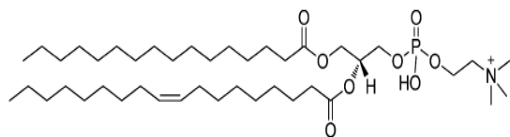
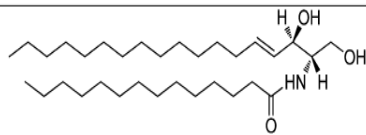
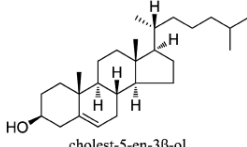
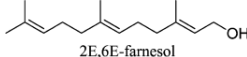
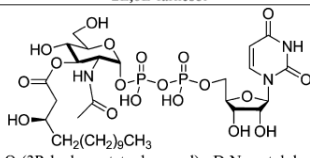
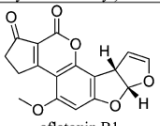
En 2003, la définition de la lipidomique a été établie comme étant : « *La caractérisation complète des espèces moléculaires des lipides et de leurs rôles biologiques par rapport à l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme et la fonction des lipides, y compris la régulation génétique* » (Spener & Lagarde, 2003). La revue de Rolim et al. en 2014 détaille l'évolution de cette définition à travers les années. La lipidomique inclut à présent la quantification des lipides à un instant et dans un espace donné.

Il existe dans la nature une myriade de lipides. En raison de leur diversité et de leur complexité fonctionnelle, des bases de données ont été développées afin de regrouper et classer les différentes structures. Certaines bases donnent plus particulièrement des informations sur les caractéristiques biophysiques comme LIPIDAT, et d'autres sur les données spectrales et les propriétés biologiques telle que LIPID BANK. Toutefois, la base de données la plus répandue de nos jours est LIPID MAPS. Cette base a trouvé en 2005 sa propre nomenclature et identification des lipides, une nomenclature qui est apparue la plus adaptée par la suite (Fahy et al., 2011). A ce jour, LIPID MAPS est une bonne référence dans la lipidomique, et est constamment mise à jour. LIPID MAPS divise les lipides en acides gras, glycérolipides, glycérophospholipides, sphingolipides, saccharolipides, lipides stérols, lipides pré-nols et polyketides. Chaque catégorie de lipides est divisée en classes et sous classes (Li et al., 2014). On recense un peu plus de 40 000 lipides classés en 8 catégories (Tableaux 2.01 et 2.02).

Tableau 2.01 : Recensement statistique des lipides identifiés sur LIPIDMAPS
Dernière mise à jour 04/2015

	Nombre des structures
Acides gras	6954
Glycérolipides	7542
Glycérophospholipides	9387
Sphingolipides	4352
Lipides stérols	2833
Lipides prénols	1257
Saccharolipides	1293
Polyketides	6742
TOTAL	40,360 structures

Tableau 2.02: Les différentes catégories des lipides (Li et al., 2014)

Categories	Structures Exemples	Typical Classes: Subclasses
Fatty acyls, FA	 hexadecanoic acid	Fatty acids: straight-chain fatty acids Eicosanoids Fatty alcohols Fatty esters Fatty amides
Glycerolipids, GL	 1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycerol	Monoradylglycerols: monoacylglycerols Diradylglycerols: diacylglycerols Triradylglycerols: triacylglycerols
Glycerophospholipids, GP	 1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	Glycerophosphocholines Glycerophosphoethanolamines Glycerophosphoserines Glycerophosphoglycerols Glycerophosphoglycerophosphates Glycerophosphoinositols Glycerophosphoglycerophosphoglycerols
Sphingolipids, SP	 N-(tetradecanoyl)-sphing-4-enine	Sphingoid bases Ceramides Phosphosphingolipids Neutral glycosphingolipids Acidic glycosphingolipids
Sterol lipids, ST	 cholest-5-en-3β-ol	Sterols Cholesterol and derivatives Steroids Bile acids and derivatives
Prenol lipids, PR	 2E,6E-farnesol	Isoprenoids Quinones and hydroquinones Polyprenols
Saccharolipids, SL	 UDP-3-O-(3R-hydroxy-tetradecanoyl)-αD-N-acetylglucosamine	Acylaminosugars Acylaminosugar glycans Acyltrehaloses Acyltrehalose glycans
Polyketides, PK	 aflatoxin B1	Macrolide polyketides Aromatic polyketides Nonribosomal peptide/polyketide hybrids

4. La classification des lipides : (Fahy et al. 2005 ; Fahy et al. 2011)

4.1. Les acides gras

Les acides gras sont des molécules synthétisées par une élongation de la chaîne d'un acétyl-CoA primer avec des groupes de malonyl-CoA (ou méthylmalonyl-CoA) pouvant contenir une fonctionnalité cyclique et/ou substituée avec des hétéroatomes. Ils sont les précurseurs de certains lipides biologiques tels que les eicosanoïdes ou les prostaglandines. Les acides gras peuvent former des blocs pour les acylglycérols, les stérol-esters et les sphingolipides. La grande diversité structurale de lipides est due aux différentes combinaisons possibles des acides gras et des têtes polaires fonctionnelles.

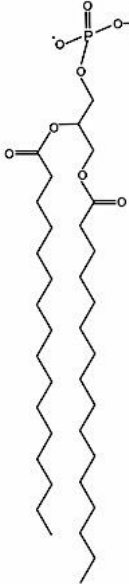





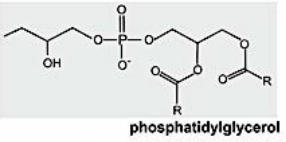
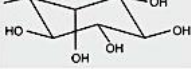
4.2. Les glycérolipides

Les glycérolipides sont des composés formés de mono ou di ou tri glycérols substitués. Les plus connus de cette catégorie sont les triacylglycérols. Certaines sous-classes sont caractérisées par la présence d'un ou plusieurs résidus de sucre reliés au glycérol.

4.3. Les glycérophospholipides

Les glycérophospholipides sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée en position sn-1 et sn-2 par des acides gras. En position sn-3, la fonction alcool du glycérol est estérifiée par l'acide phosphorique. Ce dernier est à son tour estérifié par une molécule polaire. Selon la nature de la tête polaire du phospholipide, on distingue les classes des phosphatidyl-choline, phosphatidyl-éthanolamine, phosphatidyl-sérine, cardiolipine, phosphatidyl-acide, phosphatidyl-glycerol et phosphatidyl-inositol. L'association des acides gras et de la molécule polaire apporte un caractère amphiphile aux phospholipides (Tableau 2.03).

Tableau 2.03 : Représentation des têtes polaires des classes des phospholipides (Aktas et al., 2014)

Basic phospholipid structure	Substituent (X)	Phospholipid/Characteristic
		hydrogen PA anionic
		ethanolamine PE zwitterionic
		choline PC zwitterionic
		serine PS anionic
		glycerol PG anionic
		phosphatidylglycerol CL anionic
		inositol PI anionic

4.4. Les sphingolipides

Tout comme les phospholipides, les sphingolipides ont une tête polaire et deux chaînes aliphatiques. En revanche, l'une des chaînes est liée à la fonction alcool par un ester d'amide (et non pas un ester d'oxygène comme les phospholipides) et l'autre chaîne est invariable et non hydrolysable : c'est la sphingosine (une chaîne de C18 + un groupement amine + un groupement alcool). Cette catégorie se divise en classes. Selon la variation de la tête polaire, on distingue, par exemple, les céramides, la sphingomyéline, les gangliosides, les globosides et les cérébrosides (Tableau 2.04).

Tableau 2.04 : Les familles des sphingolipides et les têtes polaires liées à la sphingosine.

Name	Attached group
Ceramide	-H
Sphingomyelin	phosphocholine, phosphoethanolamine
Cerebroside	glucose or galactose
Globoside	di, tri, or tetra saccharide
Ganglioside	complex oligosaccharide (always with at least one sialic acid)

4.5. Les lipides stérols

Les lipides stérols sont des structures composées d'un groupement OH, de 4 structures cycliques et une queue dont la fonction n'est pas encore bien définie. La sous-classe du cholestérol et ses dérivés est la plus connue de la classe des stérols. La classe des stéroïdes est divisée en plusieurs sous-classes selon le nombre des carbones : les stéroïdes C18 comme les œstrogènes, les stéroïdes C19 comme les androgènes (testostérone) et les C21 renfermant les progestérones et les gluco-corticoides.

4.6. Autres lipides

- Les prénols : les prénols sont synthétisés à partir de précurseurs à 5 atomes de carbone, l'isopentényl diphosphate et le diméthylallyl diphosphate. Ils sont classés selon le nombre de leurs unités terpènes.
- Les saccharolipides : ce sont des composés dans lesquels les chaînes des acides gras sont liées à une squelette de sucres (un sucre remplace le glycérol dans le phospholipide).
- Les polyketides : ils sont formés par la polymérisation d'un groupement acétyl et un propionyl ; Ils font partie de métabolites secondaires.

5. Structure de la membrane cellulaire : rôle des lipides

Les lipides sont les constituants majeurs de la bicouche membranaire. Les glycérophospholipides et les sphingolipides assurent une certaine polarité à la membrane, alors que les stérols, plus précisément le cholestérol qui est le plus abondant, sont responsables du caractère apolaire de la bicouche. Mais ceci dépend aussi de l'organelle en question, car les lipides ne sont pas distribués d'une façon uniforme au sein des cellules. A titre d'exemple, la membrane externe de la mitochondrie contient plus de cholestérol que la membrane interne.

Par ailleurs, la répartition des phospholipides est asymétrique de part et d'autre de la membrane plasmique. Ce modèle a été suggéré pour la première fois en 1972, la même année que le modèle mosaïque et fluide de la membrane proposé par Singer et Nicolson (Singer et Nicolson 1972). Chez les mammifères, il a été démontré que la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline (SM) sont plutôt localisées du côté externe de la membrane. En revanche, le

feuillet interne est plus enrichi en phosphatidyléthanoline (PE) et en phospholipides chargés négativement (phosphatidylinositol, PI, et phosphatidylsérine, PS). Le cholestérol se trouve des deux côtés avec une concentration un peu plus élevée dans la membrane interne (Van Meer et al. 2011). Cette asymétrie n'est pas un état d'équilibre : elle doit être maintenue constamment par un processus actif mettant en jeu des protéines bien particulières telles que les amino-phospholipides translocases ATP-dépendantes qui agissent dans un sens unique en faisant passer la PS et la PE du feuillet externe au feuillet interne de la membrane. D'autres protéines, les flippases (e.g scramblase), jouent aussi un rôle dans le mouvement des lipides cette fois dans le deux sens. Elles sont ATP-indépendantes et ne peuvent pas accumuler les lipides dans un feuillet particulier comme les translocases (Pomorski et al. 2001). L'asymétrie de la membrane biologique est importante pour le maintien de la charge à surface de la membrane, sa perméabilité, sa morphologie et sa stabilité... Cependant, tout déséquilibre de cette asymétrie peut être relié à des modifications physiologiques : il a été démontré que la PS passe à la membrane externe quand la cellule est en apoptose, ce qui permet sa présentation aux macrophages. Au niveau des cellules sanguines, la PS passe aussi du côté externe de la cellule lors de la coagulation (Pomorski et al., 2001). Si cette asymétrie de la bicouche membranaire semble être bien déterminée, elle suscite tout de même encore un débat. Récemment, Murate et collaborateurs ont ré-analysé cette distribution en utilisant la microscopie électronique. Ils ont montré qu'il existe une variation dans le pourcentage de distribution membranaire d'un même phospholipide (Murate et al., 2015) et que cette variation est corrélée à la technique utilisée. Ceci pourrait justifier les différences des valeurs rapportées dans la littérature (Murate & Kobayashi, 2015).

La phosphatidylcholine (PC) est le phospholipide majoritaire chez les mammifères ; Elle peut être synthétisée par méthylation de l'azote de la PE. Contrairement à la PE, la PC ne peut pas interagir avec d'autres têtes polaires par des liaisons hydrogènes.

La phosphatidyléthanoline (PE) est le deuxième lipide majoritaire ; Sa fonction amine chargée positivement et sa fonction phosphate négativement à pH physiologique font de la PE un phospholipide zwitterionique. Tout comme la PC, elle joue principalement un rôle dans la structure de la membrane. Par conséquent, elles influencent toutes deux la fluidité de la membrane, mais c'est la PE qui est plus fluide que la PC à une même température, et avec les mêmes chaînes aliphatiques.

Dans les conditions du pH physiologique, l'acide phosphatidique (PA) possède une charge nette de -1.5. Par ce caractère anionique, il contribue à la charge négative globale de la membrane. Le PA est un constituant important dans la cellule : il possède plusieurs fonctions biologiques et peut altérer l'activité d'une dizaine de protéines. Cependant, il est converti rapidement par des enzymes de type lipide phosphate phosphorylases en diacylglycérol (DAG), ce qui le maintient à de faibles concentrations.

La phosphatidylsérine (PS) possède plusieurs fonctions biologiques. Elle est plus concentrée au niveau du cerveau que dans les autres membranes. Des études ont montré que sa concentration diminue avec l'âge. Au niveau de la membrane cellulaire, elle permet l'ancrage et l'activation de certaines ATPase, kinases, récepteurs... Elle est aussi impliquée dans l'interaction cellule-cellule, quand elle est exposée vers l'extérieur de la cellule dans certaines conditions telles que l'apoptose. Tout comme PA, grâce à son caractère anionique, elle peut interagir avec les métaux divalents (Ca^{2+}) (Leventis & Grinstein, 2010)

Le phosphatidylinositol (PI), un phospholipide anionique se trouvant à de faibles concentrations ne joue pas un rôle important dans la structure de la bicouche. Il est souvent phosphorylé en positions 4 et 5 (et parfois 3) de la chaîne d'inositol. Ceci induit la formation de phosphates de phosphatidylinositol ou de polyphosphoinositides. Le PI 4,5-bisphosphate (PIP_2) est le phosphoinositide le plus abondant. Les PIs sont une source principale pour le DAG (qui à son tour joue un rôle important dans l'activation de certaines enzymes de signalisation). Ils sont responsables, entre autres, de l'ancrage de certaines protéines (GPI) à la surface membranaire par des ponts glycosidiques, jouent un rôle de cofacteur des phospholipase D dans la biosynthèse de PA, et jouent un rôle dans la morphologie de la cellule en interagissant avec l'actine.

Le phosphatidylglycérol (PG) se trouve aussi à de très faibles concentrations (2% du total des phospholipides) dans les membranes. Il joue le rôle de précurseur dans la biosynthèse de la cardiolipine (CL). Cette dernière est formée de deux PA reliés à un glycérol. CL est le seul phospholipide qui n'est pas synthétisé dans le réticulum endoplasmique mais dans la mitochondrie. Ceci fait qu'il est plus abondant dans la membrane interne de cet organelle. CL joue un rôle dans la phosphorylation oxydative et le processus bioénergétique de la mitochondrie (le transport des électrons) (Houtkooper & Vaz, 2008).

Les stérols, par leur groupement polaire OH, sont ancrés au niveau de l'interface aqueuse de la membrane. En raison de la rigidité des quatre groupements aromatiques, les stérols jouent un rôle dans la structure de la membrane. Le cholestérol (Chol) est le plus connu de cette famille, il est un précurseur de plusieurs hormones stéroïdiennes. Estérifié par des acides gras, le cholestérol peut être stocké sous forme de granules cytosoliques pour former des particules de lipoprotéine (LDL).

La sphingomyéline (et les glycosphingolipides) est plus concentrée dans la bicouche externe de la membrane. Elle est synthétisée dans l'appareil de golgi mais sa synthèse est précédée par celle d'un précurseur, le céramide. Ce dernier est transloqué du réticulum endoplasmique vers l'appareil de golgi. La voie de synthèse la plus probable est le transfert d'un groupement phosphocholine d'une phosphatidylcholine sur un céramide afin de synthétiser la sphingomyéline. La sphingomyéline est essentiellement impliquée dans la formation de micro-domaines ou radeaux lipidiques (« lipid raft ») avec le cholestérol au niveau de la membrane cellulaire. Ces structures sont caractérisées par une rigidité et par une résistance au détergents (Shayman, 2000). Des expériences de dégradation de la phosphatidylcholine par une enzyme dans la membrane plasmique des fibroblastes ont montré que ceci n'affecte pas la distribution du cholestérol au niveau de la membrane, contrairement à ce qui se produit dans le cas de dégradation de la sphingomyéline. Ceci prouve la forte interaction entre le cholestérol et la sphingomyéline (Porn et al., 1993).

6. Localisation subcellulaire des lipides:

Outre cette distribution des phospholipides de part et d'autre de la membrane biologique, il existe une distribution non homogène de ces lipides entre les organelles. En effet, certaines organelles sont plus enrichies par certaines espèces lipidiques que d'autres. Toutefois, le réticulum endoplasmique est le site de biosynthèse de la majorité des lipides, comme par exemple les phospholipides et le cholestérol. C'est à partir de RE que les lipides sont distribués différemment dans les organelles (van Meer et al., 2008). D'une manière générale, dans les cellules saines, la PC est majoritaire dans tous les organelles. En second lieu, on trouve la PE ; la membrane plasmique est riche en sphingomyéline et cholestérol ; la CL se trouve principalement au niveau de la mitochondrie et le taux de la PI est particulièrement élevé au niveau du RE et des endosomes (van Meer et al., 2008).

En revanche, dans les cellules tumorales, le métabolisme de lipides et par conséquent, la composition lipidique sont altérés (Santos & Schulze 2012). Kiebish et al., 2008 ont démontré que la composition et le contenu en cardiolipine de mitochondries isolées du cerveau tumoral de souris sont très différents de la mitochondrie du cerveau sain. Ces différences ont été associées à des altérations de l'activité de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie. Dória et ses collaborateurs (2013) ont, quant à eux, comparé les phospholipides de cellules épithéliales mammaires et ceux de cellules de cancer du sein. Ils ont remarqué une diminution quantitative de PE, PC et SM, principalement dans les cellules tumorales, et une invariabilité au niveau de PI, CL et PS. Cependant, qualitativement ils ont trouvé une différence au niveau des espèces de la PI mais aussi de la PC et de la SM, avec, d'une manière globale, une diminution du nombre des insaturations. Il existe de nombreuses autres études comparables.

7. Analyse des lipides par spectrométrie de masse (MS):

Une des méthodes largement utilisée pour l'analyse d'un lipidome est la spectrométrie de masse. Le développement technologique de différentes sources d'ionisation et d'analyseurs ont élargi l'utilisation de cette technique.

7.1. La spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse est composé principalement de trois parties : une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur. Tout d'abord l'échantillon est ionisé, puis les ions sont séparés dans l'analyseur pour être enfin détectés selon leur rapport masse sur charge m/z (figure 2.01)

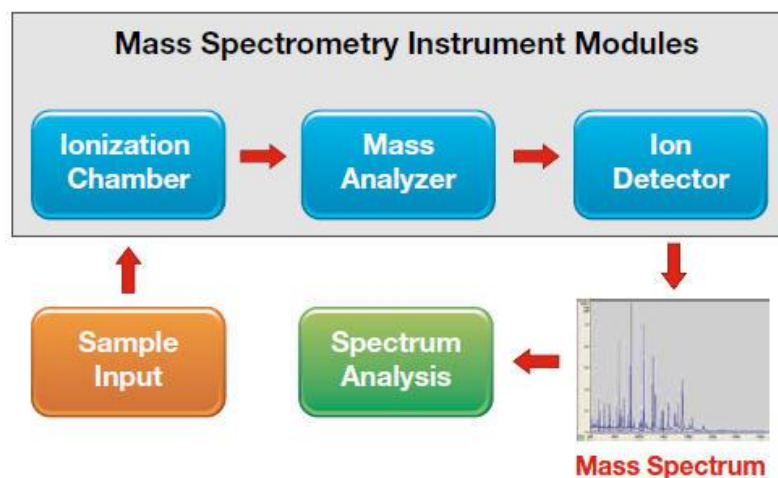


Figure 2.01: principe d'une analyse par spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse est souvent couplé en amont à la HPLC, GC ou SFC pour séparer les échantillons à analyser avant leur ionisation (ce qui évite la superposition des espèces ayant la même masse). La MS est l'une des techniques qui permettent de déterminer la structure des molécules ; La détermination peut être totale ou partielle selon la complexité de l'échantillon et la chromatographie qui précède.

Au cours de la première étape d'ionisation, les molécules, à priori neutres en solution, rencontrent du gaz et s'ionisent. Les ions formés portent une charge positive ou négative. La première source qui est apparue est la FAB (Fast Atomic Bombardement). Par la suite d'autres sources plus « douces » se sont développées comme l'électrospray (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) (qui seront plus présentées plus loin), mais aussi la photoionisation à pression atmosphérique (APPI), l'ionisation par impact électronique (I.E.), l'ionisation chimique (CI) et la MALDI Désorption/Ionisation laser assistée par matrice.

Les ions ionisés sont ensuite introduits dans un analyseur. Il existe plusieurs types d'analyseurs : trappe à ion quadripole, trappe à ion linéaire, résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR), Orbitrap, quadripole (Q) et time of flight (TOF).

Dans ce chapitre, nous présenterons les sources ESI, APCI et Orbitrap qui ont été utilisées dans notre analyse lipidomique.

- La source d'ionisation ESI

Le choix de la source d'ionisation dépend principalement de l'échantillon à analyser et de ses caractéristiques d'ionisation. Certaines sources sont plus adaptées aux molécules polaires, d'autres aux analytes plutôt apolaires (figure 2.02).

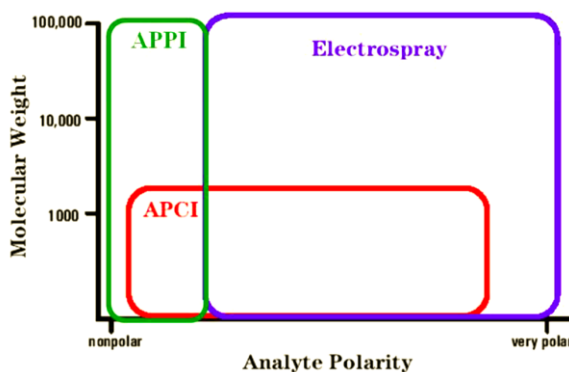


Figure 2.02 : Variation du choix de la source d'ionisation en fonction de la polarité et de la taille de l'échantillon (Source Internet)

La source ESI, aussi appelée ionisation par électronébuliseur, a été développée pour la spectrométrie de masse par Fenn et al., en 1989 ; Elle peut se définir comme une méthode qui utilise de l'énergie électrique pour la formation d'ions. En effet, l'analyte est drainé dans un capillaire sous un potentiel électrique élevé. Le champ électrique appliqué à la sortie du capillaire induit la formation de plusieurs gouttelettes chargées. Ces gouttelettes avant d'arriver à l'analyseur se trouvent dans un champ électrique et sous pression très élevés. Ceci induit une évaporation du solvant et la diminution de la taille des gouttelettes chargées sous l'effet des explosions coulombiennes. De petites gouttelettes toujours chargées sont ainsi formées et qui finissent par se trouver dans l'analyseur (Figure 2.03)

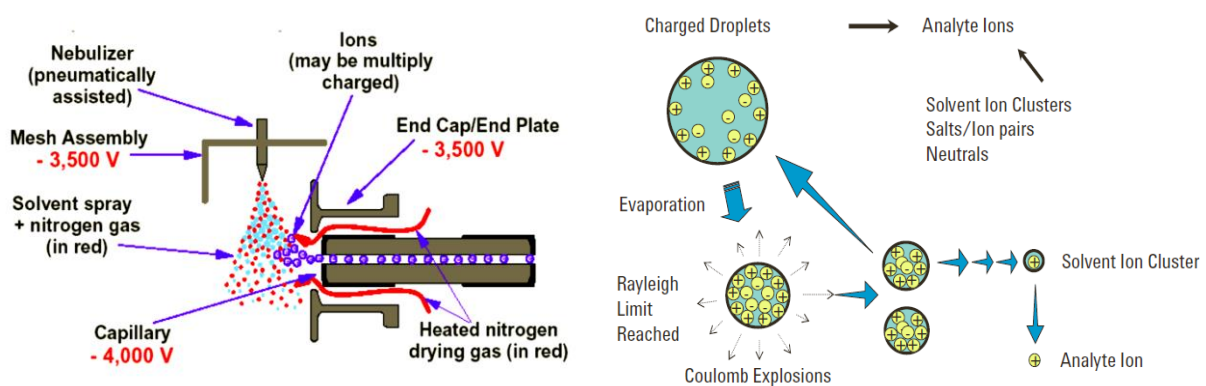


Figure 2.03 : illustration du principe de l'ionisation électrospray (ESI) (Source Internet)

L'ionisation ESI a plusieurs avantages:

- Elle est bien adaptée aux molécules chargées, polaires et basiques.
- Elle permet la détection de composés ayant un poids moléculaire élevé, à un rapport m/z détectés par la plupart des analyseurs.
- Elle permet le contrôle de la fragmentation en contrôlant le potentiel entre les électrodes.
- Elle est compatible avec les méthodes MS/MS.

Elle possède aussi un certain nombre d'inconvénients:

- Elle est complémentaire de l'APCI, mais ne peut s'y substituer, car elle n'est pas adaptée aux molécules non chargées, acides et apolaires (ou avec une faible polarité)
- Il est difficile d'analyser les données pour les molécules multichargées.
- Elle est sensible aux contaminants.

- La source d'ionisation APCI

L'ionisation APCI se déroule à des températures élevées et à pression atmosphérique. Elle est efficace pour les analytes polaires. Tout comme l'ESI, elle génère des ions positifs ou négatifs. Elle ne fournit pas des ions multichargés. Elle est plus adaptée à des molécules de petit poids moléculaire.

- L'analyseur Orbitrap

L'Orbitrap est considéré comme l'analyseur de la nouvelle génération. Il a fait son apparition en 2000 (Makarov, 2000); Son principe se fonde sur un piégeage électrostatique axial harmonique orbitalaire. Les ions sont injectés dans l'espace séparé par deux électrodes de forme géométrique parfaitement définie. Suivant son rapport masse/charge, l'ion va osciller autour de l'électrode centrale avec une fréquence caractéristique. La mesure de cette fréquence permet d'atteindre une grande précision et de séparer des ions de masses très proches.

Les trajectoires sont stables mais pour injecter les ions, une C-trap est généralement installée en amont.

- La C-trap :

Elle permet d'introduire les ions sous forme de paquets bien définis dans le temps, mais il faut assurer une stabilisation de l'ion en augmentant le potentiel. Les ions entrent en contact avec le gaz N₂ venant de la cellule HCD, ce qui permet de les refroidir et d'empêcher leur fragmentation dans l'Orbitrap.

7.2. Le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Velos Pro

Dans ce projet, le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap a été utilisé (Figure 2.04). C'est un appareil hybride formé de double trappe ionique linéaire, couplée à la trappe orbitalaire à transformée de Fourier (piège à ions électrostatique). Ceci permet de combiner les avantages de la trappe linéaire (haute sensibilité, gamme dynamique élevée, temps de cycle rapide et une capacité de réaliser des analyses MS en tandem) avec ceux d'un analyseur à transformée de

Fourier (haute précision en masse, et haute résolution), utilisant un champ électrostatique. Cet appareil est donc caractérisé par :

- Une résolution entre 7500 et $> 100\ 000$
- Une gamme de masse entre m/z 50-2000 et m/z 200-4000
- Une précision $< 3\text{ppm}$ pour la calibration externe et $< 1\text{ppm}$ pour la calibration interne.
- Une sensibilité de l'ordre de la femtomole
- Une gamme dynamique > 4000 pour un seul scan.
- Une MS^n avec $1 < n < 10$.

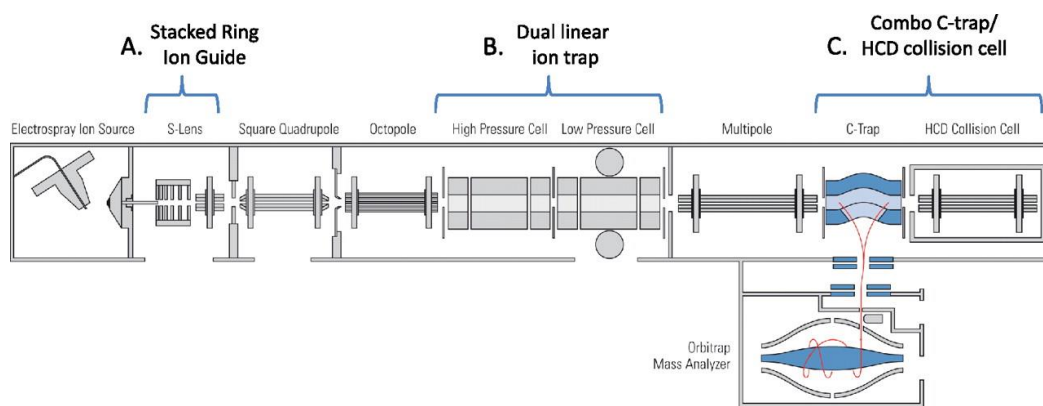


Figure 2.04 : Schéma représentatif de LTQ-Orbitrap Velos Pro.

8. Modèles membranaires et monocouches lipidiques

Les monocouches de lipides sont formées par étalement de petits volumes de solutions organiques de lipides à l'interface air/eau ou air/tampon. Après évaporation du solvant, un film monomoléculaire se forme à la surface. Les propriétés de ce film peuvent être analysées par diverses techniques. Les grandeurs thermodynamiques et la compressibilité des monocouches qui nous intéressent plus particulièrement dans cette thèse ont été déterminées à l'aide d'une balance de Langmuir. Nous avons analysé l'interaction de porphyrines avec les monocouches à l'aide d'un tensiomètre.

8.1. La balance de Langmuir

Une balance de Langmuir est constituée d'une cuve de faible profondeur et d'une large surface exposée à l'air, d'un capteur de force et de deux barrières affleurant la surface et mobiles latéralement. Cette cuve est remplie d'une phase aqueuse et les molécules de lipides sont déposées à sa surface. Après évaporation du solvant, la monocouche est comprimée par déplacement des barrières mobiles l'une vers l'autre. Le capteur de force, reliée à une lame de platine parfaitement nettoyée happée par le liquide, enregistre le changement de tension superficielle qui se produit sous l'effet de la diminution de l'aire (A) de surface disponible pour l'organisation des molécules adsorbées. La tension superficielle (γ) est reliée à la pression de surface (π) par la relation: $\pi = \gamma_0 - \gamma$ avec γ_0 la tension superficielle de la sous-phase aqueuse et γ , celle de cette sous-phase en présence du film adsorbé. Les isothermes π -A enregistrées ont plus ou moins le profil présenté dans la Figure 2.05.

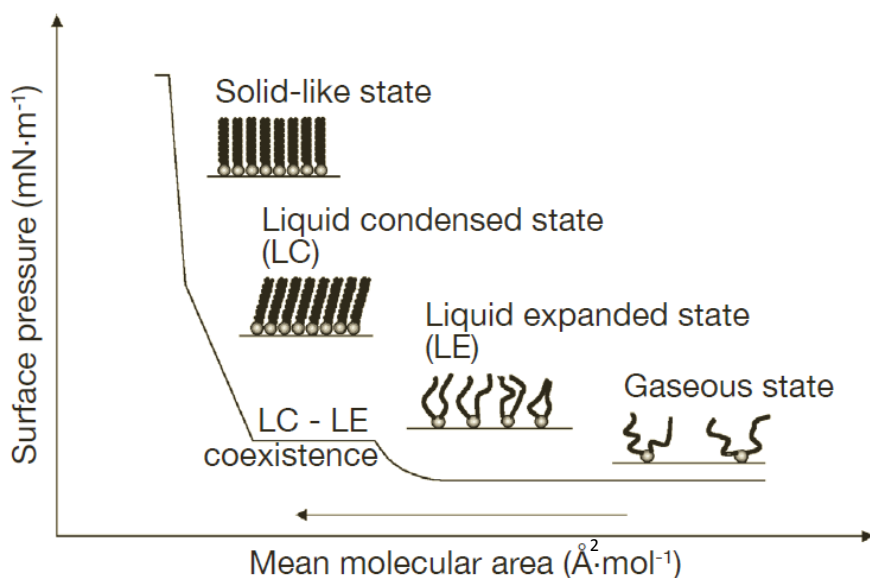


Figure 2.05 : Isotherme de compression caractéristique π -A (Eeman & Deleu 2010).

On distingue 4 états d'organisation possible des molécules à l'interface : l'état « gazeux » (pression de surface nulle), l'état liquide-expansé, l'état liquide-condensé et l'état solide. Lorsque la surface disponible ne permet plus de contenir toutes les molécules, la monocouche s'effondre (collapse). La pression et l'aire de collapse sont des grandeurs thermodynamiques

caractéristiques d'un composé donné. Il est possible de déterminer la compressibilité de la monocouche en appliquant l'équation :

$$C_s = -\frac{1}{A} \left(\frac{dA}{d\pi} \right)$$

On utilise généralement le module de compressibilité qui est l'inverse de la compressibilité (C_s^{-1}) pour caractériser l'état d'organisation/désorganisation d'une monocouche :

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{d\pi}{dA} \right)$$

Les monocouches ayant un module de compressibilité inférieur à 100 mN/m sont considérées comme désorganisées (peu rigides), celles ayant un module de compressibilité supérieur à 100 mN/m mais inférieur à 250 mN/m comme liquides-condensées (état d'organisation/rigidité intermédiaires) et celles ayant un module de compressibilité supérieur à 250 mN/m, comme étant solides (état d'organisation/rigidité élevés).

8.2. Tensiomètre

Le tensiomètre est lui-aussi constitué d'une cuvette et d'un capteur de force relié à une lame de platine permettant de mesurer la tension superficielle. Mais il n'y a pas de barrière de compression. Cet instrument permet de mesurer, à surface constante, la tension superficielle d'un film adsorbé soit par diffusion vers la surface de molécules solubles dans la sous-phase, soit par dépôt de molécules insolubles à la surface (comme dans la balance de Langmuir). Nous avons utilisé cette méthode pour analyser l'interaction de deux porphyrines avec les monocouches modèles, en injectant les porphyrines sous la surface recouverte du film lipidique.

9. Conception d'un modèle artificiel de membrane plasmique sous forme de monocouche, à partir d'une analyse lipidomique des cellules Y79 et ARPE-19.

Cette étude est présentée, ci-après, sous la forme d'un article à soumettre.

Artificial Plasma Membrane Models Based on Lipidomic Profiling.

Donia Essaid^{a,b}, Véronique Rosilio^{a*}, Katia Daghdjian^a, Audrey Solgadi^c, Juliette Vergnaud^a, Athena Kasselouri^b, Pierre Chaminade^b.

^a Institut Galien Paris Sud, UMR 8612, Univ Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.B. Clément, F-92290 Châtenay-Malabry, France.

^b Lip(Sys)²- Chimia Analytique Pharmaceutique (FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud), Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-92290 Châtenay-Malabry, France.

^c Institut Paris-Saclay d'Innovation Thérapeutique, UMS IPSIT SAMM, Châtenay-Malabry, France.

*** To whom correspondence should be addressed**

Abbreviations:

DPPC: dipalmitoylphosphatidylcholine; DOPC: dioleoylphosphatidylcholine; SOPC: stearyl-oleoylphosphatidylcholine; SOPE: stearyl-oleoylphosphatidylethanolamine; SOPS: stearyl-oleoylphosphatidylserine; POPC: palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine; SAPE: stearyl-arachidonoyl-phosphatidylethanolamine; SDHAPC: stearyl-docosahexaenoic phosphatidylcholine; CL: cardiolipin; TPP: tetraphenylporphyrin.

Abstract

Retinoblastoma is an eye tumor that may develop in childhood. It could be treated by photodynamic therapy, a treatment modality that combines the intravenous injection of a photosensitizer, and subsequent illumination of the tumor. However, the efficiency of this therapy is directly related to the capacity of the photosensitizer to penetrate into cancer cells. Thus, for photosensitizer design and screening purposes, it is interesting to determine the relationship between the chemical structure of potentially efficient photosensitizers and their interaction with a cell membrane, an interaction that may strongly depend on membrane lipid composition. We have extracted, identified, and quantified the major lipids constituting the lipidome of plasma and mitochondrial membranes of retinoblastoma cells (Y79) and retinal pigment epithelium cells (ARPE-19), using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-MS/MS). The results of the lipidomic analysis were used to build artificial lipid monolayers with compositions mimicking those of the plasma and mitochondrial membranes of Y79 cells. The viscoelastic properties of these monolayers were determined by surface pressure measurements, and compared to those of the lipid extracts.

Keywords : lipidomics ; Y79; retinoblastoma ; ARPE-19 ; surface pressure measurement ; high resolution mass spectrometry.

1. Introduction

Retinoblastoma is an eye tumor that develops in childhood. It could be treated by photodynamic therapy (PDT), which consists in intravenous injection of a photosensitizer, and subsequent local illumination of the tumor at an appropriate wavelength (Teixo et al. 2015). However, the efficiency of this therapy seems directly related to (i) the capacity of the photosensitizer to penetrate into cancer cells, its transport pathway, (ii) subcellular localization, and (iii) physical state (monomer, aggregate) in the cytoplasm (Rosenkranz et al. 2000; Laville et al. 2006). Considering the poor intracellular penetration efficiency of the tetraphenylporphyrins (TPPs), attributed to their low solubility in aqueous medium and lack of specificity, glycoconjugated derivatives have been specifically designed to improve their amphipathic properties and address sugar receptors overexposed at the surface of retinoblastoma cells (Griegel et al. 1989). Three TPP series have been developed in which the synthesized molecules had constrained, flexible or dendrimeric structure for a better recognition by surface receptors (Ballut et al. 2012). Over the last few years, there has been a controversy about the preferential transport pathway of drugs across cell membranes, after Dobson and Kell (2008) published their views on carrier-mediated cellular uptake versus passive diffusion. From our own experience and that of others, it is more likely that both coexist (Sugano et al. 2010, Balaz 2012). Indeed, although the capacity of interaction of mannosylated TPPs with a mannose receptor has been demonstrated on both artificial membrane models and Y79 retinoblastoma cells (Makky et al. 2011, Makky et al. 2012), the most efficient TPP *in vivo* among the series synthesized so far is one whose carrier-mediated uptake is seriously put into question (*unpublished results*). Photosensitizer interaction with lipids, therefore, should be carefully analyzed.

For studying nonspecific interactions of drugs with membrane lipids using artificial lipid models (for example for the screening of different potentially active compounds), it is important that these models show as much similarities as possible with the actual membrane, without being too complex, though. In previous works, we have evaluated the capacity of glycoconjugated TPPs to penetrate into lipid monolayers and bilayers mimicking the retinoblastoma cell membrane (Makky et al. 2010). These models were based on a PC/PE/PS (4:4:1) molar ratio in retina, Y79 and WERI-Rb1 retinoblastoma cells, as determined by Futterman and Andrews (1964), Fliesler and Anderson (1983), Yorek et al. (1985) and Huster et al. (1998). For simplification purposes, the fatty acid chain composition in these models was 18:0-18:1 (SO) for each phospholipid class. Cholesterol was added to the phospholipid

mixture and the final model used to analyze the interaction of TPPs with a mannose receptor (Concanavalin A, Con A) was SOPC/SOPE/SOPS/Chol (36:34:12:18 wt%) (Makky et al. 2011). Compared to other membrane models described in the literature for drug evaluation, like DPPC, DPPC-DOPC or DPPC-cholesterol mixtures (Minones et al. 2005, Azouzi et al. 2009, Fadel et al 2011, Gzyl-Malcher et al. 2012), the PC/PE/PS/Chol mixture was already a complex phospholipid-cholesterol system. However, it did not fully reflect the actual specificity of retinal lipid composition. Indeed, the saturation/unsaturation of the lipid chains of a phospholipid may influence the kinetics of penetration of a drug into a monolayer, and this is mainly due to a change in the surface compressional modulus of the lipid monolayer (Ambike et al 2011). Retina membranes contain phospholipids with saturated (16:0, 18:0), unsaturated (18:1) chains, but also a large amount of polyunsaturated fatty acid chains such as docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 ω 3), and arachidonic acid (AA, 20:4 ω 6) often associated to PE and PS (Futterman and Andrews 1964, Bretillon et al. 2008, Acar et al. 2012). Palmitic, stearic, oleic, arachidonic and docosahexaenoic acids would represent more than 80% of the long-chain lipids (free FA and phospholipids) in the whole retina (Liu et al 2010).

Plasma membranes enriched in polyunsaturated fatty acids have much lower order parameters than others, indicating greater fluidity, because multiple unsaturated bonds do not allow dense packing of the fatty acid components (Spector and Burns, 1987; SanGiovanni and Chew 2005). Fatty acid composition can thus strongly influence membrane properties, and in turn cellular functions, because their structural organization may affect the conformation and activity of membrane transporters and receptors (Yorek et al, 1985, Vigh et al. 2005). Since the SOPC/SOPE/SOPS/Chol (36:34:12:18 wt%)-Con A model seemed efficient for TPPs discrimination (Makky et al. 2011, 2012), a lipidomic analysis of neural Y79 and epithelial ARPE-19 cell membranes was undertaken (Dunn et al. 1996, Strauss et al. 2005). The goal was to determine the proportion of the main lipid classes and species in the membranes of these cells and exploit the data to build a relevant membrane model, which could be used for further experiments with monolayer or bilayer systems.

Lipidomics aim at detecting and quantifying all lipid classes and species within a biological sample (Hu et al. 2009). Analytical techniques allow the establishment of a “lipid profile” for the cell of interest (Wenk 2005). In this work, we have focused on the identification of phospholipids found in the total lipid extracts, plasma membrane and endoplasmic reticulum (ER), and mitochondrial membranes collected following Y79 and ARPE-19 cells fractionation, using the Folch solvent mixture, differential ultracentrifugation and LC-MS/MS (Milne et al. 2006, Wolf and Quinn 2008). The viscoelastic properties of the total lipid,

plasma and mitochondrial membrane extracts, and artificial lipid models built from the lipidomic analysis were determined by surface pressure measurements.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Cell culture and subcellular fractionation

Human Retinal Epithelium ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™) cells were purchased from LCG standard (France). Human retinoblastoma (Y79) cells (Reid et al. 1974), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High-glucose and Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and magnesium chloride (MgCl₂) were purchased from Sigma Aldrich (France). Sucrose was delivered by Fluka (France), potassium chloride (KCl) from Merck (Germany). Fetal bovine serum (FBS), streptomycin (10,000 U/ml) and penicillin (10,000 U/ml) were provided by Lonza (Belgium), and the protease inhibitor cocktail (cOmplete, Mini, EDTA-free) by Roche (France). The buffer RIPA, and the protein marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa were purchased from Thermo-Fisher (France). The rabbit polyclonal antibody anti-citrate synthetase antibody (ab96600) and the mouse monoclonal anti-beta 1 Sodium Potassium ATPase antibody (ab2783) were purchased from Abcam (USA).

Solvents for chromatography: Methanol (LC-MS grade), water (UPLC-MS grade), isopropanol (UPLC-MS grade), acetic acid (LC grade) and triethylamine (99.5% pure) were purchased from Sigma Aldrich, and chloroform (LC grade) and heptane (LC grade) from Carlo Erba (Italy).

Lipid standards for mass spectrometry: Cholesterol, 3-sn-phosphatidic acid (egg yolk), L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (egg yolk), cardiolipin (Heart, Bovine), L- α -phosphatidylethanolamine (egg yolk), phosphatidylcholine (egg yolk), sphingomyelin (egg yolk) and L- α -lysophosphatidylcholine (egg yolk) were purchased from Sigma Aldrich. L- α -phosphatidylinositol (Liver, Bovine) and L- α -phosphatidylserine (Brain, Porcine) were purchased from Avanti Polar lipids (France).

Chemicals for artificial membrane models: HEPES, sodium chloride, and cholesterol were bought from Sigma Aldrich. 1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (18:0-18:1

SOPC), 1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (18:0-22:6 SDHAPC), 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (18:0-18:1 SOPE), 1-octadecanoyl-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (18:0-20:4 SAPE), 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (18:0-18:1 SOPS), and 1',3'-bis[1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho]-*sn*-glycerol (CL (18:1)₄) were all purchased from Avanti polar lipids (France).

2.2. Cell culture and subcellular fractionation

Y79 cells were maintained in culture for 30 days in DMEM supplemented with 20% (v/v) FBS and 1% antibiotics. The Trypan blue stain (v/v) was used for cell viability analysis. ARPE-19 cells were cultured in DMEM/F12 media with 10% FBS and 0.5% antibiotics. Both cell lines were incubated in 5% CO₂ at 37°C, divided and sub-cultured twice or three times a week.

The isolation of mitochondria and plasma membranes was based on the differential density between cell components (Wieckowski et al. 2009). Cells were suspended in a lysis buffer containing 0.25 M sucrose, 10 mM Tris pH 7.6, 10 mM KCl, 0.15 mM MgCl₂, and the protease inhibitor cocktail. The suspension was kept in ice for 30 min. Cell disruption was performed in a Potter-Elvehjem homogenizer. The homogenate organelles were then separated by ultracentrifugation (OptimaTM LE- 80 K, rotor type 50.1 Ti, Beckman). The nuclear fraction was eliminated by two successive centrifugations (1,000 g, 10 min, 4°C). The mitochondria fraction was separated by centrifugation at 10,000 g for 10 min at 4°C, and washed twice with the lysis buffer. Plasma membranes and endoplasmic reticulum membranes were isolated by a centrifugation at 100,000 g for 1 h at 4°C.

2.3. Western blot analysis

The expression of specific proteins was detected by immunoblotting. Electrophoresis gels (4-15% of acrylamide), and running and transfer buffers were purchased from Bio-Rad (France). 20µL of each membrane fraction was mixed with 2X loading buffer (v/v) containing β-mercaptoethanol and incubated at 37°C for 20 min. SDS-PAGE was performed at 150V for 45 min in presence of Protein Marker. After a protein electro transfer from the gel onto a

PVDF membrane (100 V, 45 min), non-specific membrane sites were blocked by a 5% of non-fat dry milk mixed with a TBS-Tween and proteins were revealed by immunoblotting. The anti-citrate synthase (1:1000) and anti-Na⁺/K⁺ ATPase Beta 1 (1:250) antibody were used to detect the presence of mitochondria and plasma membranes, respectively, in the collected fractions. After incubation with a specific HRP-conjugated secondary antibody, the Clarity Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad) was used to reveal the antibody-probed immunoblots. Chemiluminescence signals were recorded in a Bio imaging system of DNR using GelCapture v6.6 software.

2.4. Lipid extraction

Lipid extraction was performed according to the protocol described by Folch *et al.* (1957), with modification. Briefly, a cell pellet or isolated fraction was homogenized in 4.5 mL of a chloroform/methanol (2:1, v/v) mixture. After stirring for 15 min at room temperature, 1.25 mL of water was added and the suspension was vortexed for 2 min. Lipids were collected from the lower chloroformic phase after centrifugation at 1,000 g for 10 min at 4°C. The lipid film was obtained after solvent evaporation under nitrogen gas at room temperature then stored at -20°C.

2.5. Qualitative and quantitative lipidomic analyses

Liquid chromatography: Normal phase HPLC was employed for lipid classes separation based on head group differences. Liquid chromatography was performed using a Dionex UltiMate® 3000 RSLC system constituted of a quaternary pump, an autosampler and a column oven. 5µl of each sample were injected in a PVA-Sil® column (150 x 2.1 mm I.D., 120 Å; YMC Europe GmbH, Germany) at 35°C. A 0.4 mL/min flow rate elution gradient was used. This gradient was adapted from a previous work (Imbert *et al.*, 2012) with modifications (Table A 2.01). The outgoing LC flow rate was split in post-column into two detectors: a Corona CAD® and a LTQ-Orbitrap mass spectrometer.

Lipid quantification: The chromatographic system was coupled to a charged aerosol detector, Corona-CAD Ultra (Thermo Fisher Scientific) for quantitative analysis. The incoming liquid from the chromatographic column with a flow rate equal to 0.25mL/min was mixed to ethanol

supplied from a second HPLC pump at 0.2 mL/min to achieve proper signal stability. A series of lipid standards were injected in the same conditions as lipids extracts. They were solubilized in chloroform at a concentration of 5.0 mg/mL, and then diluted in chloroform at 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 and 0.025 mg/mL for quantification.

Mass spectrometry: The LTQ-Orbitrap Velos Pro (ThermoFisher Scientific, USA) is a hybrid mass spectrometer combining a double linear ion trap and an orbital trap. The incoming liquid from the chromatographic column at a flow rate of 0.15mL/min is introduced into the ion source. Negative ESI ionization mode was performed to obtain structural information about polar lipids (e.g. phospholipids), and positive atmospheric pressure chemical ionization (APCI) was used for apolar lipid analysis. A full scan detection mode was performed by the orbital trap at a resolution of 100 000. Simultaneously, data dependent collision induced dissociation CID MS²/MS³ was performed in the double linear trap with low resolution detection and a collision energy of 35 a.u.

Data processing

Spectra were processed using the Thermo Xcalibur 2.2 software. An open source software LipidXplorer was used for mass spectrometry ions assignment. Herzog and coworkers (2012) have detailed the corresponding algorithm. However, when no fatty acid fragments could be detected, or for ion with $m/z > 977$, LIPID MAPS database (www.lipidmaps.org) was used for species determination.

2.6. Surface pressure measurements

The surface pressure-surface area isotherms (π -A) for lipid extracts and artificial lipid model monolayers were recorded using a Bioline Scientific (Finland) Langmuir trough (775 cm²) enclosed in a plexiglas box. The buffer solution contained 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 6.5 (Sigma Aldrich) in ultrapure water (Millipore Milli-Q[®] Direct 8 water purification System). The lipid mixtures in a chloroform/methanol (9:1) solution were spread onto the aqueous buffer solution by means of a micro-syringe (Hamilton, USA). After deposition, the solvents were allowed to evaporate for 20 min before compression, at a rate of 26.94 cm²/min. Since the full composition of the lipid extracts was unknown, the areas were expressed in m²/mg. All experiments were performed at 22 ± 1 °C. The results are means of at least three

measurements. The experimental uncertainty was estimated to 0.2 mN/m. The surface compressional moduli were calculated using the equation $C_s^{-1} = -A(d\pi/dA)$.

3. Results and discussion

3.1. Adaptation of subcellular fractionation protocols to Y79 and ARPE-19 cells

The lipid extraction and subcellular fractionation protocols described in the literature were specifically modified for Y79 and ARPE-19 cells. According to cell growth curves established by other authors, the time needed for cell doubling was 48h for Y79 (Li, 1995) and 55-65h for ARPE-19 (Assanga, 2013). Therefore, lipid extraction was performed after two days following the last passage. Cells were let to grow up to 60% confluence to minimize the fatty acids in the medium, and lipid extraction was performed when cells were in the exponential growth phase. The fractionation protocol was inspired from Wieckowski and coworkers (2009) with minor modifications as described in section 2.2. As homogenization was a critical step in cells fractionation, its effectiveness was controlled under a microscope, in order to lyse a large number of cells, while preserving intact mitochondria and other organelles. Cell disruption was performed until 80% of cells were lysed. This step appeared longer for ARPE-19 cells than for Y79 ones. Western blots confirmed the effective separation of mitochondria and plasma membranes.

3.2. Quantitative analysis

It is well known that lipids amount varies rapidly in cells, and is function of many factors (cell growth conditions, extraction, storage...). In order to choose the best time for lipid extraction, total lipids were quantified from samples collected after 4 to 10 passages for Y79, and 3 to 8 passages for ARPE-19. The kinetic curves did not show significant differences, except for the cholesterol amount in Y79 cells, which seemed to decrease as function of days.

CAD profiles (Figure 2.06) were used for lipid quantification. We focused on cholesterol, PA, PG, CL, PI, PE, PS, PC, SM and LPC. Lipid amounts were calculated from standards calibration curve by integrating peak areas. It is important to mention that since Corona® CAD response is a function of lipid concentration, calibration curves were adjusted with a

non-linear power regression model in order to fit best this response (Dixon et Peterson., 2002; Ramos et al., 2008).

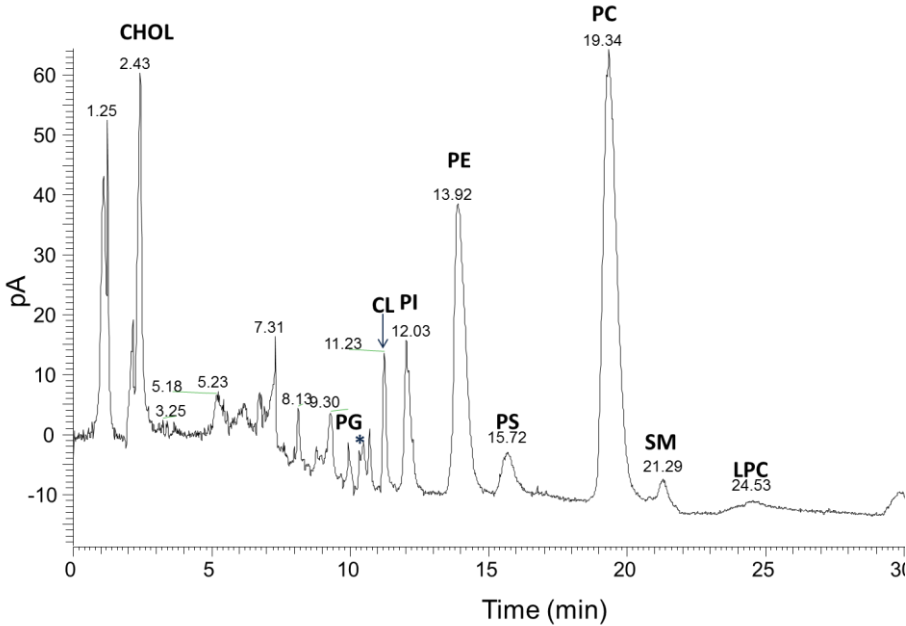


Figure 2.06 a: HPLC/CAD profile for Y79 total lipid extract: cells were at passage 7, and the lipid solution (10 mg/mL) was diluted three-fold in chloroform before injection. * System peak

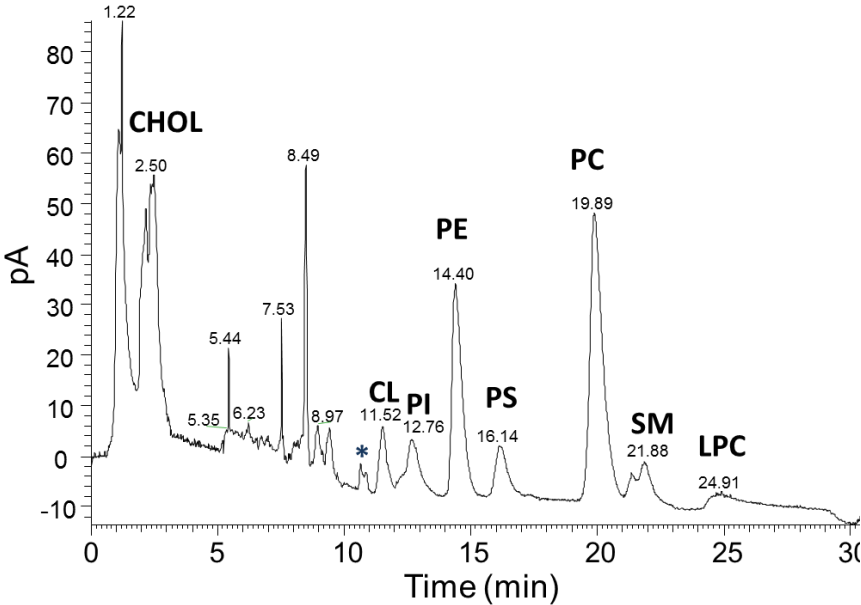
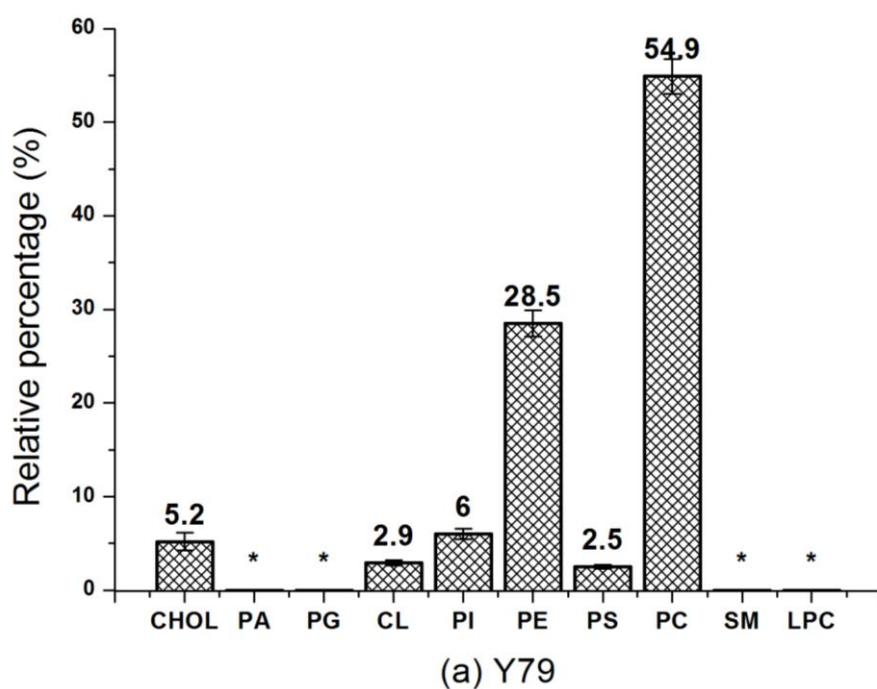


Figure 2.06b: HPLC/CAD profile for ARPE-19 total lipid extract : cells were at passage 7, and the lipid solution (10 mg/mL) was diluted three-fold in chloroform before injection. * System peak.

The chromatographic method did not allow a specific PA and PG quantification, because two system peaks overlapped with those of these phospholipids. However, the peaks for PA and PG did not generally exceed 5% of the total peak area. The limit of quantification (LOQ) was about 30 µg/mL for the phospholipids and LPC was constantly below this limit.

The relative weight percentages (rel wt%) of total identified and quantified lipids extracted from Y79 and ARPE-19 cells are presented in Figure 2.07. Calculated standard deviations are low, and values are the mean of at least four samples obtained from different cell passages. The high Chol amount, the lower PC one, and the presence of SM in ARPE-19 are the main differences observed between the two cell lines.



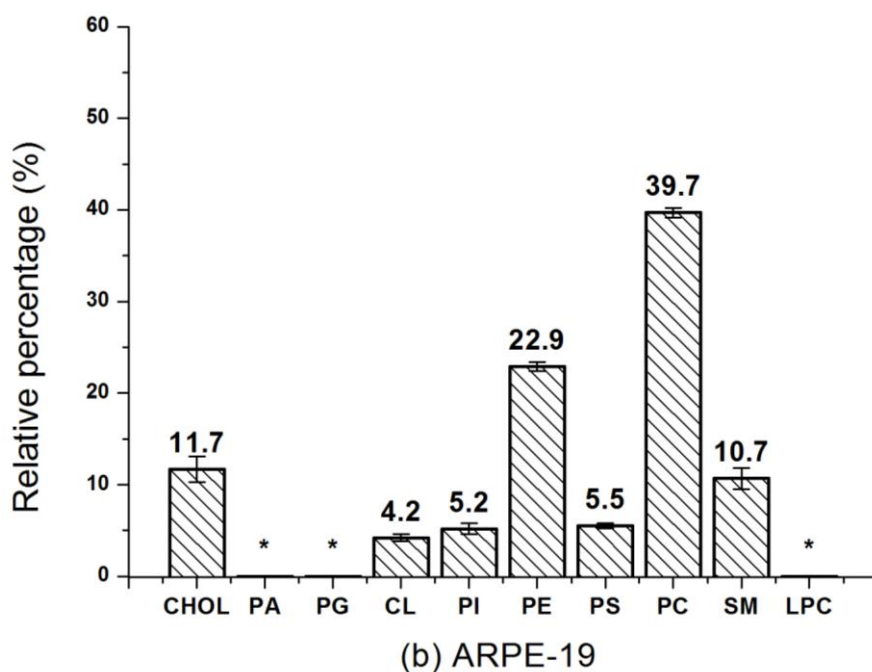


Figure 2.07: Rel wt% of total quantified lipid extracts lipids for Y79 (a) and ARPE-19 (b) cells. Results are expressed by mean \pm SD. *: non-quantifiable lipids due to peak system or LOQ.

The quantification of lipid classes was also performed in plasma membrane and mitochondria fractions obtained after cell fractionation and pellet lipid extraction. Quantification results are presented in Table 2.05. Unlike the total lipid extracts, lipid amounts in fractions varied considerably between passages. For Y79 fractions, cells in passage 6 and 8 were used, with two fractionations performed in parallel on the same day for each passage. For ARPE-19 cells, the data correspond to fractions at passages 8 and 10. Since the variation between results is significant, the data summarized in Table 2.05 are not means but variation intervals. The most striking differences noticed between the two cell lines are the absence of CL in Y79 mitochondria, and the absence of SM in both Y79 plasma and mitochondria, compared to ARPE-19 cells.

The relative weight percentages deduced from this quantification were later used to build the biomimetic membranes.

3.3. Identification of the phospholipids

Lipid identification from complex biological extracts requires analyses with both APCI and ESI ionization to get a global lipidomic profile. Herein, in negative ESI mode, scans were recorded starting from 9 min of the gradient. As the initial mobile phase contains heptane, very poor ionization occurs during the first minutes of the chromatograms. By using this ionization mode, we obtained structural information about the phospholipids. For apolar lipid characterization, a positive APCI ionization was used (Figure 2.01A in appendices). The full scan fails to distinguish between isomeric and isobaric species, but the identification of the various lipid structures (fatty acyl composition and position) is possible from the fragmentation pattern obtained by MS²/MS³ CID.

Table 2.05: Relative mass percentage range of lipid classes in Y79 and ARPE-19 fractions.

NQ: non-quantifiable lipids.

	Chol	CL	PI	PS	PE	PC	SM	LPC
Y79 mitochondria	7.9 - 10.5	3.6 - 6	4.5 – 6.9	3.9 - 5.5	21.8- 32.7	42.5-52.9	NQ	NQ
Y79 Plasma membrane/ER	8.9 - 15.2	NQ	5.1 - 7.6	4.9 - 10.7	17.6 – 23.8	51.5 – 57.9	NQ	NQ
ARPE-19 mitochondria	21.1 - 23.8	1.8 - 4.2	2 - 4.1	5.2- 7.9	14.5 - 22.1	34	10.5-13.4	NQ
ARPE- 19 plasma membrane/ER	15.5 - 19.1	4.1	6.9 - 8	7 - 9.6	11.1 - 19.7	32 - 38	8.7 - 15.8	NQ

In order to compare fractions obtained from a same cell line type, relative abundance of each lipid species was calculated and results are expressed as the mean from three different analyzed samples. The percentage of each identified lipid species is expressed as the abundance of the corresponding ion expressed relatively to the most abundant specie of each class. Phospholipids identified from negative ESI analysis are summarized in tables 2.06 and 2.07. Spectral data interpretation was carried out on each species that represents more than 10% relatively to the most abundant ion of a lipid class. No identification and therefore no reporting in the identification tables was done for species with fatty acids intensity < 10% in the MS² or MS³ spectra. Since LipidXplorer randomly chooses the position of FA in sn-1 or sn-2, a precise position assignment was performed by examining the MS² or MS³ spectra. The intensity of sn-2/sn-1 ions was calculated and interpreted as previously done by Hsu and Turk (2000a,b; 2002; 2003; 2005) and Pulfer et al. (2003).

The results in Tables 2.06 and 2.07 show that although the *phosphatidylglycerol* class could not be accurately quantified, it was possible to identify its major species. Only one was retained for Y79 (PG [16:0/18:1]). The same specie was also abundant in ARPE-19 cells, in which another specie, PG [18:1/18:0], appeared to be the second most abundant specie. Interestingly, some minor species were identified containing fatty acids with an odd number of carbon atoms (17:0 and 19:1). The abundance of the corresponding phospholipids was about 10% in our samples. These FA are rarely found in humans, but frequent in bacteria (Rezanka & Sigler, 2009). Whereas Bretillon et al (2008) have already identified margaric acid (17:0) in human retina (neural and RPE extracts), the 16:0/19:1 specie was not previously reported in human retinal extracts.

The most abundant *cardiolipin* species were not identical in both cell lines: m/z 1427.99 CL[16:1_18:0_18:2_18:1] in Y79 membranes and m/z 1451.98 CL[18:2_18:2_18:1_18:1] in ARPE-19 ones.

The most abundant *phosphatidylinositol* ion in the two cell lines is the m/z 885.54 present as PI[18:0/20:4] in Y79 and as both PI[18:0 / 20:4] and PI[18:1/20:3] in ARPE-19. Two other species were retained in Y79 samples, mainly enriched with 20:4 chains, whereas seven other species were identified in ARPE-19. In PI fragmentation, the ions m/z 223, 241 and 297 corresponding to [inositol phosphate ion - H₂O], inositol phosphate ion, and [glycerophosphoinositol - 2H₂O], respectively, are the characteristic ions of this class

independently of the fatty acyl groups. Due to the instrument mass cut-off fixed to m/z 230, the m/z 223 fragment was not observed. The ion m/z 241 was not observed in MS² of m/z 883.53 and 885.54.

Phosphatidylethanolamine appeared as the class with the largest variety of species and fatty acids in both cell lines. In Y79 cells, two species at m/z 722.51 (phosphatidylethanolamine ether PE-P[16:0/20:4]) and m/z 766.54 (PE[18:0/20:4]) exceed 90% (except in membrane samples), whereas there are four highly abundant species (representing more than 80%) in ARPE-19 lipid extracts at m/z 742.53, 744.54, 750.53 (the most abundant one), and m/z 766.54 identified respectively as PE[18:1/18:1] or PE[18:2/18:0], PE[18:0/18:1] (SOPE), PE-O[18:1/20:4] and PE[18:0/20:4] (SAPE). Moreover, we can list four PE species identified in ARPE-19 samples, but not in Y79 ones (at m/z 740.52, 792.55, 794.56, 778.57), and five species in Y79 samples undetected in ARPE-19 cell extracts (at m/z 738.50, 746.56, 764.52, 702.53, 724.53). It may be noted that for the two cell lines, over 57% of PE species are classified as phosphatidylethanolamine ether (PE-O or PE-P). Ether glycerophospholipid is a subclass of glycerophospholipids, most of them being plasmalogens. The plasmalogen subclass is characterized by a fatty alcohol with a vinyl ether bond at the sn-1 position (contrary to the diacyl subclass having a fatty acid group) (Braverman and Moser, 2012).

For *phosphatidylserine*, PS[18:0/18:1] (SOPS) at m/z 788.54 is the same abundant species identified in the two cell lines. However, the next abundant PS[18:0/22:6] (SDHAPS) at m/z 834.52 is about 87% in Y79 and 37% in ARPE-19.

Phosphatidylcholine was detected as acetate adduct [M+CH₃COO]⁻. There was no significant difference between the PC patterns of the two cell lines: the same species were found. Even the m/z 868.60, minor in ARPE-19 cells, was detected in Y79 with 6% of abundance. The PC species appeared largely saturated with long alkyl chain. The major specie was at m/z 818.58 (PC [16:0/18:1] POPC). However, the next abundant one was at m/z 790.55 (PC [16:0/16:1]) in Y79 and at m/z 844.60 (PC [18:0/18:2], PC [18:1/18:1]) in ARPE-19.

Finally, two main ion types were observed for *sphingomyelin* species: the [M + CH₃COO]⁻ adduct and the [M - 15]⁻ product ion. The latter corresponds to the loss of a methyl group. Therefore, m/z 761.57 and m/z 678.54 are two adducts for a same phospholipid SM[18:1/16:0] having a neutral mass m/z 702. This specie is the most abundant in the two cell lines. Three

minor species were also identified in Y79 whereas five other species were retained in ARPE-19 having a relative intensity between 15% and 38% in the total lipid extract.

Table 2.06: Identified phospholipids in Y79 cells. When sn1 and sn2 positions are well known, FA are separated by a slash (“/”) otherwise they are separated by an underscore (“_”).

Mass (m/z)	Adduct	Name	Specie	Relative Precursor Intensity		
				Total Lipid Extract	Mitochondria	Plasma Membrane
Phosphatidylglycerol						
747.513	[M-H] ⁻	PG [34:1]	PG [16:0 / 18:1]	100	100	100
Phosphatidylinositol						
857.514	[M-H] ⁻	PI [36:4]	PI [16:0 / 20:4]	13 ±0.3	11 ±1	12 ±2
883.534	[M-H] ⁻	PI [38:5]	PI [18:1 / 20:4]	20 ±0.2	23 ±2	19 ±2
885.548	[M-H] ⁻	PI [38:4]	PI [18:0 / 20:4]	100	100	100
Cardiolipin						
1373.945	[M-H] ⁻	CL[66:3]	CL[16:1_18:1_14:0_18:1]	19 ±2	19 ±6	21 ±7
1375.963	[M-H] ⁻	CL[66:2]	CL[16:0_18:1_18:1_14:0]	8 ±3	11 ±4	13 ±6
1399.960	[M-H] ⁻	CL[68:4]	CL[16:1_16:0_18:2_18:1]	77 ±6	67 ±6	68 ±9
1401.976	[M-H] ⁻	CL[68:3]	CL[16:0_18:1_18:2_16:0]	48 ±12	60 ±13	73 ±19
1403.992	[M-H] ⁻	CL[68:2]	CL[16:0_16:0_18:1_18:1]	34 ±10	45 ±9	72 ±25
1425.976	[M-H] ⁻	CL[70:5]	CL[16:0_18:2_18:2_18:1]	34 ±0.9	46 ±10	39 ±7
1427.991	[M-H] ⁻	CL[70:4]	CL[16:1_18:0_18:2_18:1]	100	100	100
1451.993	[M-H] ⁻	CL[72:6]	CL[18:2_18:2_18:1_18:1]	12 ±1	19 ±7	15±4
1454.008	[M-H] ⁻	CL[72:3]	CL[18:1_18:0_18:1_18:1]	24 ±3	35 ±10	29±6
1456.023	[M-H] ⁻	CL[72:4]	CL[18:1_18:2_18:0_18:1]	35 ±6	39 ±3	37 ±2

Phosphatidylethanolamine

700.526	[M-H] ⁻	PE-O [34:2]	PE-O [16:1 / 18:1]	63 ±4	47 ±4	54 ±6
700.526	[M-H] ⁻	PE-O [34:2]	PE-O [18:2 / 16:0]	63 ±4	47 ±4	54 ±6
700.526	[M-H] ⁻	PE-O [34:2]	PE-O [18:1 / 16:1]	63 ±4	47 ±4	54 ±6
702.542	[M-H] ⁻	PE-O [34:1]	PE-O [16:0 / 18:1]	13 ±1	10 ±2	13 ±3
702.542	[M-H] ⁻	PE-O [34:1]	PE-O [18:1 / 16:0]	13 ±1	10 ±2	13 ±3
714.506	[M-H] ⁻	PE [34:2]	PE [16:1 / 18:1]	18 ±2	11 ±0.4	9 ±5
714.506	[M-H] ⁻	PE [34:2]	PE [18:2 / 16:0]	18 ±2	11 ±0.4	9 ±5
716.522	[M-H] ⁻	PE [34:1]	PE [16:0 / 18:1]	63 ±4	44 ±1	51 ±6
716.522	[M-H] ⁻	PE [34:1]	PE [16:1 / 18:0]	63 ±4	44 ±1	51 ±6
722.512	[M-H] ⁻	PE-O [36:4]	PE-P [16:0 / 20:4]	97 ±3	98 ±1	100
724.532	[M-H] ⁻	PE-O [36:4]	PE-O [18:2 / 18:2]	26 ±3	23 ±5	25 ±6
738.502	[M-H] ⁻	PE [36:4]	PE [16:0 / 20:4]	14 ±0.2	12 ±0.1	12 ±0.7
742.533	[M-H] ⁻	PE [36:2]	PE [18:1 / 18:1]	47 ±5	39 ±0.2	38 ±1
742.533	[M-H] ⁻	PE [36:2]	PE [18:2 / 18:0]	47 ±5	39 ±0.2	38 ±1
744.549	[M-H] ⁻	PE [36:1]	PE [18:0 / 18:1]	44 ±3	40 ±1	37 ±3
746.567	[M-H] ⁻	PE [36:0]	PE [18:0 / 18:0]	34 ±9	32 ±8	36 ±7
746.507	[M-H] ⁻	PE-O [38:7]	PE-O [20:6 / 18:1]	34 ±9	32 ±8	36 ±7
746.507	[M-H] ⁻	PE-O [38:7]	PE-O [16:1 / 22:6]	34 ±9	32 ±8	36 ±7
748.521	[M-H] ⁻	PE-O [38:6]	PE-O [18:2 / 20:4]	53 ±2	50 ±2	48 ±1
748.521	[M-H] ⁻	PE-O [38:6]	PE-O [16:0 / 22:6]	53 ±2	50 ±2	48 ±1
748.521	[M-H] ⁻	PE-O [38:6]	PE-O [16:1 / 22:5]	53 ±2	50 ±2	48 ±1
750.539	[M-H] ⁻	PE-O [38:5]	PE-O [18:1 / 20:4]	35 ±1	36 ±1	35 ±1
750.539	[M-H] ⁻	PE-O [38:5]	PE-O [18:2 / 20:3]	35 ±1	36 ±1	35 ±1
750.539	[M-H] ⁻	PE-O [38:5]	PE-O [16:0 / 22:5]	35 ±1	36 ±1	35 ±1
764.525	[M-H] ⁻	PE [38:5]	PE [18:1 / 20:4]	35 ±2	31 ±0.5	24 ±0.6
766.540	[M-H] ⁻	PE [38:4]	PE [18:0 / 20:4]	95 ±3	98 ±2	59 ±2
768.555	[M-H] ⁻	PE [38:3]	PE [18:0 / 20:3]	11 ±2	14 ±1	9 ±1
774.604	[M-H] ⁻	PE [38:0]	PE [18:0 / 20:0]	16 ±2	12 ±2	13 ±2

774.544	[M-H] ⁻	PE-O [40:7]	PE-O [18:1 / 22:6]	16 ±2	12 ±2	13 ±2
790.540	[M-H] ⁻	PE [40:6]	PE [18:0 / 22:6]	42 ±5	36 ±8	23 ±4
790.540	[M-H] ⁻	PE [40:6]	PE [18:1 / 22:5]	42 ±5	36 ±8	23 ±4

Phosphatidylserine

760.512	[M-H] ⁻	PS [34:1]	PS [18:0 / 16:1]	18 ±1	18 ±1	17 ±2
760.512	[M-H] ⁻	PS [34:1]	PS [18:1 / 16:0]	18 ±1	18 ±1	17 ±2
760.512	[M-H] ⁻	PS [34:1]	PS [16:0 / 18:1]	18 ±1	18 ±1	17 ±2
786.528	[M-H] ⁻	PS [36:2]	PS [18:1 / 18:1]	15 ±1	19 ±3	17 ±3
786.528	[M-H] ⁻	PS [36:2]	PS [18:0 / 18:2]	15 ±1	19 ±3	17 ±3
788.543	[M-H] ⁻	PS [36:1]	PS [18:0 / 18:1]	99 ±0.17	100	100
790.549	[M-H] ⁻	PS [36:0]	PS [18:0 / 18:0]	11 ±0.5	12 ±0.1	12 ±0.2
810.527	[M-H] ⁻	PS [38:4]	PS [18:0 / 20:4]	34 ±2	33 ±3	33 ±3
812.541	[M-H] ⁻	PS [38:3]	PS [18:0 / 20:3]	17 ±3	21 ±1	21 ±0.9
834.527	[M-H] ⁻	PS [40:6]	PS [18:0 / 22:6]	87 ±8	77 ±5	84 ±7
836.539	[M-H] ⁻	PS [40:5]	PS [18:0 / 22:5]	36 ±10	45 ±1	47 ±1
838.555	[M-H] ⁻	PS [40:4]	PS [22:3 / 18:1]	14 ±2	13 ±0.5	13 ±1
838.555	[M-H] ⁻	PS [40:4]	PS [18:0 / 22:4]	14 ±2	13 ±0.5	13 ±1

Phosphatidylcholine

764.543	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [30:0]	PC [14:0 / 16:0]	21 ±3	16 ±2	20 ±5
790.558	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [32:1]	PC [16:1 / 16:0]	62 ±4	51 ±7	51 ±8
792.529	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [32:0]	PC [16:0 / 16:0]	32 ±2	40 ±2	50 ±3
816.573	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [34:2]	PC [16:1 / 18:1]	17 ±1	17 ±2	14 ±1
818.588	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [34:1]	PC [16:0/18:1]	100	100	100
820.595	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [34:0]	PC [18:0 / 16:0]	14 ±0.1	14 ±0.2	14 ±0.3
820.595	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [34:0]	PC [16:0 / 18:0]	14 ±0.1	14 ±0.2	14 ±0.3
820.595	[M + CH ₃ COO] ⁻	PCO [36:7]	PC [18:1 / 18:6]	14 ±0.1	14 ±0.2	14 ±0.3
844.603	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [36:2]	PC [18:1 / 18:1]	21 ±0.7	21 ±2	18 ±2

846.617	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [36:1]	PC [18:0 / 18:1]	29 ±2	26 ±0.8	28 ±0.3
Sphingomyelin						
687.542	[M-15] ⁻	SM [34:1]		24 ±1	24 ±1	23 ±3
761.578	[M + CH ₃ COO] ⁻	SM [34:1]	SM(d 18 :1 /16 :0)	100	100	100
763.585	[M + CH ₃ COO] ⁻	SM [34:0]	SM(d 18 :0 /16 :0)	10 ±1	12 ±0.1	11 ±2
789.611	[M + CH ₃ COO] ⁻	SM [36:1]	SM(d 18 :1 /18 :0)	12 ±4	13 ±2	16 ±2
789.611	[M + CH ₃ COO] ⁻	SM [36:1]	SM(d 16 :1 /20 :0)	12 ±4	13 ±2	16 ±2

Table 2.07: Identified lipids in ARPE-19 cells. When sn1 and sn2 positions are well known, FA are separated by a slash (“/”) otherwise they are separated by an underscore (“_”).

Mass	Adduct	Name	Specie	Relative Precursor Intensity		
				Total Lipid Extract	Mitochondria	Plasma Membrane
Phosphatidylglycerol						
747.519	[M-H] ⁻	PG [34:1]	PG [16:0 / 18:1]	100	100	98 ±2
749.526	[M-H] ¹⁻	PG [34:0]	PG [16:0 / 18:0]	10 ±1	9.4 ±0.2	8 ±1
761.534	[M-H] ⁻	PG [35:1]	PG [17:0 / 18:1]	10 ±1	9 ±1	8 ±0.7
761.534	[M-H] ⁻	PG [35:1]	PG [19:1 / 16:0]	10 ±1	9 ±1	8 ±0.7
773.534	[M-H] ⁻	PG [36:2]	PG [18:1 / 18:1]	18 ±2	24 ±3	36 ±19
773.534	[M-H] ⁻	PG [36:2]	PG [18:0 / 18:2]	18 ±2	24 ±3	36 ±19
775.549	[M-H] ⁻	PG [36:1]	PG [18:1 / 18:0]	49 ±6	69 ±7	89 ±11
Cardiolipin						
1425.976	[M-H] ⁻	CL[70:5]	CL[16:0_18:2_18:2_18:1]	37 ±11	36 ±9	10 ±0.6
1427.989	[M-H] ⁻	CL[70:4]	CL[16:1_18:0_18:2_18:1]	22 ±6	21 ±6	2 ±0.4
1447.961	[M-H] ⁻	CL[72:8]	CL[18:2_18:2_18:2_18:2]	16 ±4	15 ±3	23 ±4
1449.975	[M-H] ⁻	CL[72:7]	CL[18:2_18:1_18:2_18:2]	57 ±8	56 ±6	66 ±3
1451.989	[M-H] ⁻	CL[72:6]	CL[18:2_18:2_18:1_18:1]	100	100	100
1454.001	[M-H] ⁻	CL[72:5]	CL[18:2_18:1_18:1_18:1]	69 ±7	71 ±3	53 ±16
1456.014	[M-H] ⁻	CL[72:4]	CL[18:1_18:2_18:0_18:1]	19 ±3	21 ±2	12 ±5
1480.019	[M-H] ⁻	CL[74:6]	NO MS ² OR MS ³	11 ±2	7 ±1	13 ±0.7

Phosphatidyl inositol						
835.534	[M-H] ⁻	PI [34:1]	PI [18:0 / 16:1]	14 ±0.4	7 ±1	6 ±2
835.534	[M-H] ⁻	PI [34:1]	PI [16:0 / 18:1]	14 ±0.4	7 ±1	6 ±2
861.549	[M-H] ⁻	PI [36:2]	PI [18:0 / 18:2]	27 ±7	23 ±4	21 ±5
861.549	[M-H] ⁻	PI [36:2]	PI [18:1 / 18:1]	27 ±7	23 ±4	21 ±5
863.564	[M-H] ⁻	PI [36:1]	PI [18:0 / 18:1]	18 ±2	15 ±1	14 ±2
883.533	[M-H] ⁻	PI [38:5]	PI [18:1 / 20:4]	24 ±3	24 ±2	23 ±2
885.548	[M-H] ⁻	PI [38:4]	PI [18:0 / 20:4]	100	100	100.00
885.548	[M-H] ⁻	PI [38:4]	PI [18:1 / 20:3]	100	100	100.00

Phosphatidylethanolamine						
700.528	[M-H] ⁻	PE-O [34:2]	PE-O [16:1 / 18:1]	23 ±1	28 ±0.1	29 ±4
700.528	[M-H] ⁻	PE-O [34:2]	PE-O [16:0 / 18:2]	23 ±1	28 ±0.1	29 ±4
716.523	[M-H] ⁻	PE [34:1]	PE [16:0 / 18:1]	48 ±4	45 ±7	42 ±3
716.523	[M-H] ⁻	PE [34:1]	PE [16:1 / 18:0]	48 ±4	45 ±7	42 ±3
722.512	[M-H] ⁻	PE-O [36:4]	PE-P [16:0 / 20:4]	50 ±3	52 ±3	52 ±6
740.523	[M-H] ⁻	PE [36:3]	PE [18:2 / 18:1]	19 ±1	14 ±4	13 ±4
742.538	[M-H] ⁻	PE [36:2]	PE [18:1 / 18:1]	75 ±5	62 ±12	61 ±11
742.538	[M-H] ⁻	PE [36:2]	PE [18:0 / 18:2]	75 ±5	62 ±12	61 ±12
744.553	[M-H] ⁻	PE [36:1]	PE [18:0 / 18:1]	83 ±4	77 ±9	77 ±7
746.512	[M-H] ⁻	PE-O [38:7]	PE-O [16:1 / 22:6]	30 ±3	25 ±2	25 ±2
748.527	[M-H] ⁻	PE-O [38:6]	PE-O [18:2 / 20:4]	58 ±2	57 ±5	56 ±6
748.527	[M-H] ⁻	PE-O [38:6]	PE-O [16:0 / 22:6]	58 ±2	57 ±5	56 ±6
748.527	[M-H] ⁻	PE-O [38:6]	PE-O [16:1 / 22:5]	58 ±2	57 ±5	56 ±6
748.527	[M-H] ⁻	PE-O [38:6]	PE-O [18:1 / 20:5]	58 ±2	57 ±5	56 ±6
750.542	[M-H] ⁻	PE-O [38:5]	PE-O [18:1 / 20:4]	100	100	100
766.537	[M-H] ⁻	PE [38:4]	PE [18:0 / 20:4]	87 ±2	69 ±13	56 ±9
768.551	[M-H] ⁻	PE [38:3]	PE [18:0 / 20:3]	21 ±0.6	15 ±4	15 ±4
774.542	[M-H] ⁻	PE-O [40:7]	PE-O [18:2 / 22:5]	67 ±0.6	51 ±10	51 ±8

774.542	[M-H] ⁻	PE-O [40:7]	PE-O [18:1 / 22:6]	67 ±0.6	51±10	51±8
776.556	[M-H] ⁻	PE-O [40:6]	PE-O [18:0 / 22:6]	41 ±0.9	35±4	35±3
776.556	[M-H] ⁻	PE-O [40:6]	PE-O [18:2 / 22:4]	41 ±0.9	35±4	35±3
776.556	[M-H] ⁻	PE-O [40:6]	PE-O [18:0 / 22:6]	41±0.9	35±4	35±3
776.556	[M-H] ⁻	PE-O [40:6]	PE-O [18:1 / 22:5]	41±0.9	35±4	35±3
778.572	[M-H] ⁻	PE-O [40:5]	PE-O [18:0 / 22:5]	23±1	20±3	21±2
778.572	[M-H] ⁻	PE-O [40:5]	PE-O [20:1 / 20:4]	23±1	20±3	21±2
778.572	[M-H] ⁻	PE-O [40:5]	PE-O [18:1 / 22:4]	23±1	20±3	21±2
790.536	[M-H] ⁻	PE [40:6]	PE [18:0 / 22:6]	56±0.7	35±11	32±10
790.536	[M-H] ⁻	PE [40:6]	PE [18:1 / 22:5]	56±0.7	35±11	32±10
792.551	[M-H] ⁻	PE [40:5]	PE [18:0 / 22:5]	39.3±0.03	27±7	26±7
792.551	[M-H] ⁻	PE [40:5]	PE [18:1 / 24:4]	39.3±0.03	27±7	26±7
794.567	[M-H] ⁻	PE [40:4]	PE [18:0 / 22:4]	25±1	19±4	18±5

Phosphatidylserine

760.513	[M-H] ⁻	PS [34:1]	PS [16:0 / 18:1]	14 ±2	11 ±1	11 ±0.6
760.513	[M-H] ⁻	PS [34:1]	PS [18:0 / 16:1]	14 ±2	11 ±1	11 ±0.6
786.529	[M-H] ⁻	PS [36:2]	PS [18:1 / 18:1]	29 ±8	28 ±5	27 ±4
786.529	[M-H] ⁻	PS [36:2]	PS [18:0 / 18:2]	29 ±8	28 ±5	27 ±4
788.543	[M-H] ⁻	PS [36:1]	PS [18:0 / 18:1]	100	100	100
790.471	[M-H] ⁻	PS [37:7]	PS [18:1 / 19:6]	12 ±0.1	12 ±0.1	12 ±0.2
790.550	[M-H] ⁻	PS [36:0]	PS [18:0 / 18:0]	12 ±0.1	12 ±0.1	12 ±0.2
810.528	[M-H] ⁻	PS [38:4]	PS [18:1 / 20:3]	14 ±2	13 ±0.9	12 ±2
810.528	[M-H] ⁻	PS [38:4]	PS [18:0 / 20:4]	14 ±2	13 ±0.9	12 ±2
812.543	[M-H] ⁻	PS [38:3]	PS [18:0 / 20:3]	22 ±3	18 ±4	17 ±3
834.528	[M-H] ⁻	PS [40:6]	PS [18:0 / 22:6]	37 ±10	26 ±7	25 ±7
836.541	[M-H] ⁻	PS [40:5]	PS [18:0 / 22:5]	27 ±9	20 ±6	19 ±5
838.557	[M-H] ⁻	PS [40:4]	PS [18:0 / 22:4]	26 ±5	21 ±4	20 ±4

Phosphatidylcholine						
764.544	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [30:0]	PC [14:0 / 16:0]	12 ±1	13 ±0.6	13 ±2
790.560	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [32:1]	PC [16:0 / 16:1]	28 ±1	28 ±1	27 ±1
790.560	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [32:1]	PC [14:0 / 18:1]	28 ±1	28 ±1	27 ±1
792.574	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [32:0]	PC [16:0 / 16:0]	29 ±1	23 ±1	35 ±4
816.575	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [34:2]	PC [16:1 / 18:1]	29 ±4	30 ±2	28 ±3
816.575	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [34:2]	PC [16:0 / 18:2]	29 ±4	30 ±2	28 ±3
818.590	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [34:1]	PC [16:0 / 18:1]	100	100	100
820.599	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [34:0]	PC [16:0 / 18:0]	17 ±1	17 ±1	18 ±2
844.605	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [36:2]	PC [18:0 / 18:2]	36 ±9	38 ±2	37 ±4
844.605	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [36:2]	PC [18:1 / 18:1]	36 ±9	38 ±2	37 ±4
846.619	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [36:1]	PC [18:0 / 18:1]	27 ±2	30 ±2	31 ±2
868.604	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [38:4]	PC [18:1 / 20:3]	10 ±2	10 ±0.8	9 ±1
868.604	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [38:4]	PC [16:0 / 22:4]	10 ±2	10 ±0.8	9 ±1
868.604	[M + CH ₃ COO] ⁻	PC [38:4]	PC [18:0 / 20:4]	10 ±2	10 ±0.8	9 ±1
Sphingomyelin						
687.543	[M-15] ⁻	SM [34:1]		63 ±0.9	21 ±2	20 ±2
761.581	[M + CH ₃ COO] ⁻	SM [34:1]	SM(d 18 :1 /16 :0)	100	100	100
789.611	[M + CH ₃ COO] ⁻	SM [36:1]	SM(d 18 :1 /18 :0)	24 ±0.6	26 ±2	25 ±1
789.611	[M + CH ₃ COO] ⁻	SM [36:1]	SM(d 16 :1 /20 :0)	24 ±0.6	26 ±2	25 ±1
845.674	[M + CH ₃ COO] ⁻	SM [40:1]	SM(d 18 :1 /22 :0)	15 ±0.9	13 ±1	13 ±0.3
871.689	[M + CH ₃ COO] ⁻	SM [42:2]	SM(d 18 :1 /24 :1)	38 ±2	32 ±1	33 ±4
873.703	[M + CH ₃ COO] ⁻	SM [42:1]	SM(d 18 :1 /24 :0)	28 ±2	24 ±1	24 ±1

3.4. Surface pressure measurements

The lipid extracts from Y79 cells were spread at the air/buffer interface from a chloroform-methanol (9:1) solution. From the isotherms obtained, the surface compressional moduli were calculated and are plotted in Figure 2.08. The surface compressibility modulus values are all below 100 mN/m, indicating that the monolayers are poorly organized, all in a liquid-expanded state.

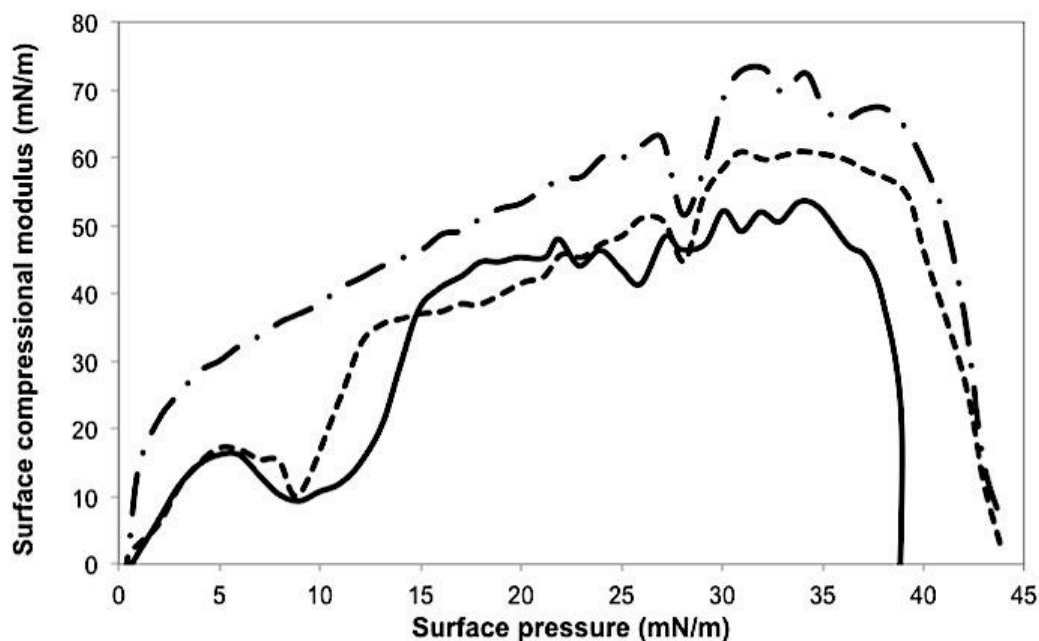


Figure 2.08: Surface compressional moduli for Y79 lipid extracts (dashed-dotted line: total lipid extract; dashed line: mitochondria; solid line: plasma membrane + endoplasmic reticulum).

Surface compressibility moduli of monolayers formed from Y79 and ARPE-19 plasma membranes and mitochondria are compared in Figure 2.09. A larger difference in compressibility moduli is observed between monolayers formed of lipids extracted from membrane and mitochondria in ARPE-19 compared to Y79. Lipids from the ARPE-19 mitochondrial extracts form a more rigid monolayer than the Y79 one, whereas those extracted from the ARPE-19 plasma membrane/endoplasmic reticulum fraction form a much less rigid monolayer than the Y79 one. This may be explained considering that in these extracts, the most abundant species are not the same in Y79 and ARPE-19 cells.

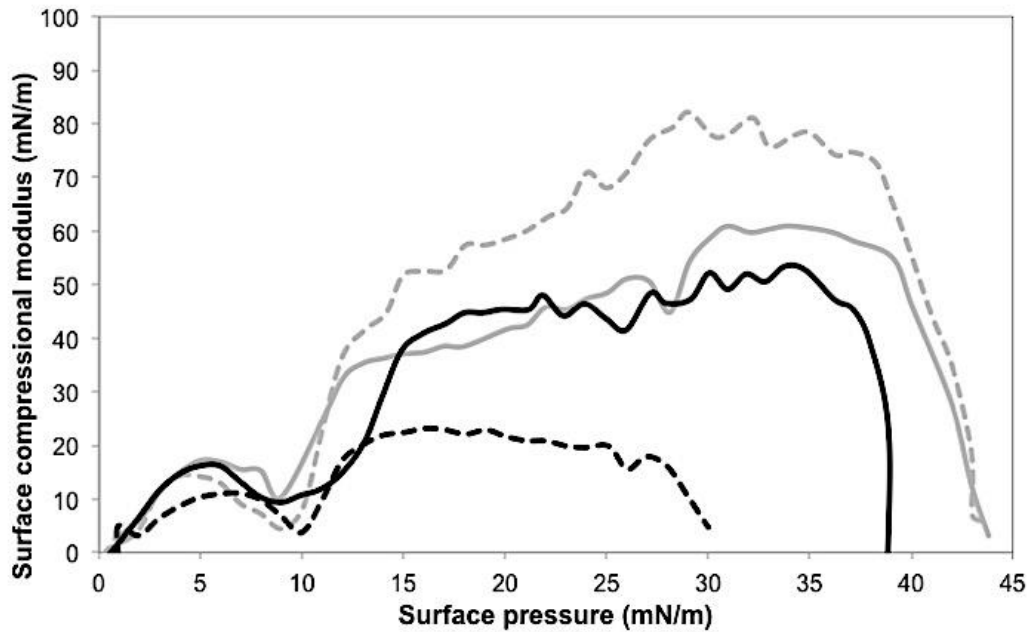


Figure 2.09: Surface compressional moduli for Y79 (black lines) and ARPE-19 (grey lines) plasma membrane (solid line) and mitochondrial (dashed line) lipid extracts.

3.5. Design of a membrane model

Lipidomic basis

Retina is constituted of pigment epithelium (RPE) and five types of cells: photoreceptors (rods and cones), bipolar cells, ganglion cells and optic nerve fibers. The Y79 cell line is widely used as a model of retinoblastoma cells for drug screening (Reid et al., 1974 Antczak et al. 2009). Y79 cells are undifferentiated cells that contain both a glial marker and a neurone-specific enolase (Kyritsis et al., 1984). They may differentiate differently into cells having some characteristics of pigment epithelial cells, conventional neurons, photoreceptor cells, or glial cells (Kyritsis et al., 1986), depending on the composition of the cell culture medium and the presence of other cells (Tombran-Tink and Johnson, 1989). Due to their multipotent characteristics, Y79 cells can be used as a model for retina investigations (Kyritsis et al., 1986).

ARPE-19 is a spontaneously arising retinal pigment epithelia (RPE) cell line derived in 1986 from the normal eyes of a 19-year-old human male who died from head trauma. It is the only commercial normal retinal cell line of human origin, available from the American Type Culture Collection (ATCC), and it has been proposed as a model of the blood-retinal barrier in drug delivery studies (Hornof et al. 2005; Mannermaa et al. 2006; Mannermaa et al. 2010). RPE and photoreceptors cells are known to interact closely (Fliesler and Anderson, 1983).

RPE cells supply docosahexaenoic acid (DHA) to photoreceptors (Mukherjee et al. 2004; Strauss, 2005). This fatty acid is essential to the development of vision in infants (Martinez, 1992; Leaf et al. 1996; Innis, 2007).

Contrarily to ARPE-19, the lipidome of Y79 cells has been extensively studied, although the information is often incomplete as to the lipid classes and/or phospholipid species. The proportions of the main phospholipid classes were evaluated by Yorek and coworkers (1985) to about 41.2% PC, 49.4% PE, 4.7% PS and 4.5% PI. Since only 4 classes were identified, it is difficult to compare these values to ours. However, it may be observed that Yorek and coworkers found about the same amount of PC and PE in their samples ($PE/PC = 1.20$), whereas our quantification gave a PE/PC ratio equal to 0.53. In fact, our results are closer to those that Fliesler and Anderson (1983) published for the healthy human retina, with 40-50% for PC, 30-35% for PE, 5-10% for PS, 3-6% for PI, and 2-8% for SM. We did not find any significant amount of SM in Y79 total lipid extracts, but instead, we could identify cardiolipin (2.9%). To our knowledge, CL was not previously identified nor quantified in the retina.

The free cholesterol/phospholipid ratio in Y79 was estimated to 0.16 (Yorek et al. 1985) and to 0.11 and 0.12 in calf RPE and retina, respectively (Acar et al. 2007). However, from our data, this ratio is equal to 0.05 and 0.13 for Y79 and ARPE-19, respectively. There is good agreement with literature data for RPE cells, but not for Y79 ones. Our cholesterol/phospholipid ratio in Y79 cells is much lower than the ratio calculated from Yorek and coworkers' data.

Göksel Gülcan et al. (1993) have found the RPE extracts particularly rich in PE compared to PC ($PE/PC = 3.35$), whereas in the retina, the proportions of these two phospholipid classes were similar. In our samples, the PE/PC ratios were almost equal for the two cell lines (0.57 and 0.53 in ARPE-19 and Y79 total lipid extracts, respectively). A high number of phosphatidylethanolamine derivatives were among plasmalogen species: they represent 57% for the two cell lines. Many studies have highlighted the important role of this subclass, and it was suggested that alterations in plasmalogen amounts could lead to many diseases Acar et al. (2007). In human RPE, a bioactive sphingolipid ceramide was detected by MALDI imaging (Zemski Berry, 2014). It is well known that a ceramide is *de novo* synthesized in the endoplasmic reticulum, then possibly converted to sphingomyelin (SM) by the addition of a choline in Golgi. It may also be converted to other forms of glycosphingolipids by sugar addition (Rotstein, 2010). This latter form was observed in ARPE-19 cells analyzed by

positive APCI mode. The whole apolar lipids were not identified, but it seems that ARPE-19 membranes are enriched in ceramides compared to Y79 ones (results not shown), which could explain the high SM amount found in the former.

We have also analyzed the phospholipid composition in the plasma membranes and mitochondria. For Y79 cells, the PE/PC ratio ranges between 0.51 and 0.62 in mitochondria, and 0.34 and 0.43 in plasma membranes. In ARPE-19 cells PE/PC is about 0.42-0.65 in mitochondria, and 0.34-0.51 in plasma membrane. Chol/PL ratios vary in the [0.1-0.17], and [0.17-0.23] ranges in plasma membrane-ER fractions for Y79 and ARPE-19 cells, respectively. As far as lipid classes are concerned, there is not much difference in quantification between ARPE-19 and Y79 membranes. The only significant differences concern the SM content and chol/PL ratio.

The major fatty acids in phospholipids are usually considered as homogeneously distributed in all retina tissues (Fliesler and Anderson, 1983). The most abundant ones are palmitic (16:0), stearic (18:0) and oleic (18:1) acids (in decreasing order of abundance), with lower abundance of arachidic (20:4) and docohexaenoic (22:6) acids (Fliesler and Anderson, 1983; Göksel Gülcan et al., 1993; Bretillon et al., 2008). Spector and Yorek (1985) have more specifically studied the composition of retinoblastoma phospholipid fatty acids. They found in decreasing order of abundance 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 20:4 and 22:6. These are the same major fatty acids as previously detected in the retina, in similar order, except for 16:1 (palmitoleic acid) that was not mentioned before. This fatty acid was also found in our samples, in the PC and PE classes, with a significant but lower abundance than 16:0 and 18:1. In ARPE-19 cells, 16:1 appears only as a very minor FA. Polyunsaturated 22:6 and 20:4 fatty acids are the main polyunsaturated FA in retina and RPE cells. DHA is found with significant abundance in PE and PS in the retina (Fliesler and Anderson 1983), more in PS than in PE in Y79 (this study). AA is abundant in the PI class in retina (Fliesler and Anderson 1983), and in PE and PI classes in Y79 (this study). In ARPE-19, the polyunsaturated fatty acids seem less synthesized than in Y79, although 20:4 is quite abundant in PE (as PE-O) and PI. In this cell line, there is a non-negligible abundance of linoleic acid (18:2).

Recent advances in the development of “soft” ionization sources coupled with MS/MS capable and/or high resolution mass spectrometers enable the exhaustive molecular species identification inside each phospholipid class. The first global lipidomic profile of rat normal retina with more structural information was performed by ESI/MS-MS (Busik et al. 2009).

More recently, Zemski Berry et al. (2014), described for the first time the lipidomic profile of human retina and optic nerve using MALDI imaging mass spectrometry. They determined the distribution and localization of the main phospholipid species with focus on PC and PE. Only the more abundant species were identified. These species were also found in our Y79 cells lipid extracts. In their quantitative study of PC species, Berdeaux et al. (2010) showed that half of the identified PC species in the human retina were enriched with 22:6 chains, and only three species with 20:4 ones. However, the amounts of these species did not exceed 17% and 12% respectively. They were not detected in our samples. We compared some of our results to those published in these recent studies (Table 2.08). Although abundance of the major species in PC, PS, PI classes are the same, we found significant differences in the PE class of Y79 cell lipids.

Table 2.08: comparison of identified phospholipid species (the three abundant ones) listed in order of their abundance with literature results. (-) not determined.

Lipid species	Zemsky Berry et al. (2014) Human Retina	Berdeaux et al. (2010) and Acar et al (2012) Human Retina	Srimany et al. (2015) Y79 cells	This study Y79 cells
PC	PC (34:1) PC (36:1) PC (38:4)	PC [16:0/18:1] PC [16:0/16:0] PC [18:0/18:1] & PC [18:0/22:6]	PC (34:1) PC (32:1) PC (36:1)	PC (34:1) =PC [16:0/18:1] PC (32:1)= PC [16:1/16:0] PC (32:0)=PC [16:0 /16:0]
PE	PE [18:0/22:6] PE [P-18:0/20:4] PE [18:0/20:4]	PE [18:0/22:6] PE [16:0/22:6] PE [18:1/22:6]	-	PE [18:0/20:4] PE-P [16:0/20:4] PE-O [16:1/18:1] & PE-O [16:0/18:2] & PE-O [18:1/16:1] & PE [16:0/18:1] & PE [16:1/18:0]
PS	PS [18:0/18:1] PS [18:0/20:4] PS [18:0/22:6]	-	-	PS [18:0/18:1] PS [18:0/22:6] PS [18:0/22:5]
PI	PI [18:0/20:4]	-	-	PI [18:0/20:4]
SM	SM (d18:1/18:0) SM (d18:1/16:1)	-	-	SM (d18:1/16:0)

Artificial model monolayers mimicking Y79 membranes

The data deduced from the lipidomic analysis were used to build model monolayers for the Y79 cell membrane, which were analyzed in the same manner as lipid extracts. The objective was to obtain a model formed of the major phospholipid classes and cholesterol with a compressibility modulus close to 52.1 mN/m at 30 mN/m (the value of the mean compressibility modulus of the Y79 lipid membrane extract monolayer). The relative proportions of PC/PE/PS/Chol were deduced from the results in Table 2.05. The PS percentage was chosen so as to be the sum of PS and PI. In a first approach, as previously done by Makky et al. (2011), all phospholipids contained 18:0-18:1 chains. The comparison of the viscoelastic properties for the SOPC/SOPE/SOPS/Chol (36:34:12:18) mixture (Model 1), and that of the SOPC/SOPE/SOPS/Chol (56:23:11:10) one deduced from the lipidomic analysis (Model 2) did not show any significant difference, although the mass ratio significantly varied between PC, PE and Chol (Figure 2.10). The obtained monolayers were much more organized than the membrane lipid extracts one, and at surface pressures close to 30 mN/m their compressibility moduli exceeded 100 mN/m: They were in a liquid-condensed state. Such a high degree of organization could hinder a porphyrin penetration.

Lipid identification has shown that in the PC class, the major lipid was POPC (16:0/18:1), with also a relative abundance of PC[16:1/16:0], and of DPPC (16:0/16:0). This was observed in both the mitochondria and plasma membrane. In the PE class, the most abundant phospholipid was SAPE (18:0/20:4), but significant amounts of PE [16:1/18:0] and POPE (16:0/18:1) were also found. In the PS class, the major lipid was SOPS (18:0/18:1), but PS [18:0/22:6] was also very abundant. The variation in chain length and unsaturation among the phospholipids was much larger than our first phospholipid mixtures modeled it. We hypothesized that by mixing phospholipids with chain lengths varying between C16 and C22, and unsaturation degree between 0 and 6, it would be possible to better mimic the viscoelastic properties of the plasma membrane. We have thus studied various compositions of lipid monolayers such as POPC/SAPE/SOPS/Chol (56:23:11:10). Unfortunately, this monolayer showed the highest compressibility modulus, 129 mN/m at $\pi = 30$ mN/m. We also tried a more complex composition, taking all significant phospholipid species in the Y79 membranes, with a large panel of lipid chain lengths and degrees of unsaturation: POPC/DPPC/DHAPC/POPE/SAPE/SOPS/Chol (30:16:10:7.5:15.5:11:10). However, the compressibility modulus was barely lowered, to 118 mN/m at 30 mN/m. In comparison, pure

POPC, SOPC, and SDHAPC monolayers on buffer had compressibility moduli varying between 113 mN/m (POPC, SOPC) and 98 mN/m (SDHAPC). Replacing all PC by SDHAPC in Model 2 allowed to lower the compressibility modulus below the 100 mN/m threshold value. Finally the best result was obtained by replacing the oleoyl chains of both PC and PE in Model 2 by DHA (22:6), and AA (20:4), respectively (Model 6: SDHAPC/SAPE/SOPS/Chol 56:23:11:10) (Table 2.09) and Figure 2.10). Although Model 6, with a C_s^{-1} value of 81.5mN/m is not yet optimal compared to membrane lipid extracts, its monolayer is liquid-expanded, sufficiently disorganized to mimic the retinoblastoma cell membrane. It might be used as it is, or further lowering of the compressibility modulus could be achieved by adding for example, a fatty acid (Hac-Wydro et al. 2009). It is interesting to note that Treen et al. (1992) have observed changes in the fluidity of Y79 cell membranes upon DHA supplementation of the cell culture medium.

Table 2.09: Composition and compressibility modulus of various model lipid monolayers mimicking the Y79 plasma membrane.

Class	PC (wt%)				PE (wt%)			PS (wt%)	Chol (wt%)	C_s^{-1} (mN/m) at $\pi = 30$ mN/m
	DP	PO	SO	SDHA	PO	SO	SA			
PL species										
Model 1*	-	-	36	-	-	34	-	12	18	116.0
Model 2	-	-	56	-	-	23	-	11	10	122.4
Model 3	-	56	-	-	-	-	23	11	10	129.0
Model 4	16	30	-	10	7.5	-	15.5	11	10	118.0
Model 5	-	-	-	56	-	23	-	11	10	89.9
Model 6	-	-	-	56	-	-	23	11	10	81.5

* Makky *et al.* 2011

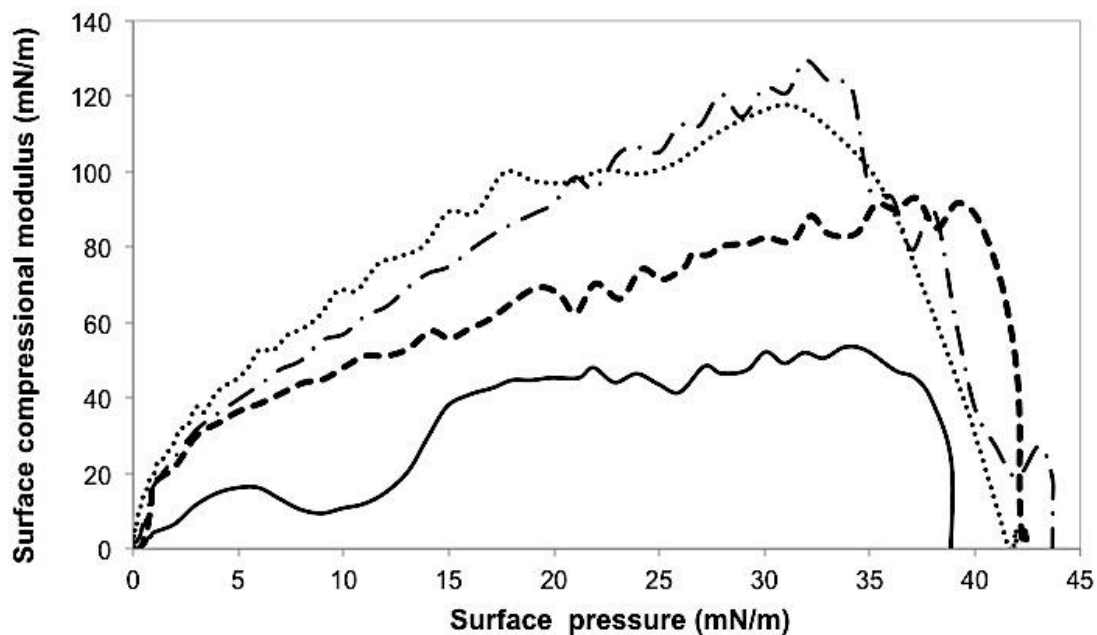


Figure 2.10: Surface compressional moduli for lipid mixtures mimicking the Y79 plasma and ER membrane (dotted line: model 1; dashed-dotted line: model 2; dashed line: model 6), and for the corresponding lipid extract (solid line).

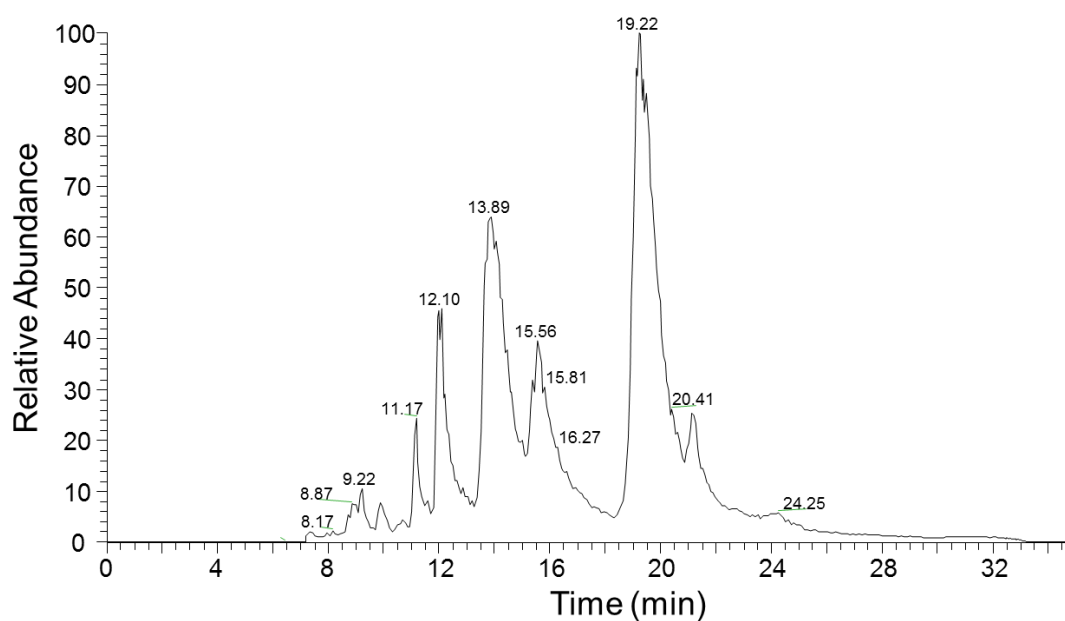
4. Conclusion

We have performed a unique and extensive lipidomic analysis of retinoblastoma and ARPE-19 cell, membrane and mitochondria lipids. This study allowed to point out some significant differences in the lipid composition of derived from photoreceptors compared to epithelial cells. The data were used to determine a phospholipid-cholesterol composition mimicking the variety of classes and fatty acid chain lengths of retinoblastoma cell membrane, with reasonably low compressibility modulus. Such a model could be useful to analyze drug penetration.

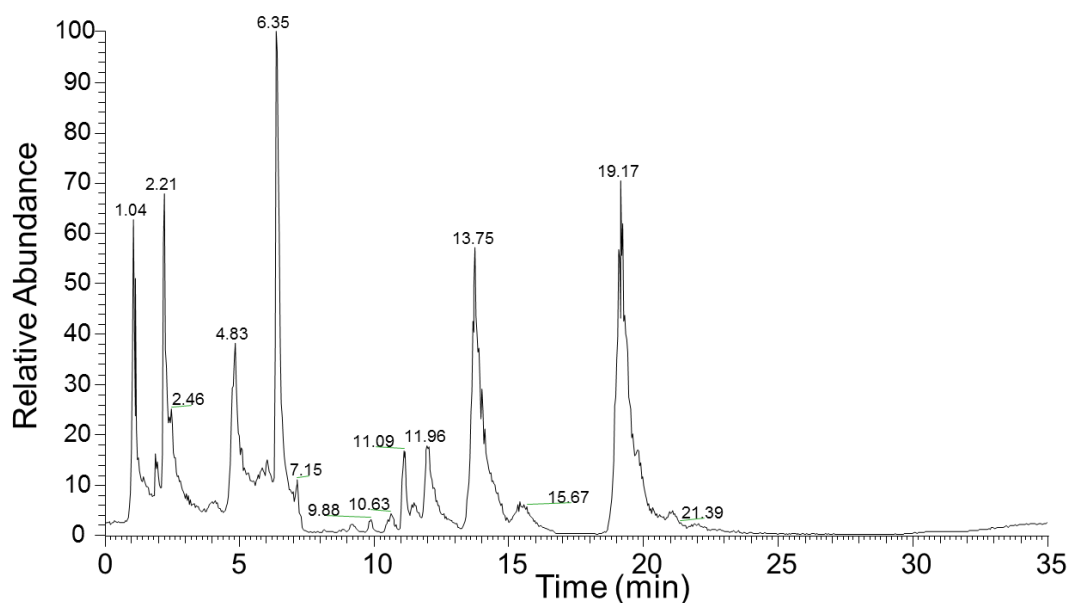
5. Article appendices

Table A2.01: Chromatographic elution gradient. Phase A: Heptane / Isopropanol (98:2), Phase B: Chloroform / Isopropanol (65/35), Phase C : Methanol / H₂O (95/5), Phase D: Isopropanol. Phases A, B and C were supplemented by 1% acetic acid and 0.08% triethylamine (v/v).

Time (s)	%A	%B	%C	%D
0	98	2	0	0
2	98	2	0	0
8	12	88	0	0
22	0	60	40	0
26	0	60	40	0
27	0	0	0	100
29	0	0	0	100
30	98	2	0	0
44	98	2	0	0



(a) TIC MS ESI mode



(b) TIC MS APCI mode

Figure A 2.01: TIC MS profiles for Y79 in ESI negative (a) and APCI positive (b) ionization for total lipid extracts.

Acknowledgements:

Dr Catherine Brenner-Jan (UMR-S 1180), Dr Danielle Libong (Lip(Sys)²), Prof. Philippe Loiseau (BioCis), Dr Marilyne Moulin (UMR-S 1180), and Dr Ronny Herzog (Lipotype GmbH, Germany) for helpful discussions. Stéphanie Denis, and Laurence Romy (UMR CNRS 8612) for technical assistance.

D. Essaid and K. Daghdjian are indebt to the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) for PhD funding.

CORDIM and MALINF are acknowledged for their financial support in Orbitrap acquisition.

10. Résultats complémentaires

10.1. Optimisation du protocole du fractionnement

10.1.1. Protocole initial de fractionnement

Pour les premiers essais de fractionnement et d'extraction des lipides, nous sommes partis d'un protocole mis au point au laboratoire par la doctorante qui m'avait précédée (K. Daghdjian, thèse 2013).

Ce protocole consistait à prélever 25 000 000 cellules Y79 ayant atteint 90% de confluence, à les centrifuger et à les laver à deux reprises par du DPBS. Un volume de 5 mL d'une solution de lyse (saccharose 0,25 M, Tris pH 7,6 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 0,15 mM et phenylmethane sulfonylfluoride antiprotéase PMSF 0,4 mM, ajouté extemporanément) était ajouté au culot de cellules. Après homogénéisation, la suspension était conservée 30 minutes dans la glace.

Dans un homogénéisateur de Potter, la solution était bien homogénéisée (100 allers-retours avec le piston). La suspension était ensuite centrifugée à 850g pendant 5 min à 4°C à deux reprises. Le culot obtenu correspondait à la fraction nucléaire. Le surnageant de la première centrifugation (S1) était ensuite isolé et centrifugé à 10 000g pendant 15 min. Le surnageant (S3) était de nouveau centrifugé pendant 15 minutes à 20 000g à 4°C. Les culots (C3 et C4) de ces deux dernières centrifugations, contenant les grosses et les petites mitochondries respectivement, étaient repris dans 2ml de tampon de lyse et centrifugés à 20000g pendant 15min à 4°C. Le culot C5 représentait la fraction mitochondriale.

Le surnageant S4 était centrifugé aussi à 100 000g pendant 1h à 4°C. Le culot issu de cette centrifugation représentait la fraction microsomiale (réticulum endoplasmique, membrane plasmique et microsomes). Toutes les fractions étaient conservées à -20°C.

Le schéma de la figure 2.11 illustre de manière simplifiée ce protocole de fractionnement subcellulaire.

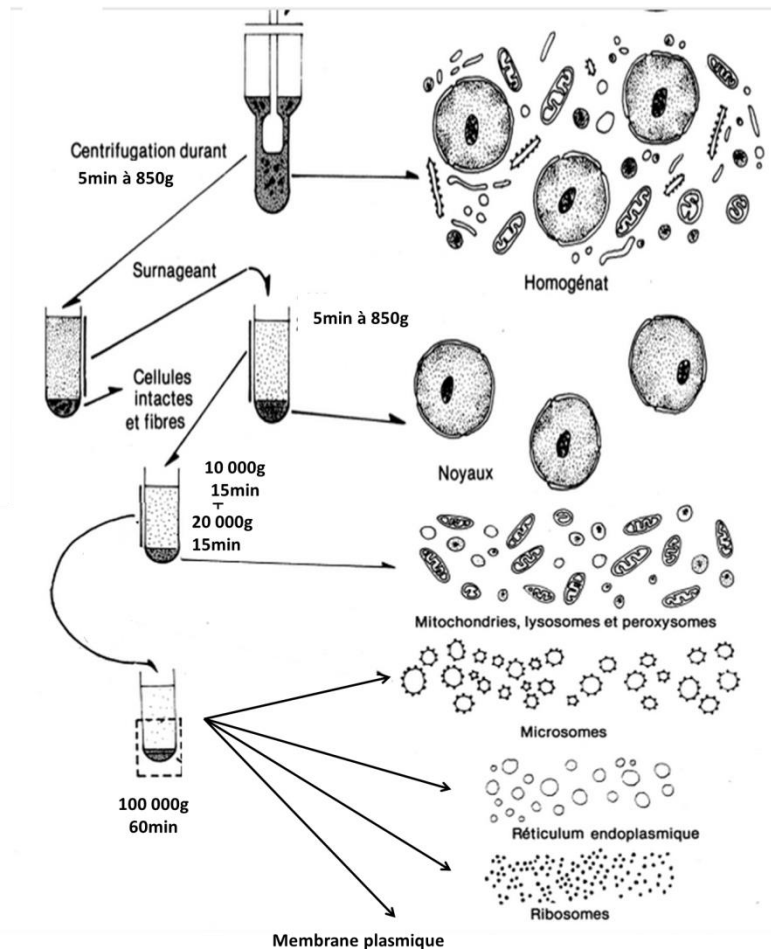


Figure 2.11 : Schéma illustrant les étapes de fractionnement cellulaire basé sur la centrifugation différentielle.

(Modifié d'après *Biologie cellulaire et moléculaire pour Eduardo D. P. De Robertis, E. M. F. De Robertis traduit par André Lemonde, Clément Delisle, 1983*)

Pour l'extraction des lipides, le culot de chaque fraction était repris dans un volume de 1 mL du tampon HEPES (10 mM d'HEPES, 150 mM de NaCl, pH 6,5) et un volume de 3.75 mL de solvant Folch (Chloroforme : Méthanol (2 :1)). La solution était ensuite agitée au vortex pendant 5 min puis laissée au repos durant 2h. Les solutions ajoutées permettent la lyse des cellules et le passage des lipides dans la phase organique. Après 5 minutes de centrifugation à 3000g, la phase organique (phase inférieure) était isolée, évaporée sous flux d'azote, et lyophilisée. Les films lipidiques obtenus étaient conservés à -20°C.

10.1.2. Optimisation du protocole

Les résultats de quantification obtenus par le protocole décrit ci-dessus se résument dans le graphe de la figure 2.12:

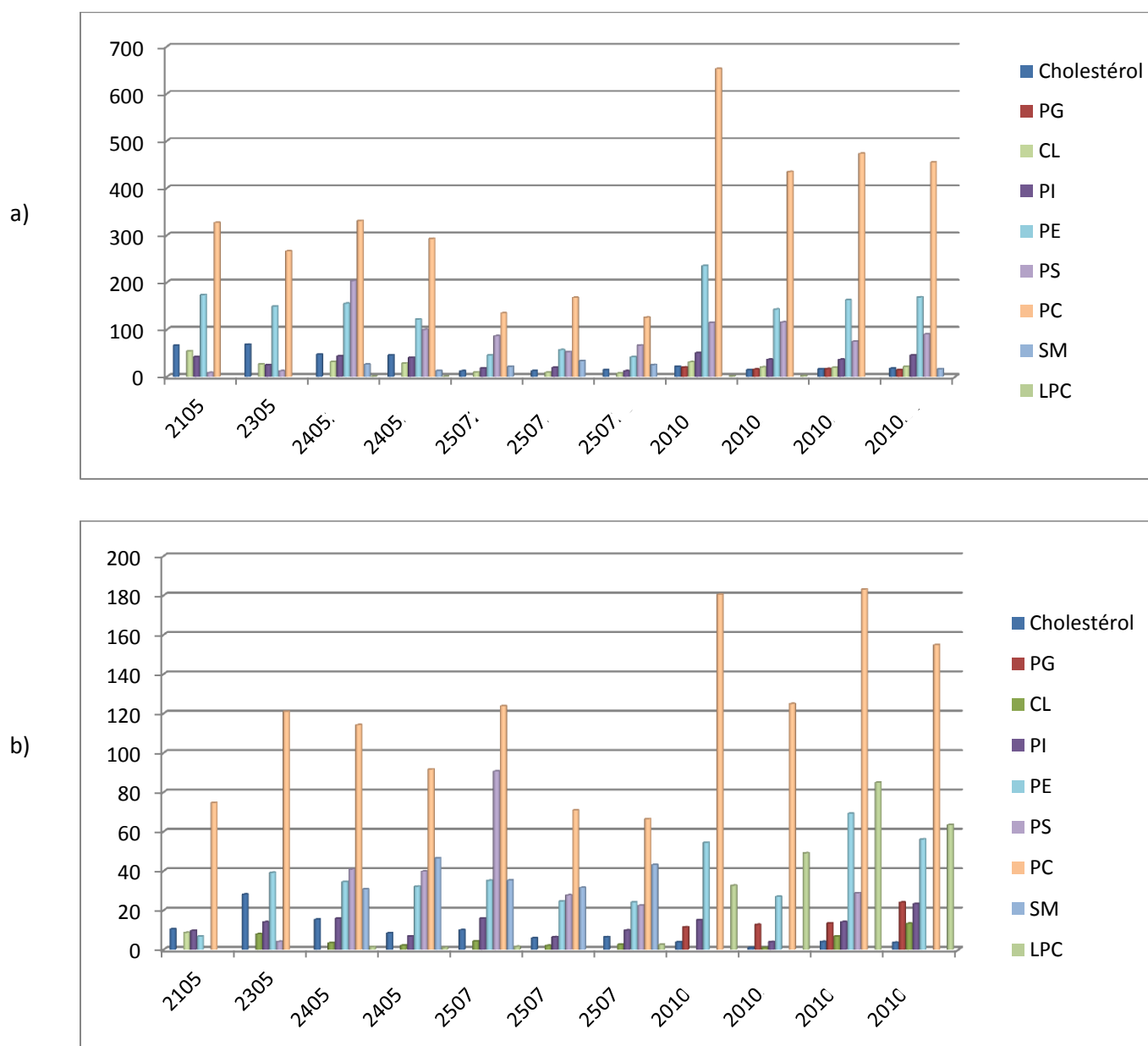


Figure 2.12: Résultats de quantifications des fractions mitochondriales (a) et des membranes plasmiques (b) obtenus par un premier protocole. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/ml}$ de lipides quantifiés. L'axe des abscisses indique les dates du fractionnement des cellules.

Une grande variabilité entre les fractions a été décelée ; Les fractions ayant des quantités de lipides proches ont été réalisées le même jour, à partir d'un lot de cellules dans un même état. Après analyse des résultats, il a été conclu que ces résultats n'étaient pas acceptables.

J'ai procédé alors à certaines mesures d'optimisation, et un nouveau protocole a été mis en place, en suivant les conseils du Dr Vergnaud (pour les conditions de culture) et du Dr Moulin (pour le fractionnement cellulaire).

Les principaux éléments d'optimisation peuvent se résumer ainsi:

- Accorder une attention aux conditions de cultures : le nombre de cellulesensemencées par *flask*, la confluence maximale pré-passage.
- Augmenter le nombre de cellules pour le fractionnement à 100×10^6 , et effectuer ce fractionnement 24h après le dernier passage.
- Une seule centrifugation à $\times 10000$ suffit pour isoler toutes les mitochondries
- Le contrôle par western blot de la pureté des culots.
- Le protocole utilisé précédemment n'était pas réellement le protocole de Folch (Folch et al., 1957) ni celui de Bligh et Dyer (Bligh et Dyer 1959). En ajoutant le chloroforme, on n'observait pas de séparation de phase instantanée. Nous avons préféré appliquer le protocole de Folch à la lettre.
- Le protocole initial était très long, incluant plusieurs chocs thermiques alors que les cellules sont préalablement lysées, ce qui nous a semblé inutile.

10.2. Western Blot

La qualité des culots issus de l'homogénéisation a été vérifiée par western blot (figure 2.13) en utilisant deux anticorps (anti citrate synthase et anti Na^+/K^+ ATPase beta) . Il est à noter que cette technique a été utilisée pour détecter la pureté des culots sans qu'un dosage de protéines n'ait été effectué préalablement. Le nombre des cellules lysées à la fin de l'homogénéisation étant inconnu et la quantité des protéines dans les 25 μ l déposés à chaque fois étant également inconnue, l'intensité des bandes de la figure 2.13 ne reflète pas une information quantitative. A cela s'ajoute le fait que les dilutions des deux anticorps utilisées n'était pas non plus la même. Apparemment, contrairement à la notice du fournisseur,

l'anticorps anti Na⁺/K⁺ ATPase beta ne serait pas uniquement spécifique à la membrane plasmique, mais pourrait également interagir avec la membrane mitochondriale.

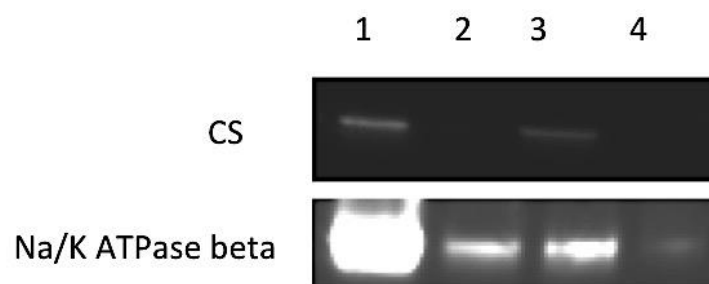


Figure 2.13: Western blot des fractions mitochondriales (1 and 3) et la fraction de la membrane plasmique / reticulum endoplasmique (ER) (2 and 4) de la lignée Y79.

10.3. Dosage des protéines

Il existe plusieurs manières de présenter les résultats de quantification des lipides. Dans la littérature, les résultats peuvent être exprimés soit en % des phospholipides (comme le cas de notre article) ou en % des lipides totaux (donc par rapport à la masse du film lipidique obtenu), ou par rapport au nombre des cellules ou encore en mg de lipides/mg de protéines...

Dans notre cas, il est difficile d'exprimer la quantité des lipides dans les fractions par rapport aux nombres de cellules de départ, bien qu'elles soient bien comptées avec la lame de Kova. Ceci est dû au fait que les cellules ne sont pas toutes lysées et qu'on ne peut pas estimer le rendement de l'homogénéisation. Néanmoins, nous avons essayé de présenter les résultats par rapport aux protéines. On pourrait penser qu'il est possible de doser les protéines dans la phase polaire supérieure (méthanol-eau) au moment de l'extraction des lipides par le mélange de Folch. Or le protocole d'extraction des lipides n'est pas adapté pour le dosage des protéines. Akopian (2006) a montré une perte de 50% des protéines dosées après une extraction de lipides par rapport aux protéines se trouvant dans un mélange total de culture cellulaire. Nous avons donc procédé au prélèvement d'un petit volume de chaque fraction (après centrifugation), dont une partie sert pour le dosage des protéines et une autre pour le western blot. Cependant, la quantité de protéines ne sera pas la même pour une même fraction car le nombre des cellules lysées reste inconnu.

Le protocole expérimental utilisé pour la quantification des protéines est le suivant: le culot est mélangé avec du tampon RIPA (1 mL pour 40 mg de culot) pour s'assurer d'une bonne extraction des protéines. Le tampon RIPA contient un cocktail d'antiprotéases (qui sont aussi ajoutées au tampon d'homogénéisation). Après incubation d'1 heure dans la glace, le culot est centrifugé à 3000 g pendant 10 min.

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford en utilisant une gamme étalon de BSA (Bradford, 1976). L'absorbance est mesurée à 595 nm dans un lecteur microplaques (LabSystems Multiskan MS).

Les résultats que nous avons obtenus (tableau 2.10) montrent des intervalles de variation plus larges quand les contenus en lipides sont exprimés en fonction des protéines, que lorsqu'ils sont exprimés en % par rapport au total des lipides dosés.

Tableau 2.10: Résultats de quantification des lipides dans les fractions des cellules de Y79 et ARPE-19. Les résultats sont exprimés d'une part en % relatifs par rapport aux lipides totaux et, d'autre part, en mg de lipide/mg de protéine (P)

NQ: lipides non quantifiés.

	CHOL	CL	PI	PS	PE	PC	SM	LPC
Y79 mitochondria	7,9 - 10,5 %	3,6 – 6 %	4,5 – 6,9 %	3,9 - 5,5 %	21,8- 32,7 %	42,5-52,9 %	NQ	NQ
	0,78-2,58 (mg/mg de P)	0,55-0,99 (mg/mg de P)	0,44--1,7 (mg/mg de P)	0,48- 1,51 (mg/mg de P)	3,14-6,78 (mg/mg de P)	4,5-12,94 (mg/mg de P)	NQ	NQ
Y79 Plasma membrane	8,9 - 15,2 %	NQ	5,1 - 7,6 %	4,9 - 10,7 %	17,6 – 23,8 %	51,5 – 57,9 %	NQ	NQ
	1,48 -4,78 (mg/mg de P)	NQ	1,1 - 2,73 (mg/mg de P)	0,76- 3,86 (mg/mg de P)	3,97- 9,79 (mg/mg de P)	9,3 -16,22 (mg/mg de P)	NQ	NQ
ARPE-19 mitochondria	21,1 - 23,8 %	1,8 - 4,2 %	2 - 4,1 %	5,2- 7,9 %	14,5 - 22,1 %	34 %	10,5-13,4 %	NQ
	13,71-16,41 (mg/mg de P)	0,86-2,74 (mg/mg de P)	0,97-2,67 (mg/mg de P)	5,11-9,81 (mg/mg de P)	9,44-11,3 (mg/mg de P)	20,89-22,60 (mg/mg de P)	3,11-8,70 (mg/mg de P)	NQ
ARPE- 19 plasma membrane	15,5 - 19,1 %	4,1 %	6,9 - 8 %	7 - 9,6 %	11,1 - 19,7 %	32 - 38 %	8,7 - 15,8 %	NQ
	1,63-4,47 (mg/mg de P)	1,2-0,98 (mg/mg de P)	1,2-1,87 (mg/mg de P)	0,87-2,24 (mg/mg de P)	2,61-10,49 (mg/mg de P)	7,46-17,9 (mg/mg de P)	1,02-3,69 (mg/mg de P)	NQ

10.4. Identification des lipides

Etant donné la diversité des lipides et plus particulièrement celle des lipides neutres (ou apolaires), seuls les phospholipides ont été bien identifiés (en plus de la SM). En revanche, des essais d'identification des lipides apolaires, à partir des données enregistrés en APCI positif, ont été entrepris mais n'ont pas abouti à des résultats.

L'identification des phospholipides est plus connue et facile à réaliser sauf pour la CL. Mis à part, l'identification des chaînes d'acides gras, il est possible de préciser la position de chaque acide gras. Les positions sn-1 et sn-2 des phospholipides sont fixées en fonction des intensités des ions formés. Ceci varie d'une classe à une autre et parfois en fonction de la source utilisée. Si l'acide gras de la phosphatidylcholine le plus intense est en position sn-2 en mode ESI, il ne l'est pas vraiment en mode FAB (fast atomic ionisation). En effet, dans le mode FAB, s'il y a plus de deux doubles liaisons sur la chaîne de l'acide gras, l'acide gras le plus intense est alors en position sn-1 et non sn-2 (Gage et al., 1994).

Dans ce qui suit, nous présentons notre démarche pour l'identification des quelques phospholipides majoritaires PS, PC PE et un sphingolipide la SM.

La PS : l'analyse en ESI négatif produit principalement des ions $[M-H]^-$, avec des ions $[M-H-87]^-$ qui correspondent à la perte du groupement sérine ($C_3H_5NO_2$). Ceci explique que le full scan de m/z 788.54 soit dominé par l'ion 701 ; il est suggéré que les ions formés lors de la fragmentation soient le résultat de la fragmentation de l'ion $[M-H-87]^-$ et non $[M-H]^-$. Le rapport des intensités des ions sn-2/sn-1 détermine leurs positions. Selon l'exemple de la figure 2.14, l'AG m/z 283 est plus intense que m/z 281, ce qui induit 18:0 (m/z 283) en position sn-1 et 18:1 (m/z 281) en position sn-2. Cependant les ions m/z 419 et m/z 437 correspondant à la perte du groupe $RCOOH$ $[M-H-87-R_2CO_2H]^-$ et l'acide gras en tant que ketene $[M-H-87-R'_2CH=C=O]^-$ sont plus intenses que ceux correspondant à la perte des mêmes groupes de l'AG sn-1 (m/z 417 et m/z 435) (Hsu & Turk, 2005).

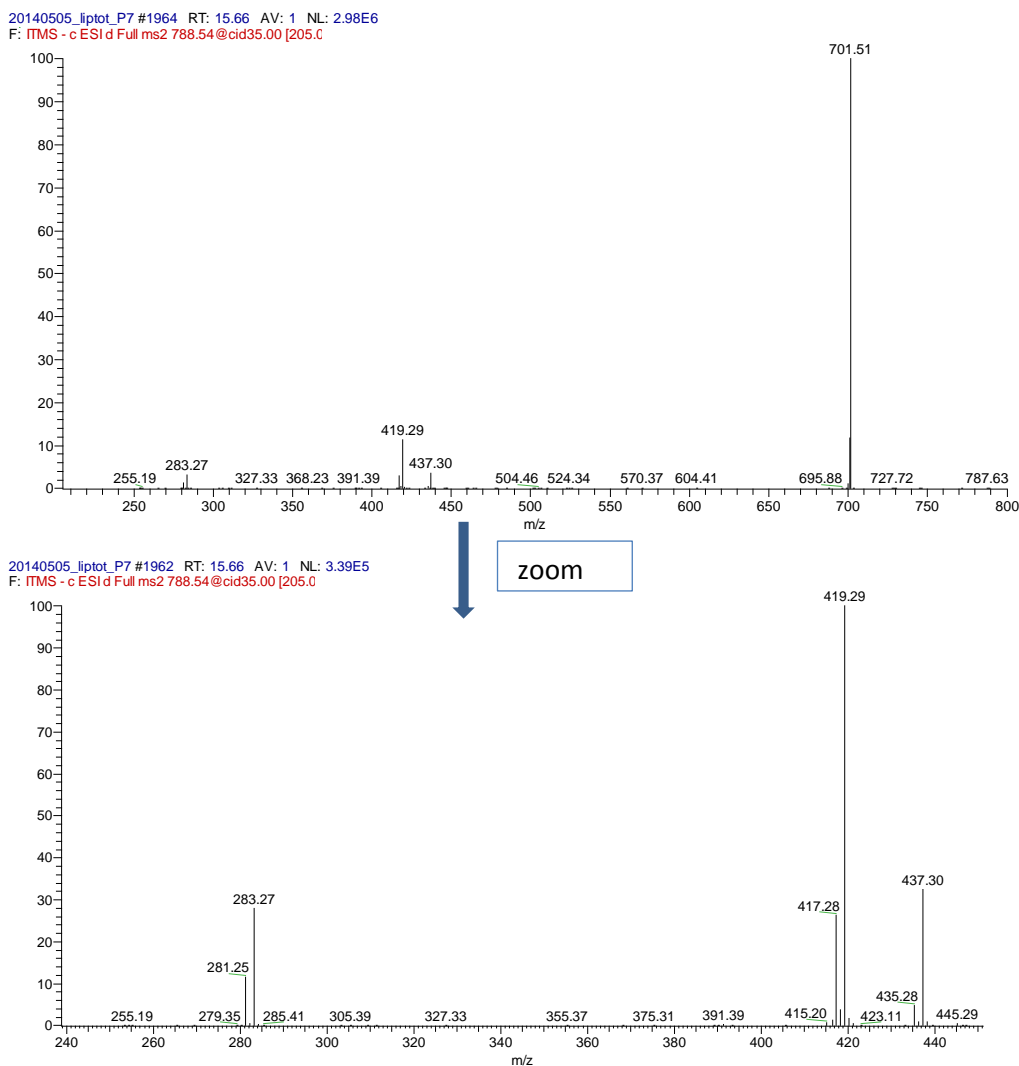


Figure 2.14 : Spectre de MS² d'une phosphatidylsérine, $m/z=788.54$

PC contient un atome d'azote portant trois charges positives. Ceci permet la formation d'ion plutôt positif que négatif en mode ESI. Dans nos conditions, le seul ion formé en ESI négatif est $[M + CH_3COO]^-$. L'ion m/z 184 correspondant à la choline protonée (en ESI⁺ par exemple) domine le spectre. Cependant comme le système est réglé à un « cut off » de 250, il n'a pas été possible de détecter cet ion. Certains auteurs ont démontré qu'il ne faut pas se baser sur l'intensité de groupement carboxylate (RCOOH), car celle-ci varie selon l'énergie de collision pour la PC. La figure 2.15 présente un exemple d'identification de la PC $m/z=818.59$

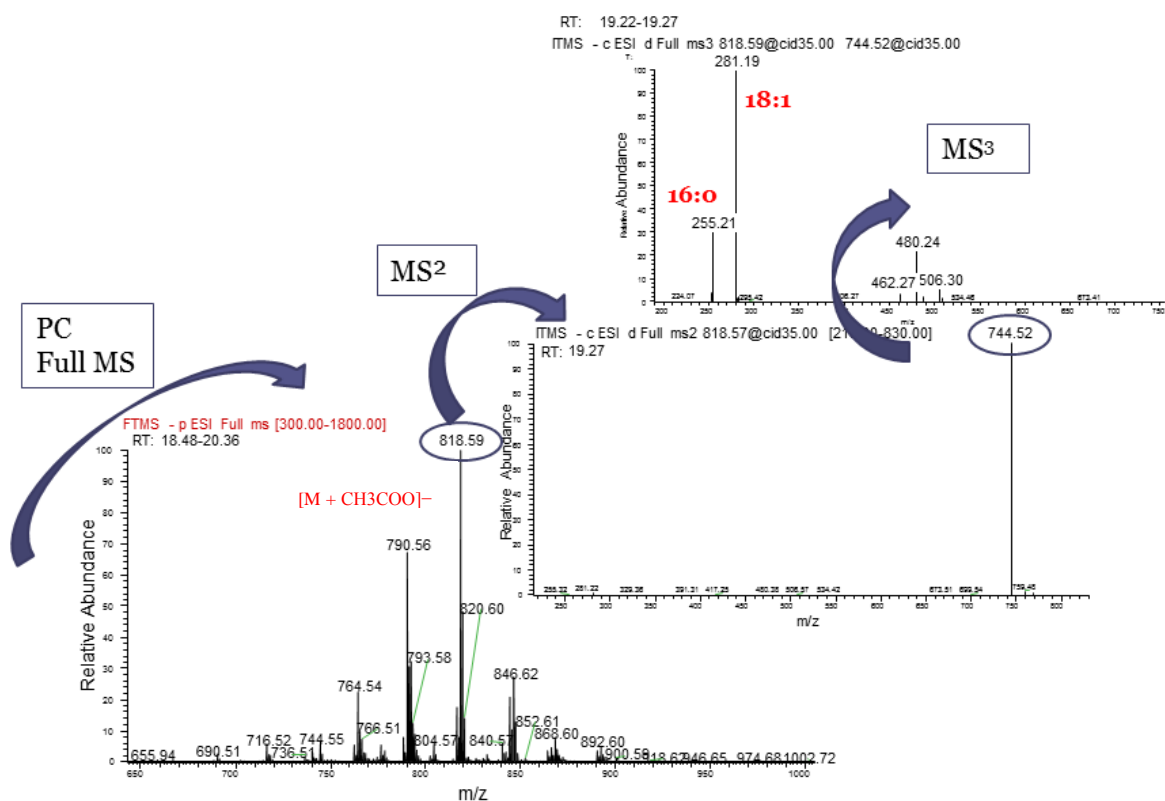


Figure 2.15 : Spectre de MS² et MS³ d'une phosphatidylcholine, m/z 818.59

La PC est déterminé par le stade MS³, l'acide gras le plus intense se trouve dans la position sn-2 et le moins intense dans la position sn-1.

La SM : Les ions pouvant être observés avec la sphingomyéline dans notre système sont principalement $[M + CH_3COO]^- = M+59$ ou $M-CH_3 = M-15$. Ces deux ions ont été observés dans nos échantillons. Il est aussi possible de voir SM+Cl (chlore).

La PE : En ESI- le seul ion observé est le $[M-H]^-$. En APCI positif, tous les ions observés sont $[M+TEA]^+$, ce qui correspond à la triéthylamine provenant de la phase mobile (voir annexe de l'article pour la composition de la phase mobile). En effet, le TEA interfère en mode d'ionisation positive [m/z 102] ou négative [m/z 113], mais ce dernier ion n'a pas été observé dans nos échantillons à cause du cut-off du système.

10.5. Extraction des lipides de membranes par fixation des cellules sur la poly-lysine :

Etant donné notre intérêt particulier pour les membranes plasmique des cellules, et la faible quantité qu'il en était possible d'obtenir par la voie classique du fractionnement, nous avons pensé à mettre au point un autre protocole inspiré des travaux de Bezrukov et al. (2013).

Il s'agit de fixer les cellules sur de la poly-lysine, lyser les cellules, rinser et récupérer les lipides supposés être ceux de la membrane cellulaire seulement.

Le protocole détaillé est le suivant :

La première étape consiste au lavage des boîtes de pétri en verre avec l'acide chlorhydrique et du méthanol 1:1 pendant 30 min. Cette étape est critique car elle permettra une bonne adhésion de la poly-lysine à la surface. Les boîtes sont ensuite bien lavées à l'eau distillée, puis à l'éthanol et séchées.

Un volume de solution de poly-L-lysine est ajouté de façon à bien couvrir toute la surface. La poly-lysine est adsorbée pendant toute la nuit à température ambiante. Les cellules de Y79 ou (ARPE-19) sont prélevées, centrifugées et lavées au PBS afin d'éliminer l'excès du sérum. Puis elles sont reprises dans le milieu de culture adéquat contenant uniquement des antibiotiques. Le nombre de cellules à ensemercer sur la surface recouverte de poly-lysine a été optimisé et fixé à 20 000 cellules / 5 mL (pour une boîte de 10 cm de diamètre). Ceci permet de couvrir le maximum de la surface. Après 4 heures d'incubation à 37°C, un taux d'adhésion élevé est obtenu.

La dernière étape de protocole consiste à réaliser la lyse sous un microscope optique en utilisant de l'eau glacée. Quatre lavages successifs de 1 min avec l'eau glacée et du tampon Tris-Buffered saline (TBS) (qui permet de dissoudre les débris cellulaires) ont été suffisants pour lyser les cellules de Y79 mais pas celles d'ARPE-19. Il leur fallait davantage de lavages. Finalement, l'extraction des lipides a été effectuée par la méthode de Folch détaillée précédemment.

Ce protocole est inspiré de l'article de Bezrukov et coll (2013), les auteurs ont utilisé des sondes fluorescentes pour marquer chaque organelle. Or nous ne disposons pas de telles sondes. Les résultats d'analyse en spectrométrie de masse ont été comparés à ceux obtenus par fractionnement classique. Le profil lipidique était le même pour tous les phospholipides.

Néanmoins, rien ne prouve que nous ayons analysé des échantillons de la membrane plasmique pure. En effet, l'absence des marqueurs lipidiques caractérisant les membranes et la similarité des intensités relatives des espèces identifiées pour les échantillons après fractionnement rend la discrimination difficile sur la base des résultats de la lipidomique. Un western blot n'est pas possible sur la même boîte. Rien ne garantit non plus que la lyse est suffisamment reproductible pour pouvoir faire un essai à part pour le dosage des protéines. Il faudrait réaliser d'autres essais.

10.6. Interaction porphyrine-modèle membranaire en monocouches

Faute de temps, une seule expérience d'interaction d'une porphyrine avec un modèle artificiel a pu être réalisée. Les solutions à 1mg/mL de lipides dissous dans un mélange chloroforme/méthanol 9:1 sont déposées à la surface du tampon qui contient la cuvette du tensiomètre. Le volume est déposé jusqu'à obtention d'une tension de surface de ~ 30 mN/m après repos du film. 1,8 μ L de la solution de TPP(*p*DEGMan)₃ dans le méthanol est ensuite injectée dans la sous-phase de façon à obtenir une concentration finale de 3×10^{-4} M. Les mesures ont été effectuées à une température de 21°C.

Les $\Delta\pi$ obtenus 18h après injection de la porphyrine sont :

+1,21 mN/m pour les lipides de la membrane plasmique ARPE-19,

+ 0,37 mN/m pour les lipides de la membrane plasmique Y79,

- 4,56 mN/m pour le modèle membranaire SDAHPC/SOPE/SOPS/Chol (56 :23 :11 :10)
(Modèle 5 du tableau 2.09 de l'article)

Les augmentations de pression superficielle observées avec les extraits lipidiques ARPE-19 et Y79 sont peu significatives. La diminution de pression de surface observée avec le modèle membranaire est significative, mais la cinétique présentée dans la figure 2.16 montre que l'abaissement observé est en fait dû à un effet d'injection car la pression remonte progressivement vers 0 : des lipides ont été chassés de l'interface au moment de l'injection et se réadsorbent progressivement. Pour pouvoir tirer des conclusions, il faudrait renouveler ces expériences plusieurs fois, à plusieurs pressions initiales et en étudiant les différents modèles

proposés comme l'avait fait précédemment Ali Makky (Makky et al 2010a) avec des modèles plus ou moins chargés en cholestérol.

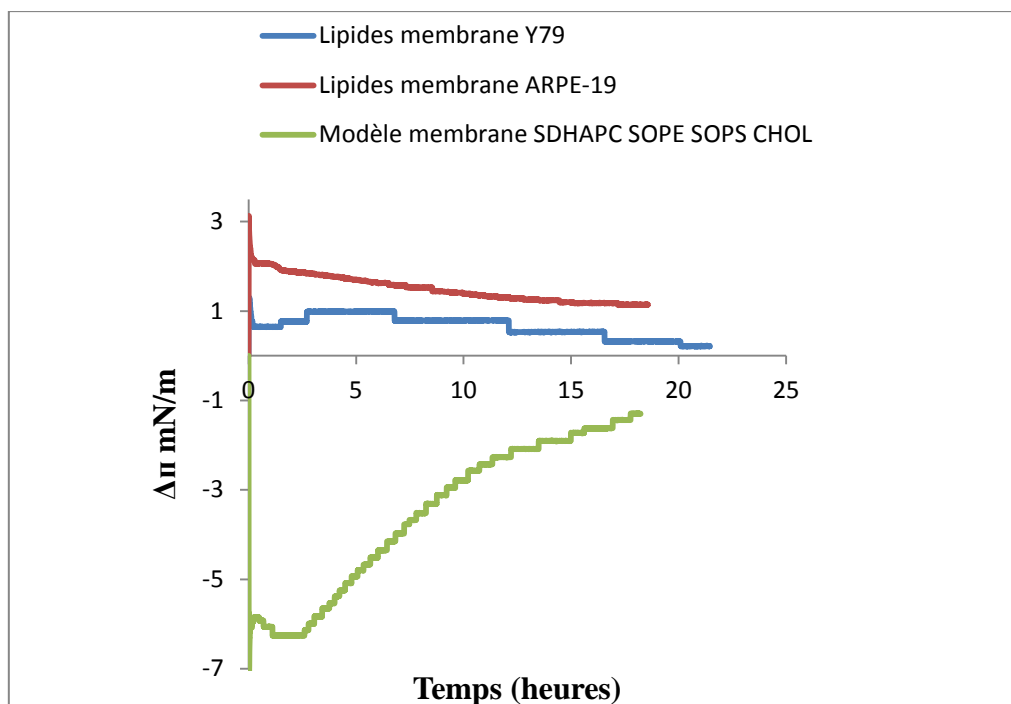


Figure 2.16 : Variation de la pression de surface induites par l'injection de la TPP(*p*DEGMan)₃

11. Références bibliographiques

- Acar N., Gregoire S., Andre A., Juaneda P., Joffre C., Bron A.M., Creuzot-Garcher C.P.C, Bretillon L., Plasmalogens in the retina: in situ hybridization of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT)—the first enzyme involved in their biosynthesis—and comparative study of retinal and retinal pigment epithelial lipid composition. *Exp. Eye Res.* 84 (2007) 143–151.
- Acar N., Berdeaux O., Grégoire S., Cabaret S., Martine L., Gain P., Thuret G., Creuzot-Garcher C.P., Bron A.M., Bretillon L., Lipid composition of the human eye: are red blood cells a good mirror of retinal and optic nerve fatty acids? *PloS One* 7 (2012) e35102.
- Akopian D., Medh J.D., Simultaneous isolation of total cellular lipids and RNA from cultured cells. *Biotechniques* 41 (2006) 426–430.

- Aktas M., Danne L., Möller P., Narberhaus F., Membrane lipids in *Agrobacterium tumefaciens*: biosynthetic pathways and importance for pathogenesis. *Front.Plant Sci.* 5(2014)1-13.
- Ambike A., Rosilio V., Stella B., Lepître-Mouelhi S., Couvreur P., Interfacial behavior of squalenoyl-gemcitabine nanoassemblies and interaction with phospholipid and cholesterol monolayers mimicking a biomembrane. *Langmuir* 27 (2011) 4891-4899.
- Antczak C., Klopping C., Radu C., Genski T., Müller-Kuhrt L., Siems K., de Stanchina E., Abramason D.H., Djaballah H., Revisiting old drugs as novel agents for retinoblastoma: in vitro and in vivo antitumor activity of cardenolides. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (2009) 3065-3073.
- Assanga S.B., Gil-Salido A.A., Lewis Lujan L.M., Rosas-Durazo A., Acosta-Silva A.L., Rivera-Castaneda E.G., Rubio-Pino J.L., Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res.* 4 (2013) 60–70.
- Azouzi S., El Kirat K., Morandat S., The potent antimalarial drug cyclosporine A preferentially destabilizes sphingomyelin-rich membranes. *Langmuir* 26 (2009) 1960-1965.
- Balaz S., Does transbilayer diffusion have a role in membrane transport of drugs? *Drug Discov. Today* 17 (2012) 1079-1087.
- Ballut S., Makky A., Michel J.P., Kasselouri A., Maillard Ph., Rosilio V., Tumor targeting in photodynamic therapy. From glycoconjugated photosensitizers to glycodendrimeric ones. Concept, design and properties. *Org. Biomol. Chem.* 10 (2012) 4485-4495.
- Berdeaux O., Juaneda P., Martine L., Cabaret S., Bretillon L., Acar N. Identification and quantification of phosphatidylcholines containing very-long-chain polyunsaturated fatty acid in bovine and human retina using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7738–7748.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911-917
- Bezrukov L., Blank P.S., Polozov I., Zimmerberg J., An adhesion-based method for plasma membrane isolation: evaluating cholesterol extraction from cells and their membranes. *Anal. Biochem.* 394 (2009) 171–176.
- Bradford M.M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- Braverman N.E., Moser A.B., Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822 (2012) 1442–1452.

- Bretillon L., Thuret G., Grégoire S., Acar N., Joffre C., Bron A.M., Gain P., Creuzot-Garcher C.P., Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and the lacrimal gland, an associations with adipose tissue fatty acids in human subjects. *Exp. Eye Res.* 87 (2008) 521-528.
- Busik J.V., Reid G.E., Lydic T.A., Global analysis of retina lipids by complementary precursor ion and neutral loss mode tandem mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* 579 (2009) 33-70.
- Dória M.L., Cotrim C.Z., Simões C., Macedo B., Domingues P., Domingues M.R., Helguero L.A., Lipidomic analysis of phospholipids from human mammary epithelial and breast cancer cell lines. *J. Cell Physiol.* 228 (2013) 457-468.
- Dixon R.W., Peterson D.S., Development and Testing of a Detection Method for Liquid Chromatography Based on Aerosol Charging. *Anal. Chem.* 74 (2002) 2930-2937.
- Dobson P.D., Kell B.D., Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? *Nat.Rev.Drug Discov.* 7 (2008) 205-220.
- Dunn K.C., Aotaki-Keen A.E., Putkey F.R., Hjelmeland L.M., ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differential properties. *Exp. Eye Res.* 62 (1996) 155-169.
- Eeman M., Deleu M. From biological membranes to biomimetic model membranes *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14 (2010) 719-736.
- Fahy E., Subramaniam S., Brown H.A., Glass C.K, Merrill A.H.J., Murphy R.C., Raetz C.R., Russell D.W., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spener F., van Meer G., Van Nieuwenhze M.S., White S.H., Witztum J.L, Dennis E.A., A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 46 (2005) 839-861.
- Fahy E., Cotter D., Sud M., Subramaniam, S., Lipid classification, structures and tools. *Biochim.Biophys. Acta* 1811 (2011) 637-647
- Fadel O., El Kirat K., Morandat S., The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Biochim. Biophys. Acta* 1808 (2011) 2973-2980.
- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497-509.
- Fliesler S.J., Anderson R.E., Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. Lipid Res.* 22 (1983) 79-131.
- Futterman S., Andrews J.S., The fatty acid composition of human retinal vitamin A ester and the lipids of human retinal tissue. *Invest. Ophthalmol.* 3 (1964) 441-444.
- Gage D.A., Huang Z.H., Sweeley C.C., Characterization of Diacylglycerolphospholipids by Fast Atom Bombardment Tandem Mass Spectrometry. *Modern Analytical*

Chemistry: Mass Spectrometry (1994) 53–87.

- 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 (1989) 723-730.
- Gülcan H.G., Alvarez R.A., Maude M.B., Anderson R.E., Lipids of Human Retina, Retinal Pigment Epithelium, and Bruch's Membrane/Choroid: Comparison of Macular and Peripheral Regions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34 (1993) 3187–3193.
- Gzyl-Malcher B., Handzlik J., Klekowska E., Interaction of prazosin with model membranes – A Langmuir monolayer study. *Bioelectrochem.* 87 (2012) 96-103.
- Hac-Wydro K., Jedrzejek K., Dynarowicz-Latka P., Effect of saturation degree on the interactions between fatty acids and phosphatidylcholines in binary and ternary Langmuir monolayers, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 72 (2009) 101-111.
- Herzog R., Schuhmann K., Schwudke D., Sampaio J. L., Bornstein S.R., Schroeder M., Shevchenko A., LipidXplorer: a software for consensual cross-platform lipidomics. *PloS One*, 7 (2012):e29851.
- Hornof M., Toropainen E., Urtti A., Cell culture models of the ocular barriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2005) 207-225.
- Houtkooper R.H., Vaz F.M., Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell Mol. Life Sci.* 65 (2008) 2493–2506.
- Howell K.E., Devaney E., Gruenberg J., Features Subcellular fractionation of tissue culture cells. *Trends Biochem. Sci.* 14 (1989) 44–47.
- Hsu F.F., Turk J., Structural determination of sphingomyelin by tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000a) 437–449.
- Hsu F.F., Turk J., Characterization of phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-4-phosphate, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate by electrospray ionization tandem mass spectrometry: A mechanistic study. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000b) 986–999.
- Hsu F.F., Turk J., Studies on phosphatidylglycerol with triple quadrupole tandem mass spectrometry with electrospray ionization: fragmentation processes Structural characterization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12(2001) 1036-1043.
- Hsu F.F., Turk J., Electrospray ionization/tandem quadrupole mass spectrometric studies on phosphatidylcholines: The fragmentation processes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003) 352–363.

- Hsu F.F., Turk J., Studies on phosphatidylserine by tandem quadrupole and multiple stage quadrupole ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization: Structural characterization and the fragmentation processes. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 1510–1522.
- Hu C., van der Heijden R., Wang M., van der Geef J., Hankemeier T., Xu G., Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 2836–2846.
- Huster D., Arnold K., Gawrish K., Influence of docosahexaenoic acid and cholesterol in phospholipid mixtures. *Biochemistry* 37 (1998) 17299–17308.
- Imbert L., Ramos R.G., Libong D., Abreu S., Loiseau P.M., Chaminade P., Identification of phospholipid species affected by miltefosine action in *Leishmania donovani* cultures using LC-ELSD, LC-ESI/MS, and multivariate data analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1169–1182.
- Innis S.M., Fatty acids and early human development. *Early Hum. Dev.* 83 (2007) 761–766.
- Kiebish M.A., Han X., Cheng H., Chuang J.H., Seyfried T.N., Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *J. Lipid Res.* 49 (2008) 2545–2556.
- Kyritsis A.P., Tsokos M., Triche T.J., Chader G.J., Retinoblastoma – origin from a primitive neuroectodermal cell? *Nature* 307 (1984) 471–473
- Kyritsis A.P., Tsokos M., Triche T.J., Chader G.J., Retinoblastoma: a primitive tumor with multipotential characteristics. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27 (1986) 1760–1764.
- Laville I., Pigaglio S., Blais J.C., Doz F., Looock B., Maillard Ph., Grierson D.S., Blais J., Photodynamic efficiency of diethylene glycol-linked glycoconjugated porphyrins in human retinoblastoma cells. *J. Med. Chem.* 49 (2006) 2558–2567.
- Leaf A., Cosbell A., McKenzie L., Sinclair A., Favilla I., Long chain polyunsaturated fatty acids and visual function in preterm infants. *Early Hum. Dev.* 45(1996) 35–53.
- Leventis P.A., Grinstein S., The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annu. Rev. Biophys.* 39(2010) 407–427.
- Li A.R., Lane W.S., Johnson L.V., Chader G.J., Tomantink J., Neuron-Specific Enolase : a neuronal survival factor in the retinal extracellular matrix? *J. Neurosci.* 15 (1995) 385–393.
- Li M., Yang L., Bai Y., Liu H., Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications. *Anal. Chem.* 86 (2014) 161–175.
- Liu A., Chang J., Lin Y., Shen Z., Bernstein P.S., Long-chain and very long-chain polyunsaturated fatty acids in ocular aging and age-related macular degeneration. *J. Lipid Res.* 51 (2010) 3217–3229.

- Makarov A., Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Anal.Chem.* 72 (2000) 1156–1162.
- 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 membranes of retinoblastoma cells. *Langmuir* 26 (2010) 11145–11156.
- 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 (2011) 656-666.
- Makky A., Daghdjian K., Michel J.P., Maillard Ph., Rosilio V., Assessment of the relevance of supported planar bilayers for modeling specific interactions between glycoconjugated porphyrins and retinoblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 2831-2838.
- Mannermaa E., Reinisalo M., Ranta V-P., Vellonen K-S., Kokki H., Saarikko A., Kaarniranta K., Urtti A., Filter-cultured ARPE-19 as outer blood-retinal barrier model. *Eur. J. Pharm. Sci.* 40 (2010) 289-296.
- Mannermaa E., Vellonen K.S., Urtti A., Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: Emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1136-1163.
- Martinez M., Tissues levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J. Pediatr.* 120 (1992) S129-138.
- Milne S., Ivanova P., Forrester J., Alex Brown H., Lipidomics: An analysis of cellular lipids by ESI-MS. *Methods* 39 (2006) 92-103.
- Minones Jr.J., Conde O., Dynarowicz-Latka P., Casas M., Penetration of amphotericin B into DOPC monolayer containing sterols of cellular membranes. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 270-271 (2005) 129-137.
- Mukherjee P.K., Marcheselli V.L., Serhan C.N., Bazan N.G., Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 101 (2004) 8491-8496.
- Murate M., Abe M., Kasahara K., Iwabuchi K., Umeda M., Kobayashi T., Transbilayer distribution of lipids at nano scale. *J. Cell Sci.* 128 (2015) 1627–1638.
- Murate M., Kobayashi T., Revisiting transbilayer distribution of lipids in the plasma membrane. *Chem. Phys. Lipids* S0009-3084 (2015) 30040-30042.
- Pomorski T., Hrafnisdóttir S., Devaux P.F., Van Meer G., Lipid distribution and transport across cellular membranes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12 (2001) 139–148.

- Porn M.I., Ares M.P., Slotte J.P., Degradation of plasma membrane phosphatidylcholine appears not to affect the cellular cholesterol distribution. *J.Lipid Res.* 34(1993)1385–1392.
- Pulfer M., Murphy R.C., Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom. Rev.* 22 (2003) 332–64.
- Ramos R.G., Libong D., Rakotomanga M., Gaudin K., Loiseau P.M., Chaminade P., Comparison between charged aerosol detection and light scattering detection for the analysis of *Leishmania* membrane phospholipids. *J. Chromatogr. A.* 1209 (2008) 88–94.
- Reid T.W., Albert D.M., Rabson A.S., Russel P., Craft J., Chu E.W., Tralka T.S., Wilcox J.L., Characteristics of an established cell line of retinoblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 53 (1974) 347-360.
- Rezanka T., Sigler K., Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms. *Prog. Lipid Res.* 48 (2009), 206–38.
- Rolim A.E., Henrique-Araújo R., Ferraz E.G., De Araújo Alves Dultra F.K., Fernandez L. G., Lipidomics in the study of lipid metabolism: Current perspectives in the omic sciences. *Gene*, 554 (2014) 131–139.
- Rotstein N.P., Miranda G.E., Abrahan C.E., German O.L. Regulating survival and development in the retina: key roles for simple sphingolipids. *J. Lipid Res.* 51 (2010) 1247-1262.
- Rosenkranz A.A., Jans D.D., Sobolev A.S., Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunol. Cell Biol.* 78 (2000) 452-464.
- Sandra K., Sandra P., Lipidomics from an analytical perspective. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17 (2013) 847–853.
- SanGiovanni J.P., Chew E.Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina *Prog. Retin Eye Res.* 24 (2005) 87-138.
- Santos C.R., Schulze A., Lipid metabolism in cancer cachexia. *FEBS J.* 279 (2012) 2610–2623.
- Schindler H., Introduction to Biological Membranes. *Trends Neurosci.* 3 (1980) 226-248.
- Shayman J.A., Sphingolipids. *Kidney Int.* 58 (2000) 11–26.
- Singer S.J., Nicolson G.L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175 (1972) 720–731.
- Srimany A., Balasubramanyam J., Krishnakumar S., Elchuri S., Pradeep T., Identification of effective substrates for the direct analysis of lipids from cell lines using desorption electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29 (2015) 1-8.

- Spector A.A., Yorek M.A., Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.* 26 (1985) 1015-1035.
- Spector A.A., Burns C.P., Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res.* 47 (1987) 4529-4537
- Spener F., Lagarde M., Geloën A., Record M., What is lipidomics? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105(2003) 481–482.
- Strauss O., The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* 85 (2005) 845-881.
- Teixo R., Laranjo M., Abrantes A.M., Brites G., Serra A., Proença R., Bothelho M.F., Retinoblastoma: might photodynamic therapy be an option? *Cancer Metastasis Rev.* 34 (2015) 563-573.
- Tombran-Tink J., Johnson L.V., Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30 (1989) 1700-1706.
- Treen M., Uauy R.D., Jameson D.M., Thomas V.L., Hoffman D.R. Effect of docosahexaenoic acid on membrane fluidity and function of intact cultured Y79 retinoblastoma cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 294 (1992) 564-570.
- Van Meer G., De Kroon A.I., Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* 124 (2011) 5-8.
- Van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W., Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(2008) 112–124.
- Vigh L., Escriba P.V., Sonnleitner A., Sonnleitner M., Piotto S., Maresca B., Horvath I., Harwood J.L., The significance of lipid composition for membrane activity: New concepts and ways of assessing function. *Progr. Lipid Res.* 44 (2005) 303-344.
- Wenk M.R., Lipidomics: new tools and applications. *Cell* 143 (2010) 888–895.
- Wenk M.R., The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 594-610.
- Wieckowski M.R., Giorgi C., Lebiedzinska M., Duszynski J., Pinton P., Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat. Protoc.* 4 (2009) 1582–1590.
- Wolf C., Quinn P.J., Lipidomics: Practical aspects and applications. *Prog. Lipid Res.* 47 (2008) 15-36.
- Yorek M.A., Figard P.H., Kaduce T.L., Spector A.A., Comparison of lipid metabolism in two human retinoblastoma cell lines. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26 (1985) 1148-1154.
- Zemski Berry K.A., Gordon W.C., Murphy R.C., Bazan N.G., Spatial organization of lipids in the human retina and optic nerve by MALDI imaging mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 55 (2014) 504–415.

CHAPITRE 3 : ANALYSE DE L'INTERACTION LIPIDES-PORPHYRINES ET CELLULES- PORPHYRINES PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

Nous avons proposé dans le chapitre précédent, des modèles lipidiques biomimétiques conçus à partir des données d'analyses du lipidome des cellules de rétinoblastome. Nous avons initié l'étude de l'interaction de l'un de ces modèles avec une porphyrine (TPP) d'intérêt en monocouches. Dans ce chapitre, nous allons approfondir notre étude sur l'interaction modèle membranaire-porphyrines en utilisant, cette fois-ci, un système de bicouches. Pour ceci, nous avons analysé par spectroscopie infrarouge et, pour certains échantillons, par analyse calorimétrique différentielle, l'interaction de plusieurs porphyrines d'intérêt avec un phospholipide unique et un mélange de phospholipides-cholestérol. La DSC a été choisie afin de caractériser son comportement thermodynamique et de détecter la présence ou l'absence d'une désorganisation de la bicouche par l'introduction d'une porphyrine. La spectroscopie vibrationnelle infrarouge (IR) a été choisie pour sa capacité à détecter les modifications chimiques et les changements moléculaires. Cette technique a été largement décrite pour l'étude de la structure de la bicouche lipidique, son organisation, sa transition de phase ou son interaction avec des substances chimiques (Schultz & Levin, 2011), (Lewis & Mcelhaney, 2007). Par ailleurs, la spectroscopie vibrationnelle (infrarouge ou Raman) est un outil puissant pour l'analyse des cellules et des tissus. Grâce à la signature vibrationnelle de chaque composant de la cellule, comme par exemple les protéines, les lipides, les acides nucléiques, ou les carbohydrates, la spectroscopie infrarouge permet de détecter des différences à l'échelle supramoléculaire. Comme elle est non-invasive, elle trouve un très large spectre d'applications comme outil analytique qualitatif et quantitatif. A titre d'exemple, elle est utilisée comme moyen de diagnostic (Old et al., 2014), de détection de certaines maladies (le cancer ou autre...) (Sahu & Mordechai, 2005), ou encore d'étude de l'effet d'une substance médicamenteuse sur la cellule (Gasper et al. 2009). C'est dans ce contexte que nous avons utilisé l'IR pour analyser l'interaction de TPPs avec des cellules de rétinoblastome.

Dans un premier temps, nous décrirons l'étude de l'interaction des porphyrines avec un phospholipide synthétique et un mélange de lipides.

Comment choisir les lipides du modèle biomimétique et les porphyrines à étudier ?

Notre choix du phospholipide s'est porté sur la 1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-PC (SOPC 18:0-18:1). Selon les résultats de l'analyse lipidomique, la classe PC est majoritaire, avec une abondance relative très élevée de la « 1-palmitoyl-2-oleoyl PC » (POPC 16:0-18:1). Toutefois, la température de transition de phase de la POPC se situe vers 2°C, ce qui peut poser des problèmes d'interprétation des thermogrammes de DSC des phases lamellaires, si les températures de transition sont trop proches des valeurs négatives, vers lesquelles se situent, notamment, l'endotherme de fusion de l'eau. Par ailleurs, comme l'acide gras à 18 carbones est très abondant dans toutes les classes de phospholipides considérées et que la température de transition de phase de la SOPC est aux alentours de 7°C (ce qui permet de réaliser les mesures en infrarouge à température ambiante), la SOPC semble être une bonne option. Pour les essais avec les modèles membranaires, nous avons préféré un modèle renfermant la SOPC en proportion majoritaire afin de corréliser les résultats d'un lipide simple avec ceux du modèle lipidique.

Comme il n'était pas possible de réaliser ces études avec les 26 porphyrines, 4 porphyrines ont été sélectionnées. Puis, pour les analyses avec les modèles lipidiques, nous avons retenu seulement les deux porphyrines les plus intéressantes.

Nous avons utilisé deux méthodes principales d'analyse : la DSC et la spectroscopie infrarouge. Les mesures de DSC ont été réalisées dans l'UMR CNRS 8612, avec la collaboration du Dr Vincent Faivre (Equipe de physico-chimie des systèmes polyphasés), la spectroscopie infrarouge-ATR dans l'unité Lip(Sys)², avec la collaboration du Dr Ali Tfayli et la Microspectroscopie IR couplée au rayonnement Synchrotron avec la collaboration des Dr Christophe Sandt et du Dr Paul Dumas (ligne SMIS, SOLEIL) du Professeur Arlette Baillet et du Dr Ali Tfayli (Lip(Sys)²).

En collaboration avec les Dr Florent Poyer, Mihaela Lupu, Carole Thomas et Philippe Maillard de l'équipe « Chimie, modélisation et imagerie pour la biologie » (UMR 9187/U 1196) de l'Institut Curie et l'équipe de la ligne SMIS, nous avons étudié de manière approfondie l'interaction des porphyrines avec des cellules. Trois lignées cellulaires ont été choisies : deux lignées de rétinoblastome (Y79 et WERI-Rb1) et la lignée épithéliale saine ARPE-19. Concernant les porphyrines, nous avons voulu mettre en évidence le rôle des groupements mannoses greffés aux espaceurs des porphyrines. Nous avons donc sélectionné

TPP(*p*DEG-Man)₃ et TPP(*p*DEG-OH)₃, une molécule de même structure chimique que TPP(*p*DEG-Man)₃, mais dont les mannoses ont été remplacés par des hydroxyles.

Les expériences peuvent être résumées comme suit :

Etape 1 :

- Phospholipide seul : SOPC + TPP[*p-dendr*(DEG-Man)₃ ou TPP(*p*DEG-Man)₃ ou TPP*m*OH₄ ou TPP(*m*GluOH)₄
- Modèles lipidiques : (SOPC/SOPE/SOPS/Chol/CL) ou (SOPC/SOPE/SOPS/Chol) + TPP(*p*DEG-Man)₃ ou TPP*m*OH₄

Etape 2 :

- Cellules : Y79 ou WERI-Rb1 ou ARPE-19 + TPP(*p*DEG-Man)₃ ou TPP(*p*DEG-OH)₃

La structure chimique des porphyrines utilisées dans ce chapitre est présentée dans l'annexe tableau A3.01.

Avant de présenter les techniques utilisées en terme de principes de fonctionnement et d'instrumentation, je vais aborder l'état physique de la bicouche lipidique.

1. Thermodynamique de la bicouche lipidique

L'état physique des phospholipides dans une bicouche change en fonction de la température. En effet, lorsque la température atteint la température de transition de phase (ou fusion des chaînes, T_m) caractéristique d'un phospholipide pur, des changements de l'organisation et de la mobilité de ces chaînes dans la bicouche est observé. En-dessous de la T_m , la bicouche est à l'état dit « de gel » (L_β): les chaînes aliphatiques ont une conformation *anti* et sont parallèles, ordonnées et plus ou moins immobilisées. Au-dessus de la température de transition, la bicouche passe à un état fluide (ou liquide-cristallin L_α) caractérisé par une certaine mobilité (suite à l'absorption d'énergie) et des chaînes en conformation *gauche*. Le phénomène de transition de phase est réversible. Il est le résultat d'une rotation d'une chaîne aliphatique au niveau de la liaison C-C. Cette rotation induit un « rapprochement » entre le groupe méthyle terminal de cette chaîne et les chaînes aliphatiques des molécules adjacentes qui sont alors

elles-aussi impliquées. La transition est un phénomène coopératif (Nagle, 1980). Pour une même tête polaire, la T_m est corrélée au nombre des carbones de la chaîne aliphatique et inversement corrélée au nombre des insaturations des chaînes d'acides gras (Casal & Mantsch, 1984). Le phénomène de transition de phase des lipides est couramment mis en évidence par des mesures de calorimétrie différentielle, mais son utilisation est limitée à un certain nombre de lipides polyinsaturés (plus le nombre d'insaturations est élevé, plus la T_m est proche de 0°C).

2. Technique d'analyse thermique : La calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La DSC est une technique largement utilisée pour la caractérisation des propriétés thermodynamiques des matériaux.

2.1. Principe

La DSC mesure la quantité d'énergie absorbée ou libérée par un échantillon quand il est chauffé ou refroidi à vitesse constante. La variation de la température induit des transitions de phases et des réactions chimiques. Elle permet ainsi de détecter les processus exothermiques (cristallisation) ou endothermiques (fusion) subis par un échantillon ainsi que les changements de chaleur spécifique, comme la transition vitreuse des polymères.

Ces transformations thermodynamiques sont quantifiables directement sur les thermogrammes enregistrés. Par exemple, une fusion est traduite par un pic dont la surface est proportionnelle à l'enthalpie (ΔH) de fusion. On peut également visualiser un décrochement signifiant un changement brusque de la capacité calorifique.

2.2. Instrumentation DSC

L'enregistrement des thermogrammes a été effectué à l'aide d'un calorimètre à compensation de puissance DIAMOND équipé d'un contrôleur d'analyse thermique Pyris (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). Il est constitué de deux cellules, une cellule de référence (dans laquelle nous plaçons une capsule en aluminium vide) et une cellule de mesure renfermant l'échantillon. Le dispositif est conçu pour maintenir les deux cellules à la même température, pendant que celles-ci sont chauffées à vitesse constante.

3. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie vibrationnelle est une méthode analytique très utile pour l'analyse des matériaux et des produits chimiques ; elle se base sur l'interaction entre une onde électromagnétique excitatrice et les vibrations des molécules.

Un faisceau de lumière possède une fréquence ν_0 . L'énergie E_0 de la radiation incidente est définie par la relation suivante : $E_0 = h \nu_0 = h \frac{c}{\lambda_0}$

avec h : constante de Planck ($6,63 \cdot 10^{-34}$ J.s),

ν_0 : fréquence de la radiation incidente,

c : vitesse de la lumière dans le vide ($3 \cdot 10^8$ km.s⁻¹) et

λ_0 : longueur d'onde de la radiation incidente.

Les photons incidents sont soit absorbés (absorption infrarouge) ou diffusés (effet Raman)

Les modes de vibrations des atomes des molécules peuvent être distingués en :

- Des vibrations d'élongation ou de valence (ν): ce sont les vibrations au cours desquelles la distance entre deux atomes varie selon l'axe de liaison.
- Des vibrations de déformation angulaire (δ): des vibrations au cours desquelles l'angle varie (dans un même plan ou pas).

La figure 3.01 présente un exemple des vibrations symétriques et asymétriques au niveau du groupement CH₂.

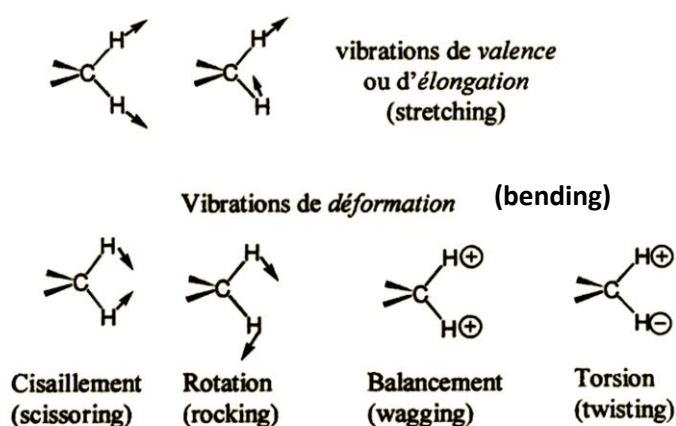


Figure 3.01 : Modes des vibrations du groupement CH₂

Lorsqu'une radiation infrarouge traverse un échantillon, une fraction de la radiation incidente est absorbée à une énergie bien particulière. Cette absorption permet d'avoir un spectre infrarouge. L'énergie dans laquelle une bande apparaît dans le spectre correspond à la fréquence de la vibration d'une partie de l'échantillon.

La spectroscopie IR exploite le domaine infrarouge du spectre électromagnétique qui se situe entre le domaine du visible et celui des micro-ondes (figure 3.02). Le spectre infrarouge pourrait être divisé en trois régions : l'infrarouge lointain ($<400\text{ cm}^{-1}$), le moyen-infrarouge ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) et le proche-infrarouge ($13\,000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$).

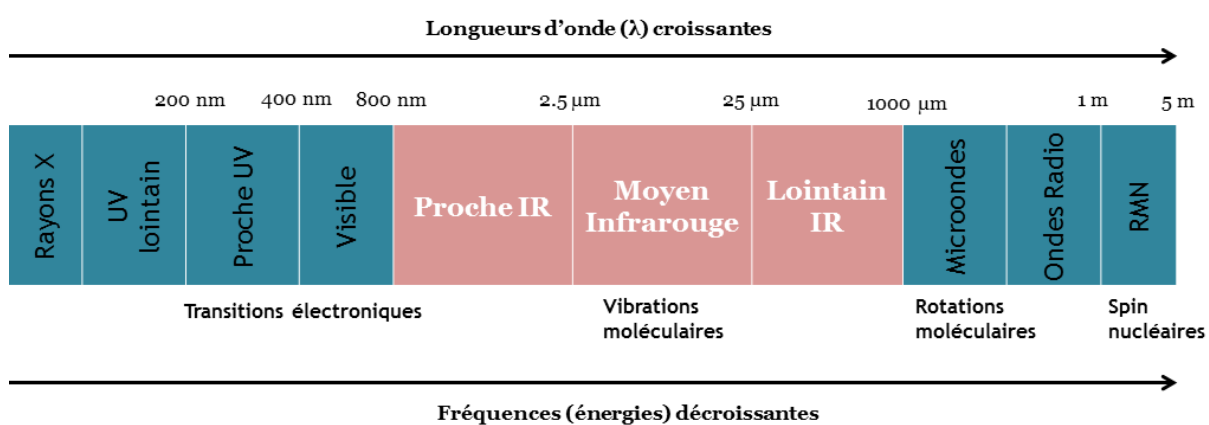


Figure 3.02 : Domaine infrarouge dans le champ électromagnétique

Le spectre infrarouge est caractéristique pour chaque molécule (sauf les énantiomères pour lesquels le même spectre pourrait être obtenu). En effet, chaque molécule se distingue d'une autre par une « empreinte » qui est son absorption entre $600\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ contenant les vibrations les plus complexes. Quant à la région de $1600\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, elle renferme les vibrations les plus communes (groupements fonctionnels).

L'un des avantages de cette technique est qu'il est possible d'analyser tout type d'échantillons : liquide, solide, gaz, poudre...

3.1. Principe de l'absorption infrarouge

Si nous considérons une molécule à deux atomes A-B ayant des électronégativités différentes, la molécule est un dipôle et des charges $-\delta$ et $+\delta$ peuvent être attribuées à chacun des atomes. Le dipôle est caractérisé par une grandeur appelée moment dipolaire. Ce dernier dépend des

distances entre les charges et leurs valeurs absolues. Si le moment dipolaire ne varie pas au moment de la vibration (c'est-à-dire il n'interagit pas avec le champ électrique incident du rayonnement IR), la molécule n'absorbe pas dans l'IR et la bande serait inactive. Ceci explique pourquoi un spectre IR ne peut pas être obtenu pour une molécule diatomique symétrique. L'IR est très sensible au changement de moment dipolaire.

3.2. Types des spectromètres infrarouge

On distingue principalement deux types de spectromètres infrarouge : les spectromètres dispersifs et les spectromètres à transformée de Fourier. La différence majeure entre les deux est au niveau de la présence ou l'absence du système sélectionneur de la longueur d'onde.

L'appareil de type dispersif sépare des fréquences de l'énergie émise à partir de la source à l'aide d'un système dispersif (type prisme par exemple) ; L'inconvénient majeur de ce type de spectromètre est la lenteur relative de l'acquisition des données.

Quant aux spectromètres à transformée de Fourier qui sont non dispersifs, ils sont dotés d'un dispositif, l'interféromètre, permettant d'analyser toute les fréquences simultanément.

3.3. Modes de mesures infrarouge

Il existe plusieurs manières avec lesquelles la technique infrarouge pourrait être implémentée. Ceci varie selon la surface de l'échantillon.

On distingue principalement deux modes de fonctionnement : en transmission ou réflexion (interne dont réflexion totale atténuée (ATR), diffuse et spéculaire, figure 3.03).

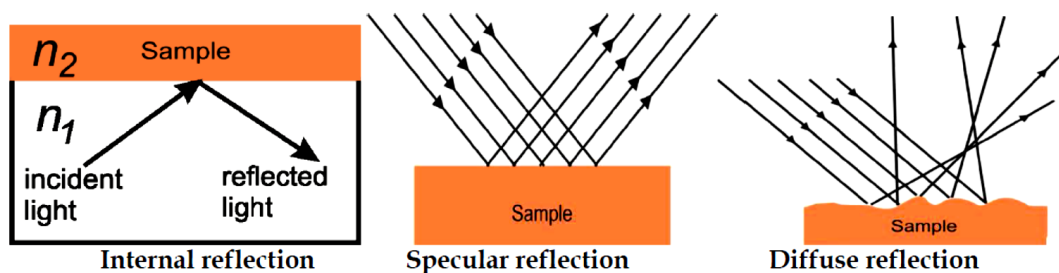


Figure 3.03 : Modes de réflexion de la lumière dans les appareils IR

- La réflexion spéculaire (la moins utilisée): la lumière est réfléchi sur la surface plane de l'échantillon dans une direction d'observation symétrique à celle d'incidence.

- La réflexion diffuse : la radiation IR est dirigée vers l'échantillon qui est sous forme de poudre (exp KBr). Le faisceau pénètre alors à travers les particules et diffuse. Un miroir est placé pour collecter le faisceau diffusé vers un détecteur.
- La réflexion totale atténuée (ATR): la lumière passe d'un matériau d'indice de réfraction élevé vers un milieu moins réfracté (l'échantillon) et pénètre faiblement dans l'échantillon. Quand l'angle d'incidence est supérieur à un angle critique, la réflexion de la lumière incidente est totale.
- Mode de transmission : la lumière passe à travers l'échantillon donc l'épaisseur doit être $\sim 10\mu\text{m}$ afin de maintenir un débit constant de la lumière à travers l'échantillon.

3.4. Instrumentation FT-IR ATR

Dans ce projet, les analyses ont été réalisées avec un FT-IR ATR Spectrum two de PerkinElmer (Waltham, Massachusetts) (figure 3.04).

L'ATR est une technique d'analyse très utilisée dans les spectromètres FT-IR. Elle nécessite la mise en contact de l'échantillon avec un élément interne de réflexion ayant un indice de réfraction élevé et des propriétés de transmission excellentes. Des cristaux de type Ge, ZnSe et le diamant ont des indices de réfractifs n_1 élevés. Le cristal utilisé dans le présent projet est le diamant. Son indice de réfraction varie entre 2,40 et 2,45 selon la longueur d'onde. L'angle d'incidence entre le faisceau et la surface du diamant est de 45° .

L'instrument est doté d'une source lumineuse, l'interféromètre (dispositif permettant de générer les interférences), un compartiment échantillon, un détecteur photosensible et un système de traitement du signal.

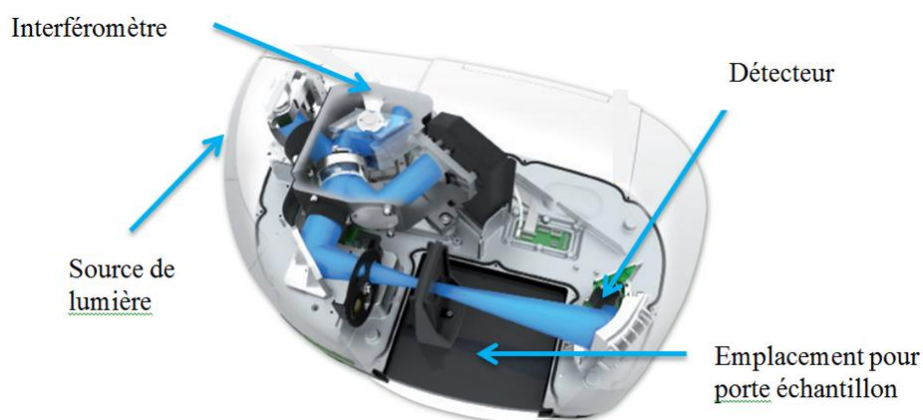


Figure 3.04 : schéma illustrant l'appareil infrarouge de type FT-IR ATR Spectrum Two de Perkin Elmer

3.5. Microspectroscopie FTIR couplée au rayonnement Synchrotron

Le choix de cette technique est justifié par la haute brillance du rayonnement synchrotron (nombre de photon/s = 10^{20}) et la possibilité de modifier les ouvertures ce qui permet d'atteindre une résolution spatiale très élevée tout en ayant une bonne qualité du spectre.

Au synchrotron SOLEIL, au niveau de la ligne SMIS, le rayonnement synchrotron arrive sur un spectromètre Thermo Fischer NEXUS FT-IR Nicolet 5700 équipé d'un microscope CONTINUUM XL (Thermo Scientist, CA). Le rayonnement traverse l'échantillon puis passe par un condensateur avant d'arriver à un détecteur monocanal de type MCT-A de 50 μ m refroidi à l'azote liquide. L'objectif utilisé est de type Schwarzschild x32. Nous avons utilisé le mode transmission pour l'acquisition sur un domaine de 900 à 4000 cm^{-1} . L'échantillon est posé sur une table motorisée XY contrôlée par ordinateur avec le logiciel OMNIC (figure 3.05).



Figure 3.05 : l'équipement de la ligne SMIS

Les cellules à analyser ont été préparées sur des lames CaF_2 et les solutions lipidiques ont été déposées sur des lames ZnS dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau A3.02 des annexes.

4. Préparation des échantillons

4.1. Lipides-TPP

Dans un premier temps quatre porphyrines synthétisées par l'équipe de Dr. Ph. Maillard ont été testées. Il s'agit de TPP mOH_4 , TPP($pDEGMan$) $_3$, TPP($mGluOH$) $_4$ et TPP[p - $dendr$ ($DEGMan$) $_3$]. Les dispersions lipidiques multilamellaires ont été préparées comme suit : 10 mg de SOPC et la quantité de porphyrine adéquate pour obtenir un rapport molaire TPP/SOPC= 1/50, ont été dissous dans un mélange chloroforme/méthanol (9 :1 v/v). La solution obtenue est ensuite évaporée sous flux d'azote et lyophilisée pendant 24h. Le film ainsi obtenu est ensuite réhydraté avec de l'eau (SOPC/eau : 10/90 w/w). Des étapes supplémentaires d'agitation par vortex et de sonication ont été nécessaires pour décoller les films.

Par ailleurs, pour les dérivés TPP mOH_4 et TPP($pDEGMan$) $_3$, les mélanges TPP/SOPC ont été préparés à des ratios molaires 1/50 , 1/25 et 1/10, en utilisant le même protocole que précédemment. Nous avons observé que plus la concentration de la porphyrine augmente plus il devient difficile de décoller le film ; nous avons également remarqué que cette opération est plus difficile pour des films contenant la TPP($pDEGMan$) $_3$ que pour les films avec la TPP mOH_4 . Il est à noter que c'est pour cette raison que des préparations à des rapports molaires 1/5 n'ont pas pu être obtenues.

Tous les échantillons TPP-SOPC préparés aux ratios 1/50, 1/25 et 1/10 ont été analysés par DSC et FTIR-ATR. En FTIR, la cinétique de l'évaporation de l'eau a été enregistrée de 0 à 60 min avec une résolution de 1 cm^{-1} .

Deux modèles lipidiques ont été choisis SOPC/SOPE/SOPS/Chol (56 :23 :11 :10) et SOPC/SOPE/SOPS/Chol/CL (42 :32 :9 :8 :6). Ils ont été étudiés en présence de deux porphyrines, la TPP mOH_4 , et la TPP($pDEGMan$) $_3$ à un rapport molaire 10:1. Les phases lamellaires mixtes ont été préparées selon le protocole détaillé ci-dessus. Les échantillons ont ensuite été déposés sur des lames ZnS et analysés par microspectroscopie infrarouge couplée au rayonnement synchrotron (SOLEIL, ligne SMIS).

4.2. Cellules-TPP

Les lignées cellulaires Y79 (ATCC[®] HTB-18[™]) et WERI-Rb-1 (ATCC[®] HTB-169[™]) sont cultivées en suspension dans du RPMI 1640 (Invitrogen, Saint Aubin, France), supplémenté de 20 % sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen) et de 1% de pénicilline/streptomycine (Invitrogen). La lignée cellulaire adhérente ARPE-19 (ATCC[®] CRL-2302[™]) est cultivée

dans du DMEM:F12 (Invitrogen), avec 10% de SVF et 1% de pénicilline/streptomycine ; les cellules sont passées 2 à 3 fois par semaine en utilisant de la trypsine-EDTA (Invitrogen). Pour les lignées non adhérentes, les lames de CaF₂ (5mm x 0,5mm, Crystran, Poole, Royaume-Uni) ont été recouvertes par de la poly-L-lysine (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) pour permettre l'adhésion des cellules. Les lames de CaF₂ sont placées dans des puits de culture de plaque 6 puits et 200 000 cellules sontensemencées sur chaque lame. Trois lames pour chaque lignée cellulaire sont préparées : non traitée (contrôle), traitée à la TPP(*p*DEGMan)₃ et traitée à la TPP(*p*DEG-OH)₃. Les porphyrines sont préparées à partir d'une solution à 1 mM dans le DMSO pour une concentration finale dans le milieu de culture de 5µM (0,5 % DMSO, ce qui correspond à la dose maximale tolérée). Les cellules sont incubées avec la porphyrine pendant 24 h à 37°C. Les cellules sont ensuite fixées avec 4% de paraformaldéhyde (Sigma) et les lames sont conservées dans un dessiccateur à température ambiante.

5. Conditions expérimentales des mesures

DSC : 15 mg de la suspension TPP/SOPC ont été déposés dans la capsule qui est ensuite scellée hermétiquement. Nous avons procédé au début à un refroidissement de l'échantillon de +20°C à -10°C. Ensuite, l'échantillon est chauffé de -10°C à +30°C pour être refroidi encore une fois de +30°C à -10°C et chauffé une seconde fois de -10°C à 20°C. Ces deux cycles se font à une vitesse constante de 2,00°C/min pour tous les échantillons analysés. Après correction de la ligne de base, les thermogrammes obtenus ont été normalisés par rapport à la masse du SOPC, afin de pouvoir comparer les aires des pics et l'enthalpie.

FTIR ATR : Après l'enregistrement d'un spectre de référence (background), 5µL de la suspension aqueuse sont déposés sur le porte-échantillon du spectromètre IR (au niveau du cristal diamant précisément). Les échantillons, qui ont un taux d'humidité de 90%, sont maintenus sous un flux d'air comprimé afin d'accélérer l'évaporation du solvant. Les spectres sont enregistrés au bout de 30 min et 60 min sur tout le domaine spectral, de 400 cm⁻¹ à 4000 cm⁻¹ avec une résolution de 2 cm⁻¹. L'enregistrement est réalisé grâce au logiciel Spectrum de PerkinElmer (v 10.4) et chaque spectre est la moyenne de 16 balayages. Pour certains échantillons (SOPC + TPP*m*OH₄ ou TPP(*p*DEGMan)₃), une acquisition est réalisée en continu durant 1h au cours de laquelle l'eau est évaporée à température ambiante. Les spectres

sont alors enregistrés à une résolution de 1cm^{-1} à l'aide du logiciel TimeBase de PerkinElmer (v 3.1.2).

Microspectroscopie Infrarouge couplée au rayonnement Synchrotron : Les spectres enregistrés ont une résolution spectrale de 4cm^{-1} et une résolution spatiale de $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$. L'acquisition de chaque spectre est réalisée sur tout le domaine spectral de 900 à 4000cm^{-1} en moyennant 125 balayages. Un spectre par cellule a été enregistré.

6. Méthodologie d'analyse des spectres

6.1. Pré-traitements

Le pré-traitement du signal spectral permet l'obtention de spectres optimisés qui aideront à l'analyse multivariée.

Trois logiciels ont été utilisés pour l'acquisition des données, les pré-traitements des spectres et les traitements des données par les outils chimiométriques, à savoir :

- Spectrum™ de PerkinElmer (v 10.4) : pour les spectres enregistrés en ATR-FTIR.
- Unscrambler® X de Camo (v 10.3) et OMNIC™ de ThermoScientific (v 9.2.41) : pour les données acquises au Synchrotron.

Dans les paragraphes qui suivent, on indiquera l'apport de chaque logiciel dans les différentes étapes de cette étude.

6.1.1. Elimination des spectres aberrants

Etant donné le nombre important des spectres acquis (entre 50 et 100 spectres par échantillon), j'ai opté pour la stratégie d'élimination des spectres aberrants suite à une ACP sur les données brutes. Les spectres aberrants ont été identifiés et éliminés en utilisant la méthode de l'ellipse de confiance Hotelling T2 et le graphe *residuals vs leverage* de Unscrambler. Ceci a permis de ne conserver que les spectres qui expliquent le mieux la variance.

6.1.2. Lissage

Le lissage est un prétraitement qui sert à éliminer le bruit, c'est-à-dire la composante aléatoire dans le signal. Ceci permet d'augmenter le rapport signal/bruit. Unscrambler® offre un lissage selon 4 algorithmes différents. Celui qui a été utilisé est la méthode de moyenne mobile enregistrée sur une moyenne de 3 points du spectre. Pour le lissage réalisé avec Spectrum, un coefficient de 20 a été utilisé.

6.1.3. Correction de la ligne de base

La correction de la ligne de base peut être linéaire ou polynomiale. Dans ce projet, la correction de la ligne de base réalisée est manuelle, interactive et par spectre. Le nombre de points de correction de la ligne de base est fixé selon le cas.

6.1.4. Normalisation

La normalisation peut s'effectuer selon la méthode min-max. En effet, en mode absorption, il s'agit de mettre en échelle le spectre de telle sorte que la valeur minimale est ramenée à 0 et la maximale à 1, cette méthode a été utilisé pour une normalisation des spectres de SOPC au niveau de la bande d'élongation C=O, présentant le moins de variabilité.

Une autre méthode a été aussi appliquée pour le traitement des données des modèles lipidiques après calcul de la dérivée seconde : c'est la normalisation vectorielle Wartewig, S. (2003). Dans un premier temps, la moyenne des spectres est calculée, celle-ci est ensuite soustraite de chaque spectre; ce qui revient à centrer chaque spectre y_k au niveau 0.

$$y_m = \frac{\sum_k y_k}{N} \quad \hat{y}_k = y_k - y_m \quad \text{Avec } N = \text{nombre des spectres}$$

Ensuite, la somme des carrés de tous les spectres résultant de la soustraction est calculée. Chaque spectre centré est ensuite divisé par la racine carrée de cette somme.

$$Y_k = \frac{\hat{y}_k}{\sqrt{\sum_k (\hat{y}_k)^2}}$$

Ceci revient à avoir la somme des écart-types = 1. $\sum_k (Y_k)^2 = 1$

La dernière méthode utilisée ici est la « Range normalization » et elle est appliquée aux données cellulaires. Pour chaque ligne de la matrice (chaque spectre), chaque point est divisé par son étendu, autrement dit la différence entre la valeur maximale et la valeur minimale de chaque spectre.

6.1.5. La diffusion de Mie (Mie scattering)

Lors de l'analyse des échantillons biologiques (cellules et tissus) par microscopie infrarouge, il faut faire face généralement à des distorsions de la ligne de base due à des effets de diffusion (scattering effects). Ces effets peuvent aussi influencer l'aspect et la position des bandes. En effet, ils se manifestent principalement par la diminution de la bande amide I accompagnée d'une distorsion remarquable au niveau de la ligne de base. Il est nécessaire lors de pré-traiter les spectres afin de vérifier la présence de tels effets et de les éliminer. Certains algorithmes ont été développés pour cet objectif.

Récemment, et grâce à une nouvelle extension (« package »), il devient possible de réaliser la correction Mie avec le logiciel Unscrambler®. L'algorithme utilisé a été publié par Kohler et al. (2008). Il a été conçu pour les données synchrotron en particulier. Cette extension fournit les spectres de contribution de Mie qui serviront une entrée de données pour la correction EMSC (Extended Multiplicative Signal Correction). La visualisation des résultats se fait grâce au graphe « scatter effect ». Un exemple est illustré dans l'annexe figure A.3.01.

6.1.6. Extended Multiplicative Signal Correction (EMSC)

Un des défis majeurs du pré-traitement des spectres enregistrés par rayonnement synchrotron est de pouvoir séparer l'effet physique de la lumière (la diffusion) de l'effet chimique vibrationnel réel (l'absorption), d'où le recours à l'EMSC, une correction aidant à atteindre cet objectif. L'EMSC est une extension de la correction MSC (multiplicative scattering effect). En effet, elle permet de supprimer l'effet additif et multiplicatif comme la MSC, mais en plus d'éliminer les distorsions dues à des interférences physiques ou autres. La figure de l'annexe figure A.3.02 illustre quelques cas où il serait utile d'utiliser l'EMSC. Il est à noter que l'EMSC est réalisée à partir d'un spectre moyen automatiquement calculé par le logiciel.

6.1.7. Dérivées

La fonction de dérivées est souvent utilisée au premier ou second ordre. Ce pré-traitement permet de supprimer toutes les composantes (les effets non chimiques) liées à une distorsion de la ligne de base, mais elle permet aussi de mieux visualiser certaines bandes peu intenses dans le spectre original. Les résultats de la dérivée seconde sont aussi quantitatifs tout comme le spectre de base (la position, l'aire et l'intensité des « pics » peuvent toujours être exploitées). En revanche, l'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle réduit le rapport signal/bruit (Holler et al., 1989). C'est la raison pour laquelle les algorithmes appliqués tels que celui de Savitzky-Golay (le plus utilisé) permettent aussi d'appliquer un lissage en parallèle. Le nombre minimum du lissage dépend de l'ordre de la dérivée et le maximum est de 25. La dérivée seconde appliquée dans notre analyse est réalisée avec 5 points de lissage des deux extrémités et avec un polynôme d'ordre 3.

6.2. Outils chimiométriques

Les analyses multivariées sont essentielles pour l'exploitation de données d'une centaine d'échantillons renfermant plus de 1500 variables comme c'est le cas des spectres FTIR enregistrés au synchrotron.

6.2.1. Analyse en composantes principales (ACP)

L'ACP est une méthode d'analyse multivariée descriptive et non supervisée où aucune hypothèse n'est émise concernant une éventuelle relation entre les individus et les variables. Elle consiste à réduire la dimension des données initiales en les remplaçant par d'autres variables de variance maximale, non corrélées deux à deux et qui résument le mieux l'information contenue dans les données. Ces nouvelles variables, sont appelées des composantes principales (PC). Elles définissent des plans factoriels qui servent de base à une représentation graphique plane des variables initiales (suite à plusieurs projections orthogonales linéaires sur le plan). L'interprétation des résultats se restreint généralement aux deux premiers plans factoriels, sous réserve que ceux-ci expliquent la majeure partie de la variance du nuage des variables initiales.

L'ACP permet de répondre aux deux objectifs fondamentaux de l'interprétation à savoir :

- Déterminer les similarités et les différences entre les groupes/les classes ; ceci est possible par le « scores plot » équivalent aux coordonnées factorielles ;
- Identifier les bandes spectrales les plus corrélées à ces différences ou similarités ; ceci est réalisé grâce au « loading plot » équivalent aux contributions factorielles.

Avec Unscrambler®, les variables sont automatiquement centrées réduites (moyenne = 0 et variance =1) avant d'appliquer un modèle ACP.

6.2.2. Analyse discriminante par Régression en moindres carrées partielles PLS-DA (Partial Least Square Discriminant Analysis)

La PLS-DA est une méthode d'analyse multivariée supervisée. Elle consiste à capturer le maximum d'information discriminant entre des groupes. Ceci nécessite une classification préalable des données en groupes. La PLS-DA fonctionne avec deux matrices : des variables de prédiction (la matrice X) et des variables de réponse (la matrice Y). La PLS-DA est une sorte de rotation des composantes principales de l'ACP afin de trouver les variables discriminantes. Elle permet alors d'extraire les variables latentes d'une table de données qui permettent de construire un facteur pouvant être utilisé dans la prédiction d'une classe. Tout comme l'ACP, sur Unscrambler®, les données sont automatiquement centrées réduites avant la PLS-DA.

7. Attribution des bandes spectrales en infrarouge

La technique infrarouge est une méthode puissante non invasive pour l'analyse de la composition moléculaire des cellules biologiques. Elle permet aussi de détecter la transition de phases gel-liquide des lipides, les modifications de la structure secondaire des protéines ou même les changements conformationnels des acides nucléiques...

Les lipides, plus précisément les phospholipides ont été précédemment décrits dans le chapitre 2. Ces molécules présentent des signatures vibrationnelles intenses en infrarouge, surtout le groupe méthylène de la chaîne aliphatique, la liaison ester de l'interface et le groupement phosphate de la tête polaire. Les fréquences des bandes caractéristiques des lipides sont résumées dans le tableau 3.02 (a) (Thèse A. Tfayli, 2007).

Les protéines sont des constituants abondants dans la cellule. Leur « empreinte » vibrationnelle sur le spectre est donc facilement repérée. La liaison peptidique au niveau des protéines analysées en IR donne lieu à neuf bandes caractéristiques désignées par A, B, I...VII (Krimm & Bandekar, 1986). Les bandes amides I et II sont majeures dans les spectres IR : elles correspondent respectivement à l'élongation C=O et à une déformation NH. La déconvolution de la bande amide I permet d'avoir une idée de la structure secondaire de la protéine (hélices α ou feuillets β). Le tableau 3.02 (b) présente les fréquences des neuf bandes des protéines et le tableau 3.02 (c) les fréquences suivant la déconvolution des bandes amide I et II les plus fréquentes (Kong & Yu, 2007 ; thèse A.Tfayli, 2007).

Les acides nucléiques (ADN ou ARN), porteurs de l'information génétique, sont des constituants importants des noyaux des cellules eucaryotes. L'ADN est formé de deux brins, chacun étant un polymère de plusieurs nucléotides. Chaque nucléotide est constitué d'un désoxyribose, d'une base aromatique et d'un groupement phosphate. Les deux brins d'ADN sont liés par des liaisons hydrogènes. L'ADN peut se trouver sous trois formes ou structures secondaires. La différence entre ces formes dépend de leurs concentrations et de l'ionisation du milieu. La forme B est la plus fréquente ; Elle se caractérise par la présence de 10 nucléotides par tour d'hélice et une conformation bien particulière des bases qui sont perpendiculaires à l'axe de l'hélice. La deuxième forme est la forme A que l'on trouve davantage dans des conditions de déshydratation de l'ADN. L'ADN peut aussi se trouver sous une dernière forme Z beaucoup moins fréquente que les formes B et A. Par analogie aux protéines, l'ADN se trouve dans la nature dans une structure tertiaire ; Les deux brins sont condensés autour des protéines histones. Les liaisons chimiques de l'ADN ayant une signature vibrationnelle intense en infrarouge, principalement la liaison phosphodiester entre les nucléotides et la liaison carbonyle C=O des bases, sont résumées dans le tableau 3.02 (d). Leur position varie selon qu'il s'agit de la forme A ou B ce qui permet de détecter la transition entre ces deux structures (Whelan et al., 2011).

Tableau 3.01 : Attribution des bandes du spectre infrarouge des molécules chimiques lipides (a), protéines (b et c) et acides nucléiques (d).

	Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution	Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution
	a	2950-2960	ν_{as} (C-H) de CH ₃	1470-1480
2920-2930		ν_{as} (C-H) de CH ₂	1460	δ (C-H) de CH ₃
2865-2880		ν (C-H) de CH ₃	1230	ν_{as} (P=O) de PO ₂
2840-2860		ν (C-H) de CH ₂	1170-1200	ν (C-O-C) des esters
1730-1760		ν (C=O) des esters	1080	ν (P=O) de PO ₂

	Désignation	Fréquence (cm ⁻¹)	Description
b	Amide A	3300	Elongation NH
	Amide B	3100	Elongation NH
	Amide I	1600-1690	Elongation C=O, (élongation C-N)
	Amide II	1480-1575	Elongation CN, déformation NH
	Amide III	1229-1301	Elongation CN, déformation NH
	Amide IV	625-767	Déformation O=C-N
	Amide V	640-800	Déformation NH hors plan
	Amide VI	537-606	Déformation C=O hors plan
	Amide VII	200	Torsion

	Structure secondaire	Fréquence (cm ⁻¹)	
		Amide I	Amide II
c	Hélice α	1650-1652	1516-1540
	Feuillet β chaînes antiparallèles	1630-1645	1530-1550
	Feuillet β chaînes parallèles	1632-1685	1530
	Random coil	1656	1535

	Attribution	Fréquence (cm ⁻¹)	
		Forme B	Forme A
d	ν (C=O) carbonyle	1717	1712
	ν_{as} (P=O)	1238	1225
	ν (P=O)	1087	1087*
	ν C-O (de la squelette)	1051	1051*
	ν C-O (de la squelette)	970	970
	OPO diester	810-820	810-820

* Avec une baisse significative de l'intensité

8. Résultats et Discussion

*Pour une meilleure lisibilité des figures, nous désignons certaines porphyrines autrement que précédemment : **TPP Deg MAN** pour la $TPP(pDEGMan)_3$ et **TPP Dendr Man** pour la $TPP[p-dendr(DEGMan)]_3$.*

8.1. Analyse des mélanges TPP-lipides par DSC et ATR-FTIR

8.1.1. Résultats obtenus par DSC

Nous avons procédé à deux balayages successifs de la température. Les courbes des deux chauffages étaient superposées, ce qui démontre l'absence d'une évaporation de l'eau au deuxième balayage. Dans les figures, une seule courbe de chauffage est présentée à chaque fois. Pour chaque échantillon, la T_m , ainsi que l'enthalpie ΔH ont été déterminées. La température de transition de la SOPC pure se situe entre 6,9 et 7°C, ce qui est en accord avec les résultats de la littérature (Vilchère et al., 1996). L'effet de l'addition de la TPP a été étudié avec différentes porphyrines à un ratio molaire 1/50.

Rapports molaires 1/50 pour $TPPmOH_4/SOPC$, $TPP(pDEGMan)_3/SOPC$, $TPP[p-dendr(DEGMan)]_3/SOPC$ et $TPP(mGluOH)_4/SOPC$

Les résultats montrent que quelle que soit la porphyrine introduite dans le mélange, une diminution de la température de transition de phase et un élargissement du pic sont observés (Figure 3.06). Selon les résultats du tableau 3.02, il est possible de classer les porphyrines associées selon les valeurs de T_m et de ΔH :

Selon T_m : **SOPC** > $TPP(pDEGMan)_3$ > $TPP[p-dendr(DEGMan)]_3$ > $TPP(mGluOH)_4$ > $TPPmOH_4$:

Selon ΔH : $TPP[p-dendr(DEGMan)]_3$ > $TPP(mGluOH)_4$ > **SOPC** \geq $TPPmOH_4$ > $TPP(pDEGMan)_3$

Tableau 3.02: Température et enthalpie de transition pour les mélanges TPP/SOPC à un rapport molaire 1/50.

Echantillon analysé	Température de transition de phase (°C)	Enthalpie de transition (J/g de SOPC)
SOPC pure	7,0	2,8
TPP(<i>p</i> DEGMan) ₃ -SOPC 1/50	4,6	1,4
TPP <i>m</i> OH ₄ -SOPC 1/50	2,3	2,7
TPP[<i>p-dendr</i> (DEGMan) ₃ -SOPC 1/50	3,6	3,0
TPP(<i>m</i> GluOH) ₄ -SOPC 1/50	2,4	2,9

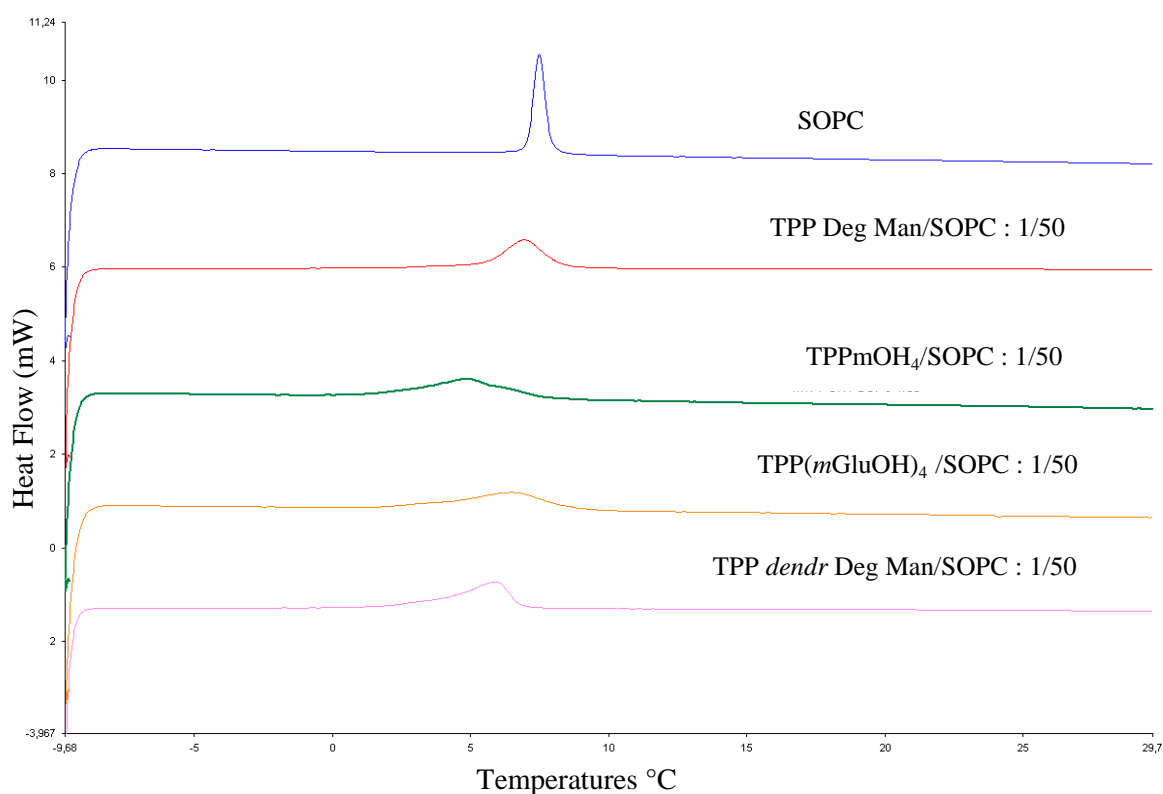


Figure 3.06: Thermogrammes obtenus pour les mélanges porphyrine/SOPC à un rapport molaire 1/50.

Nous nous sommes aussi intéressés à l'étude de l'effet de l'augmentation de la concentration de la porphyrine : pour cela, des mélanges TPP(*p*DEGMan)₃ -SOPC et TPP*m*OH₄ -SOPC à des rapports 1/10 et 1/25 ont été analysés, en plus du rapport 1/50.

Les résultats de TPPmOH₄ montrent une diminution de la température de transition de phase (Tableau 3.03) et un élargissement du pic (Figure 3.07) de SOPC lorsque la concentration de la porphyrine augmente. Un dédoublement du pic en présence de TPPmOH₄ est observé pour les rapports 1/50 et 1/25 (Figure 3.07) ce qui pourrait être expliqué par l'existence de domaines de SOPC plus riches en porphyrine que d'autres, ces domaines plus riches ayant une température de fusion des chaînes plus basse. Or, ce dédoublement devient plus important au rapport 1/10 allant jusqu'à une quasi-disparition du pic initial. Ce résultat est reproductible dans deux préparations différentes, ce qui élimine l'hypothèse de la non homogénéité de la préparation.

L'enthalpie de transition de SOPC évolue en sens contraire selon la porphyrine associée (Tableau 3.03). Dans le cas de la TPPmOH₄, elle diminue légèrement à un rapport 1/50 par rapport à celle du SOPC pure et la température de transition est différente de celle de SOPC. Cette diminution de la température et de l'enthalpie est de plus en plus prononcée avec l'augmentation de la concentration de la porphyrine. Au contraire, en présence de TPP(pDEGMan)₃, l'enthalpie de transition de SOPC diminue fortement à la plus faible concentration de porphyrine (1/50), mais elle augmente à nouveau aux concentrations plus élevées.

La température de transition de SOPC en présence de TPP(pDEGMan)₃ remonte lorsque le rapport est de 1/10, alors qu'elle diminue considérablement au rapport 1/50. Ceci pourrait suggérer un effet différent de cette porphyrine sur la bicouche lipidique à partir du rapport 1/10. Ce rapport correspond à une concentration très élevée de la porphyrine dans la bicouche.

Autant l'effet désorganisant de TPPmOH₄ sur SOPC est clair (en accord avec les résultats obtenus par Desroches et al. (2004), autant l'effet de TPP(pDEGMan)₃ est plus difficile à comprendre d'après les données obtenues.

Tableau 3.03: Température et enthalpie de transition de phase de SOPC en présence des porphyrines.

	Température de transition (°C)	Enthalpie de transition (J/g de SOPC)
SOPC pure	7,0	2,8
TPP(<i>p</i> DEGMan) ₃ -SOPC 1/50	4,6	1,4
TPP(<i>p</i> DEGMan) ₃ -SOPC 1/25	2,2	1,8
TPP(<i>p</i> DEGMan) ₃ -SOPC 1/10	3,4	2,0
TPP <i>m</i> OH ₄ -SOPC 1/50	2,3	2,7
TPP <i>m</i> OH ₄ -SOPC 1/25	0,3	2,5
TPP <i>m</i> OH ₄ -SOPC 1/10	-2,1	2,2

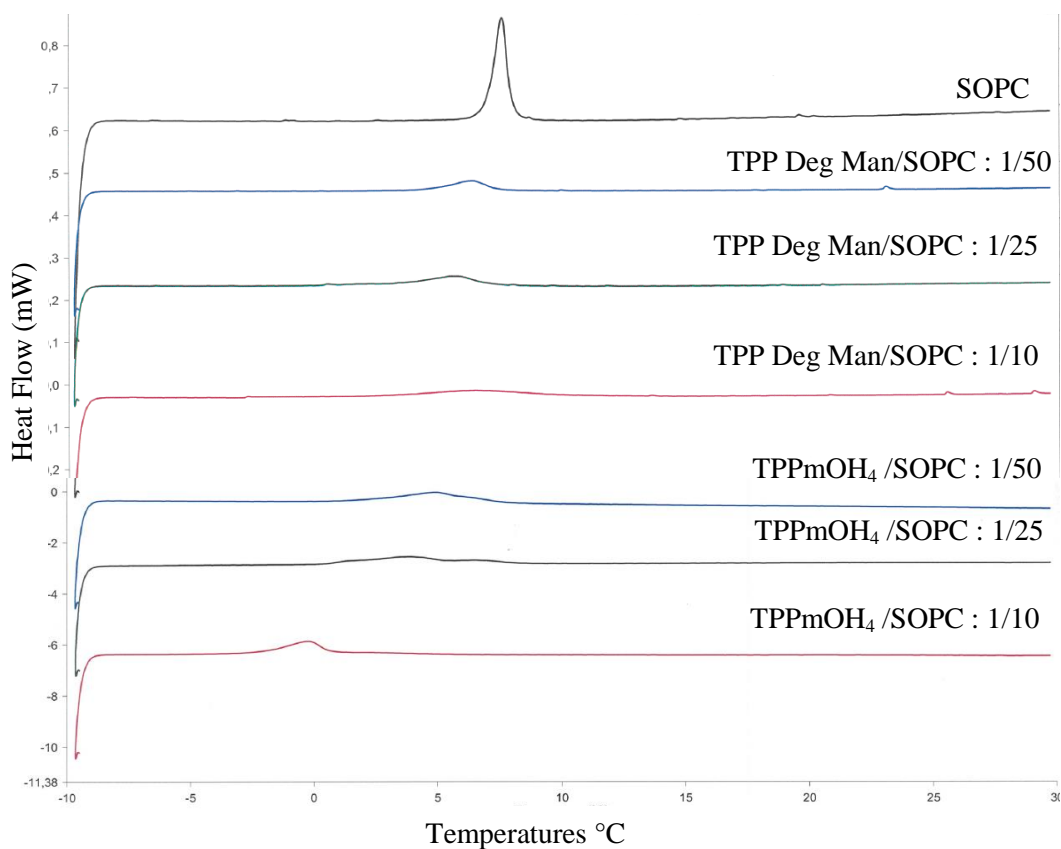


Figure 3.07 : Thermogrammes obtenus pour les mélanges SOPC-TPP*m*OH₄ ou TPP(*p*DEGMan)₃.

Papahadjopoulos et collaborateurs ont divisé les protéines en trois catégories selon l'évolution de la T_m et de l'enthalpie de transition (Papahadjopoulos et al. 1975). Leur classification a été

reprise et adaptée pour des molécules médicamenteuses par El Maghraby et al. (2005). Le principe de classification est le suivant :

- Catégorie 1 : si une augmentation de la ΔH de transition du lipide est observée, avec augmentation ou sans changement de la T_m . La molécule est hydrophile et s'adsorbe à la membrane, mais elle ne pénètre pas.
- Catégorie 2 : Si la T_m et la ΔH diminuent toutes deux d'une manière drastique. Il s'agit de molécules partiellement hydrophiles ou partiellement hydrophobes qui pénètrent partiellement dans la bicouche et la déforment, éventuellement.
- Catégorie 3 : Si la T_m ne varie pas significativement, mais qu'une diminution linéaire de ΔH en fonction de la concentration se produit. C'est le cas d'une molécule lipophile qui pénètre très profondément dans la membrane, en interagissant par des interactions hydrophobes avec les molécules de phospholipide.

D'après la classification de Papahadjopoulos (1975), les valeurs de ΔH montrent que TPP[*p-dendr*(DEGMan)₃ et TPP(*mGluOH*)₄ sont plutôt hydrophiles et interagissent plutôt avec les groupements polaires (tableau 3.03). Mais les deux molécules entraînent une diminution très importante de T_m , ce qui laisse penser qu'il y a tout de même pénétration de ces molécules dans la bicouche de SOPC. D'après la classification d'El Maghraby et al. (2005), le comportement de ces deux molécules les placerait dans le groupe 2 (regroupant des molécules à *logP* faiblement négatif). Ceci est cohérent avec les valeurs de *clogP* légèrement négatifs trouvées pour ces porphyrines (-1,86 pour TPP[*p-dendr*(DEGMan)₃ et -0,28 pour TPP(*mGluOH*)₄) (Tableau 1.02, chapitre 1). Elles pénètrent sans doute partiellement dans la membrane ou la déforment. Pour TPP(*mGluOH*)₄, ce mécanisme d'interaction est en accord avec le résultat publié par Desroches et al. (2004) et Ibrahim et al. (2011). Pour TPP[*p-dendr*(DEGMan)₃, l'insertion dans la bicouche phospholipidique serait apparemment moins profonde que précédemment proposée (Makky et al. 2010a ; Ibrahim et al. 2011).

D'après la classification de Papahadjopoulos (1975), TPP*mOH*₄ serait plutôt dans le groupe 2 car T_m diminue drastiquement (tableau 3.03). En revanche, la diminution de ΔH est peu significative. Cependant, la diminution de ΔH est linéaire avec la concentration ce qui laisse penser que TPP*mOH*₄ pénètre profondément dans la bicouche. Ceci placerait TPP*mOH*₄ dans le groupe 3 (tableau 3.03, et la figure de l'annexe A 3.03). D'ailleurs, si on compare TPP*mOH*₄ aux molécules étudiées par El Maghraby et al. (2005), TPP*mOH*₄ se

place plutôt dans le groupe 3 comme l'oestradiol ($\log P$ élevé) en accord avec la valeur de $\log P$ calculée pour cette molécule ($clogP = 10,38$). Ceci est cohérent avec les résultats publiés par Desroches et al. (2004) et Ibrahim et al. (2011).

Enfin, en ce qui concerne TPP(*p*DEGMan)₃, on observe à la fois une diminution de T_m et de ΔH . L'abaissement de T_m est plus limité qu'en présence des autres porphyrines, mais la diminution de ΔH est drastique. Ceci placerait cette molécule dans le groupe 2, en accord à la fois avec la classification de Papahadjopoulos (1975) et celle d'El Maghraby et al. (2005), bien que le $clogP$ de TPP(*p*DEGMan)₃ soit égal 1,68 et non faiblement négatif comme pour TPP[*p-dendr*(DEGMan)₃ et TPP(*m*GluOH)₄.

La pénétration des porphyrines est contrôlée par la tétraphénylporphyrine, hydrophobe. Pour TPP*m*OH₄, la contribution polaire des hydroxyles est faible, en regard de la contribution apolaire du cycle tétrapyrrolique. Ceci explique l'effet décroissant de TPP*m*OH₄ sur la T_m et la ΔH . Les autres porphyrines portent des sucres. Or, Crowe et Crowe (1991) ont montré que certains sucres augmentent la température de transition de phase et diminuent l'enthalpie des bicouches phospholipidiques, probablement par un mécanisme de déshydratation à faible concentration. A concentrations élevées, en revanche, ils se lieraient à la bicouche et diminueraient la T_m . D'autres au contraire, comme le glucose, diminue T_m et ΔH en s'associant aux têtes polaires. Ceci pourrait expliquer la T_m particulièrement basse mesurée pour TPP(*m*GluOH)₄.

En considérant ces résultats, il apparait nécessaire de caractériser l'interaction phospholipide-porphyrine par d'autres techniques telles que la spectroscopie infrarouge.

8.1.2. Résultats de l'étude par FTIR ATR

8.1.2.1. Spectres d'absorption de la SOPC et des porphyrines

La spectroscopie infrarouge a été largement utilisée pour l'analyse des phospholipides. L'attribution des bandes de la SOPC est assez simple en combinant les données de POPC (Hull et al. 2005), DMPC (Gauger & Pohle, 2005) ou DPPC (Fringeli, 1977) (figure 3.08 et le tableau 3.05).

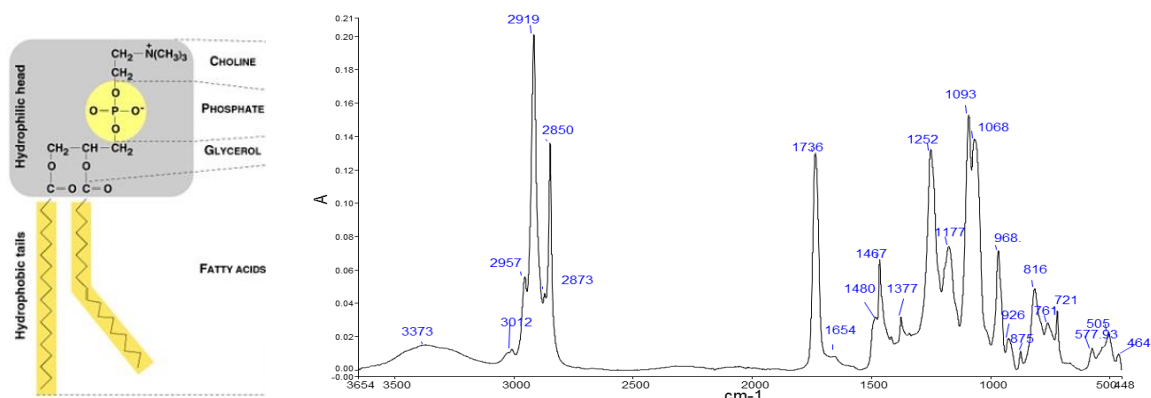


Figure 3.08: Représentation structurale de la SOPC et de son spectre infrarouge obtenu par ATR-FTIR

Tableau 3.04: Attribution des principales bandes du spectre infrarouge du SOPC.

Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution	Désignation (symbole)
3373	Valence O-H	ν_{OH}
2957	Valence asymétrique de CH ₃	$\nu_{as} CH_3$
2919	Valence asymétrique de CH ₂	$\nu_{as} CH_2$
2850	Valence symétrique de CH ₂	$\nu_s CH_2$
2873	Valence symétrique de CH ₃	$\nu_s CH_3$
1736	Valence C=O	$\nu C=O$
1468	Déformation de CH ₂	δCH_2
1377	Déformation de CH ₃	δCH_3
1252	Valence asymétrique de PO ₂	$\nu_{as} PO_2$
1177	Valence asymétrique de O=C-O-C	$\nu_{as} OC-O-C$
1093	Valence symétrique de PO ₂	$\nu_s PO_2$
1068	Valence du groupement C-O	$\nu C-O-PO_2$
968	Valence du groupement choline	$\nu_{as} (CH_3)_3N^+$
816	Valence asymétrique du P-O	$\nu_{as} (P-(O-C)_2)$
761	Valence symétrique du P-O	$\nu_s (P-(O-C)_2)$

Contrairement à la SOPC, il est difficile d'attribuer la plupart des bandes du spectre d'une porphyrine, par exemple la TPPmOH₄ (fig. 3.09). Certaines bandes ont été attribuées en se basant sur les données pour la TPP fournies par Sun et al. (2011) et El-Nahass et al. (2005) et sont résumées dans le tableau 3.05.

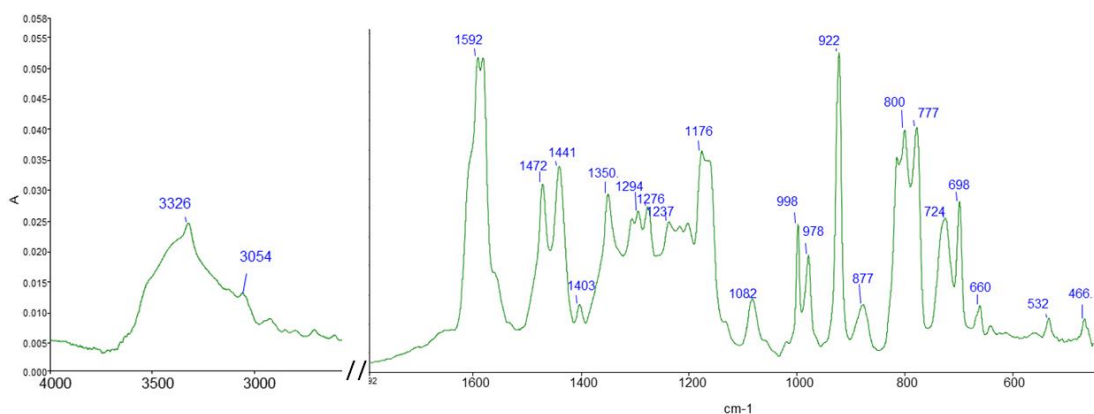


Figure 3.09: Spectre d'absorption IR de la TPPmOH₄

Tableau 3.05: Attribution des principales bandes du spectre infrarouge de la TPPmOH₄.

Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution	Désignation (symbole)
3500	Vibration d'élongation de O-H	ν OH
3326	Vibration d'élongation de N-H	ν N-H
3054	Vibration d'élongation =C-H	ν =C-H
1592	Vibration d'élongation de C=C aromatique (macrocycle de la porphyrine et phényle)	ν C=C
1472	Vibration d'élongation C=C du macrocycle de la porphyrine	ν C=C
1441	Vibration de déformation C-H phényle	δ C-H
1350	Vibration d'élongation de C=N	ν C=N

Le spectre de le TPP(*p*DEGMan)₃ est représenté dans la figure de l'annexe A3.04.

8.1.2.2. Etude de l'interaction de la SOPC avec les porphyrines

Nous avons étudié par IR les mêmes préparations analysées en DSC. Dans un premier temps, nous avons comparé les 4 échantillons de SOPC avec TPP[*p-dendr*(DEG-Man)₃], TPP(*p*DEGMan)₃, TPPmOH₄ ou TPP(*m*GluOH)₄ à un rapport molaire 50/1. Le pré-traitement

des spectres se résume à une correction de la ligne de base interactive suivie d'une normalisation selon la bande à 1737 cm^{-1} (C=O).

Les positions des bandes sont résumées dans le tableau 3.06. On considère un déplacement significatif si la différence est de 2 cm^{-1} ou plus. Selon les résultats de ce tableau, un déplacement des bandes νCH_2 asym est noté avec l'ajout de toute porphyrine. Des déplacements sont aussi remarqués au niveau de la νPO_2 asym, plus significatifs dans le cas des porphyrines avec mannose.

Tableau 3.06: Positions des bandes caractéristiques des spectres des échantillons TPP-SOPC. Les préparations ont un rapport molaire de 1/50 et les spectres sont enregistrés 30 min après dépôt avec une résolution spectrale de 2 cm^{-1} .

	SOPC	TPP $m\text{OH}_4$	TPP($m\text{GluOH}$) $_4$	TPP[p - <i>dendr</i> (DEGMan) $_3$]	TPP($p\text{DEGMan}$) $_3$
νCH_3 asym	2956,5	2954,5	2955	2956	2955
νCH_2 asym	2919	2922	2921,5	2921	2921,5
νCH_2 sym	2850,5	2852,5	2852	2852	2852
$\nu\text{C=O}$	1737	1738	1736	1736	1737
νPO_2 asym	1244	1242,5	1242,5	1241	1241
νPO_2 sym	1091	1089	1089,5	1090	1090
$\nu\text{C-O}$	1063	1063,5	1064	1062,5	1064
$\nu\text{N-(CH}_3)_3$	968,5	968	968	968	968,5
νPO asym	819	818	817	819	819,5
νPO sym	762	765	-	763	765

Nous avons aussi procédé à une comparaison des aires. L'aire calculée pour chaque bande a été normalisée par rapport à l'aire de la bande C=O, car elle n'est pas affectée par l'ajout des TPP. Nous nous sommes concentrés sur les bandes les plus intenses (tableau 3.07).

Tableau 3.07: Ratio des aires des bandes par rapport à celle de $\nu\text{C}=\text{O}$ après 30 min. *En bleu gras diminution, en vert italique augmentation par rapport à la SOPC pure.*

	νOH	νCH_2 asym	νCH_2 sym	$\nu\text{C}=\text{O}$	δCH_2	νPO_2 asym	νPO_2 sym
SOPC	1,41	0,99	0,48	1	0,6	0,9	0,24
SOPC + TPP $m\text{OH}_4$	0,86	0,95	0,47	1	0,73	0,93	0,15
SOPC + TPP($m\text{GluOH}$) ₄	<i>2,56</i>	1,08	0,51	1	<i>0,92</i>	0,95	0,17
SOPC + TPP[p - <i>dendr</i> (DEGMan) ₃]	<i>2,42</i>	1,06	0,52	1	<i>0,87</i>	1,02	0,19
SOPC + TPP(p DEGMan) ₃	<i>2,1</i>	1,01	0,48	1	0,68	0,93	0,17

Les rapports des aires calculés sont très comparables pour la majorité des bandes. Certes, il est difficile de discuter la significativité des différences sans appliquer un test statistique. En revanche, une tendance bien marquée pourrait être dégagée pour la bande OH.

Il est possible d'établir un certain ordre entre ces TPP en fonction de l'aire de la bande OH, tout en considérant que l'aire de cette bande est inférieure à celle de la SOPC pure dans l'échantillon SOPC + TPP $m\text{OH}_4$. Cette aire augmente considérablement pour les autres échantillons. Dans ces derniers, toutes les TPP possèdent des groupements sucres et sont plus hydrophiles. Les sucres apportent entre 12 et 16 groupements OH par molécule, respectivement grâce au 3 mannoses et 4 glucoses. Ceci justifie bien l'aire de la bande OH plus élevée pour SOPC + TPP($m\text{GluOH}$)₄. En revanche, ce n'est pas le cas pour TPP $m\text{OH}_4$ qui ne possède que 4 OH et dont l'aire de la bande OH est inférieure à celle de SOPC pure.

On peut suggérer que la présence de la TPP $m\text{OH}_4$ remplace partiellement les molécules d'eau susceptibles d'interagir avec le phospholipide.

En conclusion, les quatre porphyrines étudiées n'interagissent pas avec la choline de la SOPC. A un rapport molaire 1/50, deux sites d'interaction potentiels peuvent être retenus à ce stade, il s'agit de la chaîne aliphatique et du groupement PO_2 .

Aucune signature vibrationnelle de la porphyrine n'a pu être observée sur le spectre, il nous a donc semblé judicieux d'augmenter la concentration de la porphyrine dans l'échantillon afin d'observer un effet plus intense.

8.1.2.3. Analyse des spectres SOPC- TPPmOH₄ à différents rapports molaires.

- Comparaison des spectres à un instant *t*

Les trois rapports molaires 1/10, 1/25, 1/50 ont été comparés après 55 min sous contrôle de l'humidité relative (figure 3.10).

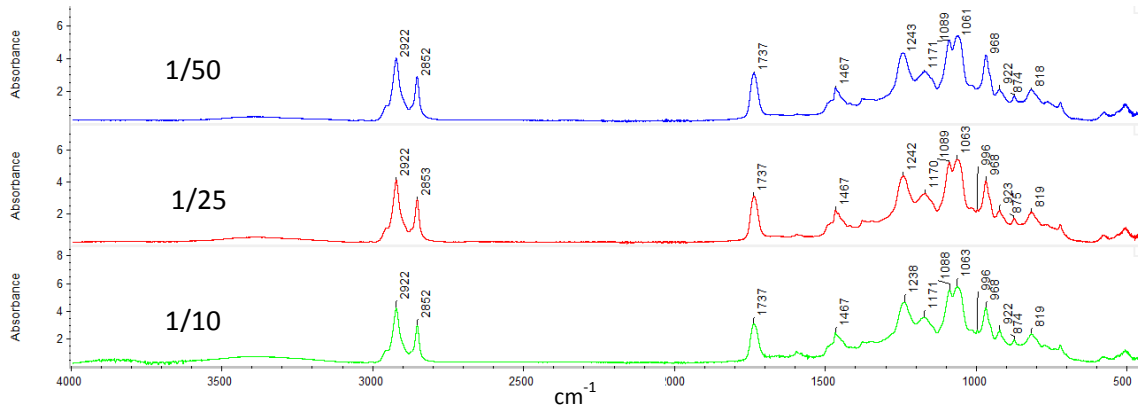


Figure 3.10: Spectres d'absorption des mélanges TPPmOH₄- SOPC à des rapports molaires 1/50, 1/25, 1/10 après 55 min d'évaporation de l'eau

- Zone 4000-2800 cm⁻¹ (figure 3.11):

L'analyse de cette zone révèle une augmentation de l'aire de la bande OH en fonction de la porphyrine. Il est à rappeler qu'une molécule de TPPmOH₄ contient 4 groupements OH, ce qui explique bien ces résultats. Aucun déplacement au niveau des bandes CH₂ ou CH₃ n'est détecté.

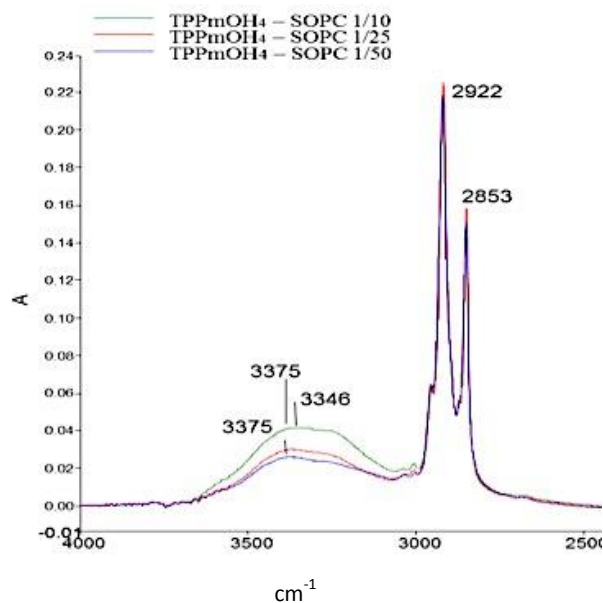


Figure 3.11: Spectres d'absorption des mélanges TPPmOH₄- SOPC à des rapports molaires 1/50, 1/25, 1/10 après 55 min d'évaporation de l'eau sur la zone 4000-2800 cm⁻¹.

- Zone 1290 -1000 cm⁻¹ (figure 3.12).

En tenant compte de la résolution spectrale, on note un déplacement de la bande $\nu_{as}PO_2$ de 5 cm⁻¹. Ce déplacement va dans le sens des longueurs d'ondes plus faibles et il est bien corrélé à l'augmentation de la concentration de la TPPmOH₄. Il est à noter que la $\nu_{as}PO_2$ de la SOPC pure se positionne vers 1247 cm⁻¹ après 55 min d'évaporation, ce qui revient à un écart de 12 cm⁻¹ par rapport au mélange TPPmOH₄-SOPC (1/10). Ainsi que le montre la figure 3.12, un déplacement moins important de ν C-O-PO₂ (2 cm⁻¹) est également détecté. Les bandes ν_s OC-O-C, ν_sPO_2 restent invariables.

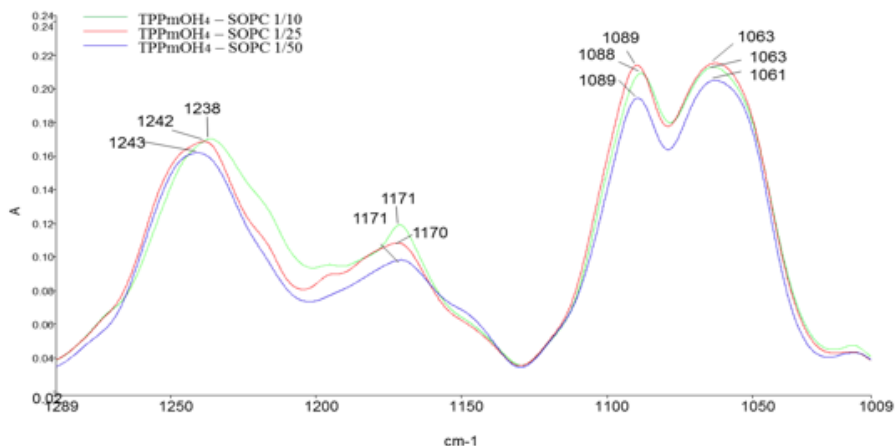


Figure 3.12: Spectres d'absorption des mélanges TPPmOH₄-SOPC à des rapports molaires 1/50, 1/25, 1/10 après 45 min d'évaporation de l'eau sur la zone 1280-1000 cm⁻¹

- Zone 1000-400 cm⁻¹

L'exploitation de cette partie de spectre ne montre pas de variation particulière.

Pour résumer, la TPPmOH₄ induit un déplacement de la bande $\nu_{as} CH_2$ par rapport à SOPC pure ; Néanmoins, ce déplacement n'est pas fonction de la concentration de la porphyrine,

contrairement à la bande $\nu_{as}PO_2$ qui se déplace vers des longueurs d'ondes plus faibles en augmentant la concentration de la porphyrine.

8.1.2.4. Analyse des spectres SOPC-TPP(*p*DEGMan)₃ à différents rapports molaires.

Tout comme pour TPP*m*OH₄, trois rapports molaires ont été étudiés (figure 3.13). Les déplacements de bandes touchent la $\nu_{as} PO_2$ (dont l'écart atteint 11 cm^{-1} avec l'augmentation de la TPP de 1247 cm^{-1} → 1236 cm^{-1}), la $\nu_s PO_2$ et la $\nu_{as} PO$ (en particulier pour le rapport 1/10).

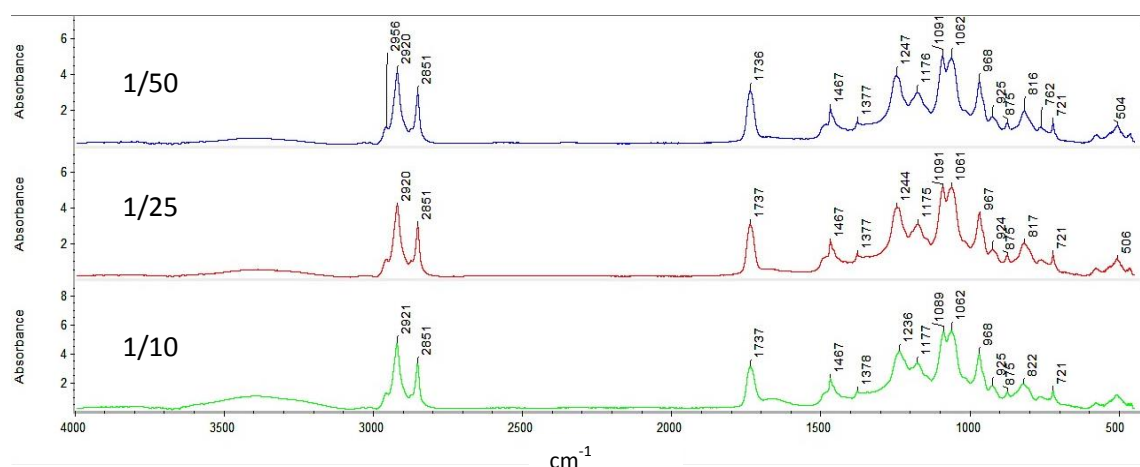


Figure 3.13: Spectres d'absorption sur la zone 4000-400 cm^{-1} des mélanges SOPC - TPP(*p*DEGMan)₃ obtenus en variant la concentration et enregistrés après une évaporation de l'eau pendant 55 min.

Après l'évaporation de l'eau, la bande $\nu_{as} PO_2$ évolue vers 1247 cm^{-1} pour le rapport 1/50 ce qui est aussi le cas pour la SOPC pure. A une concentration plus élevée en TPP, l'effet sur la cette même bande est bien clair avec le déplacement vers des longueurs d'ondes plus faibles. Ceci suggère qu'à faible concentration, la TPP(*p*DEGMan)₃ interagit avec les CH₂ du phospholipide et que les interactions avec le groupement phosphate apparaissent à des concentrations plus élevées.

Tout comme la $TPPmOH_4$, la $TPP(pDEGMan)_3$ interagit aussi bien avec la chaîne aliphatique (même à de faibles concentrations) qu'avec le groupement phosphate de la SOPC. En revanche, étant donné le déplacement de toutes les bandes relatives à ce groupement et la position finale de la bande $\nu_{as} PO_2$, l'interaction de la $TPP(pDEGMan)_3$ semble être plus forte que celle de la $TPPmOH_4$ à des concentrations élevées.

8.1.2.5. Comparaison des aires

Il est intéressant d'exploiter l'évolution des aires de ces échantillons analysés aux paragraphes 8.1.2.3 et 8.1.2.4. Selon une étude cinétique (qui ne figure pas dans ce rapport) nous avons remarqué certaines variations en fonction du temps, tant que l'échantillon n'est pas assez déshydraté. Les aires qui seront comparés par la suite ont été enregistrées au bout de 55 min pour tous les échantillons.

Tableau 3.08 : Rapports des aires de bandes normalisées par rapport à $\nu_{C=O}$ (après 55 min). En bleu gras diminution, en vert italique augmentation par rapport à la SOPC pure.

	ν_{OH}	ν_{CH_2} asym	ν_{CH_2} sym	$\nu_{C=O}$	δ CH_2	ν_{PO_2} asym	ν_{PO_2} sym
SOPC pure	1,1	0,97	0,48	1	0,57	0,92	0,25
$TPPmOH_4$ + SOPC (1/50)	0,84	0,94	0,47	1	<i>0,72</i>	0,98	0,17
$TPPmOH_4$ + SOPC (1/25)	1,18	0,99	0,47	1	<i>0,72</i>	0,93	0,16
$TPPmOH_4$ + SOPC (1/10)	<i>1,83</i>	1,01	0,48	1	<i>0,78</i>	0,88	0,13
$TPP(pDEGMan)_3$ + SOPC (1/50)	1,14	0,98	0,49	1	<i>0,67</i>	0,98	0,26
$TPP(pDEGMan)_3$ + SOPC (1/25)	<i>1,52</i>	1	0,49	1	<i>0,70</i>	0,98	0,23
$TPP(pDEGMan)_3$ + SOPC (1/10)	<i>3,62</i>	1,09	<i>0,53</i>	1	<i>0,78</i>	0,67	0,15

L'aire de la bande OH est corrélée à la concentration de la porphyrine. Son augmentation est plus prononcée dans le cas de TPP(*p*DEGMan)₃. Selon l'étude cinétique, nous avons bien remarqué que l'évaporation de l'eau pour cette porphyrine, surtout à un rapport 1/10, est considérablement lente. Il peut être suggéré que mis à part le nombre supérieur d'hydroxyl, la TPP(*p*DEGMan)₃ pourrait retenir davantage de molécules d'eau. Ceci pourrait être confirmé par la comparaison de l'aire de TPP*m*OH₄ + SOPC à 30 min (tableau 3.07) et à 55 min (tableau 3.08). Aucune variation n'est quasiment notée, contrairement au mélange TPP(*p*DEGMan)₃ + SOPC .

Par ailleurs, l'aire de δ CH₂ dans le tableau 3.09 est plus élevée que celle de la SOPC et ceci pour tous les échantillons. Pourtant aucun déplacement n'est détecté (la bande se situe vers 1467cm⁻¹ pour tous les échantillons). Aucune explication n'est trouvée.

La comparaison des aires ν PO₂ asym/ ν PO₂ sym montre une diminution simultanée des aires pour le TPP(*p*DEGMan)₃ + SOPC (1/10) ce qui est en accord avec les résultats précédents.

*Pour résumer, la TPP*m*OH₄ et TPP(*p*DEGMan)₃ interagissent avec la chaîne aliphatique et le groupement phosphate de la SOPC. Si l'interaction avec la chaîne aliphatique est non spécifique à la TPP utilisée (indépendante de la nature du sucre et des espaceurs), ceci n'est pas le cas pour le groupement PO₂. En effet, il faut des concentrations élevées pour observer une forte interaction de la TPP(*p*DEGMan)₃ avec le PO₂; une interaction qui se produit potentiellement par des liaisons hydrogènes. Au-dessous d'un rapport 1/10, l'interaction avec le groupement PO₂ est plus forte avec la TPP*m*OH₄.*

Les résultats de l'ATR-FTIR sont complémentaires de ceux obtenus en chromatographie (chapitre 1) et de la DSC. En effet, l'HPLC nous a permis de mettre en évidence la nature des interactions (hydrophobe ou hydrophile) qui peuvent exister avec un lipide simple greffé sur la colonne IAM. Ensuite, la DSC a démontré aussi la présence de cette interaction dans un système de bicouche lipidique simple (SOPC) provoquant une désorganisation de la bicouche en présence de la TPP différente de celle obtenue pour le SOPC pure durant la transition de phase. L'ATR-FTIR nous a permis de mieux localiser cette interaction au niveau de la tête

polaire, l'interface polaire / apolaire ou la chaîne aliphatique. Ces résultats seront confirmés (ou pas) en utilisant la microspectroscopie IR en mode transmission sur la ligne SMIS.

8.2. Analyse des modèles lipidiques en présence des porphyrines par microspectroscopie IR

8.2.1. Analyse de l'homogénéité des préparations

Il est évident que l'analyse des modèles lipidiques-TPP pourrait être réalisée par ATR-FTIR comme précédemment, et que ceci ne nécessite pas l'énergie du Synchrotron. Cependant, en ATR, un seul spectre moyen est enregistré à partir d'un échantillon contrairement à la méthode de la microspectroscopie. En effet, l'un des avantages de cette dernière technique réside dans la possibilité d'exploiter davantage l'homogénéité de l'échantillon. La porphyrine, hydrophobe, s'agrège dans la solution aqueuse quand elle n'est pas associée aux lipides. Plus la concentration de la porphyrine est élevée, plus il y a d'agrégats. A l'œil nu, ces agrégats ne sont pas vraiment visibles en raison de la couleur foncée de la suspension. Nous avons donc préparé des suspensions TPP mOH_4 - SOPC et TPP(*p*DEGMan)₃ -SOPC à un rapport molaire 1/10 afin de les analyser par microspectroscopie au niveau de la ligne SMIS de SOLEIL. La figure 3.14 présente deux zones capturées pour la même préparation du mélange SOPC-TPP(*p*DEGMan)₃. Elle montre bien l'hétérogénéité de la préparation. Il n'est pas possible d'enregistrer un spectre dans les zones assez concentrées en TPP ou même en SOPC (pour les préparations de SOPC seul) à cause de l'absorbance très élevée (saturation du signal). Ceci nous a obligé à pointer sur des zones plus claires, voire même sur les bords de la gouttelette pour obtenir un spectre exploitable.

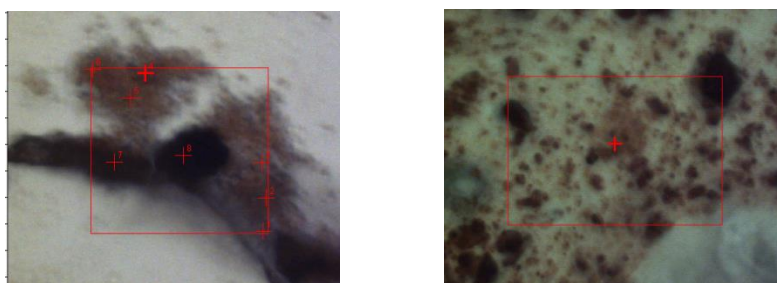


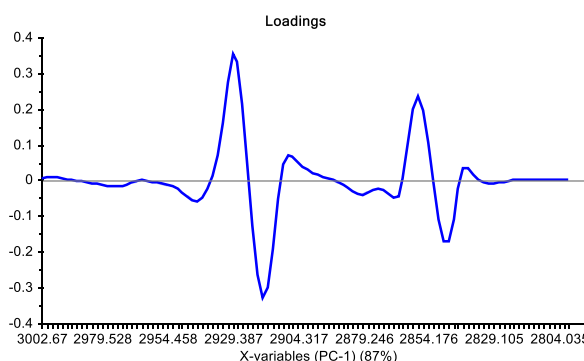
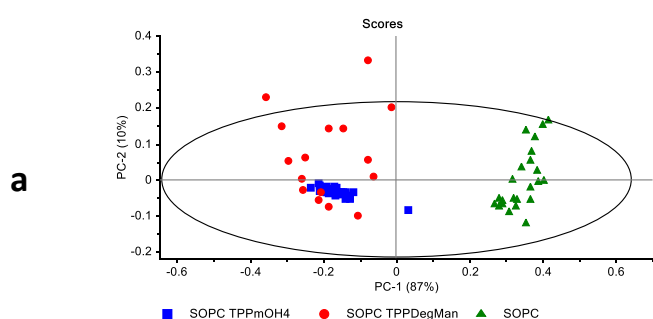
Figure 3.14 : Deux zones différentes d'une même préparation lipidique montrant la non homogénéité de la préparation. Echelle en μm , grossissement x32.

L'exploitation des spectres enregistrés pour les modèles lipidiques a montré la présence de « vagues » sur les signatures spectrales dont l'origine est inconnue. Ceci a rendu difficile les pré-traitements de correction de la ligne de base. Nous avons dû recourir à la dérivée seconde pour analyser ces échantillons. Ce pré-traitement a été suivi d'une normalisation vectorielle avant l'analyse multivariée. Le calcul des spectres moyens a été réalisé après une correction linéaire de la ligne de base non interactive et une normalisation sur la gamme spectrale. Ce traitement ne permet que l'exploitation des positions des bandes.

8.2.2. Analyse de SOPC-TPPmOH₄ ou SOPC-TPP(pDEGMan)₃ (10 :1) par microspectroscopie IR

Les graphes des scores et loadings de l'ACP obtenus pour SOPC et les deux porphyrines sont présentés dans la figure 3.15.

• ACP sur la zone 3000-2800 cm⁻¹



• ACP sur zone 1770 – 1000 cm⁻¹

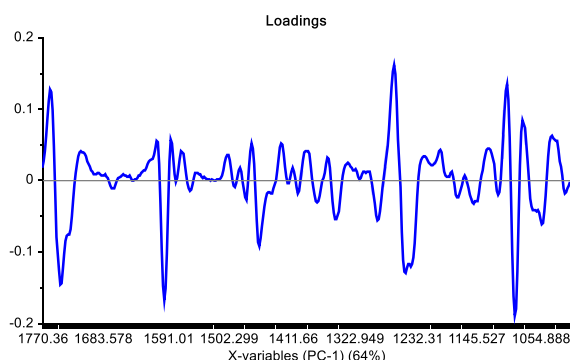
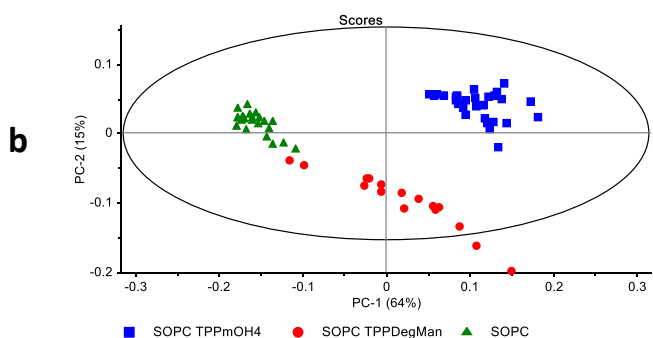


Figure 3.15: ACP sur les échantillons SOPC avec ou sans porphyrine, calculée sur deux zones (a) 3000-2800 cm^{-1} et (b) ACP sur zone 1770 – 1000 cm^{-1}

Le graphe des scores de l'ACP sur toute la gamme spectrale (non présentée ici) ressemble beaucoup à celui de la chaîne acyl (zone 3000-2800 cm^{-1}) (figure 3.15 a) avec une contribution de la PC1 de 87%. Au niveau de cette dernière, on sépare bien la SOPC des deux mélanges, ce qui démontre, tout comme les résultats de l'ATR FTIR, une interaction des porphyrines avec les CH_2 des lipides. Les spectres de SOPC-TPP(*p*DEGMan)₃ sont plus dispersés, démontrant que la préparation est moins homogène que celle de SOPC-TPP*m*OH₄ (ceci était aussi bien visible à partir des images des échantillons). La deuxième ACP est effectuée sur la zone 1770-1000 cm^{-1} (figure 3.15 b), caractérisée par des vibrations de la tête polaire. Elle sépare mieux les trois groupes et démontre qu'il y a davantage de différences entre les deux porphyrines au niveau de ce domaine. La PC1 capture principalement « l'épaulement » au niveau de $\nu_s\text{PO}_2$ à 1095 cm^{-1} avec un écart de 6 cm^{-1} et l'apparition de la bande 1595 cm^{-1} dans l'échantillon de SOPC-TPP*m*OH₄. Elle capture aussi le déplacement important vers des nombres d'ondes plus faibles au niveau de $\nu_{as}\text{PO}_2$ 1257 cm^{-1} (de 10 cm^{-1} et 8 cm^{-1} selon les spectres moyens des porphyrines) et le déplacement au niveau du C=O qui n'est pas significatif (varie entre 1737 et 1735 cm^{-1}). Selon les spectres, deux bandes font leur apparition en présence de TPP*m*OH₄ (1348 cm^{-1} et 1283 cm^{-1}) mais qui ne jouent pas de rôle dans la discrimination (figure 3.16). La présence de la TPP(*p*DEGMan)₃ est prononcée au niveau de 1060 cm^{-1} : il s'agit de ν C-O-PO₂ qui n'a pas la même forme observée en ATR-FTIR pour les deux spectres de SOPC et SOPC-TPP*m*OH₄ .

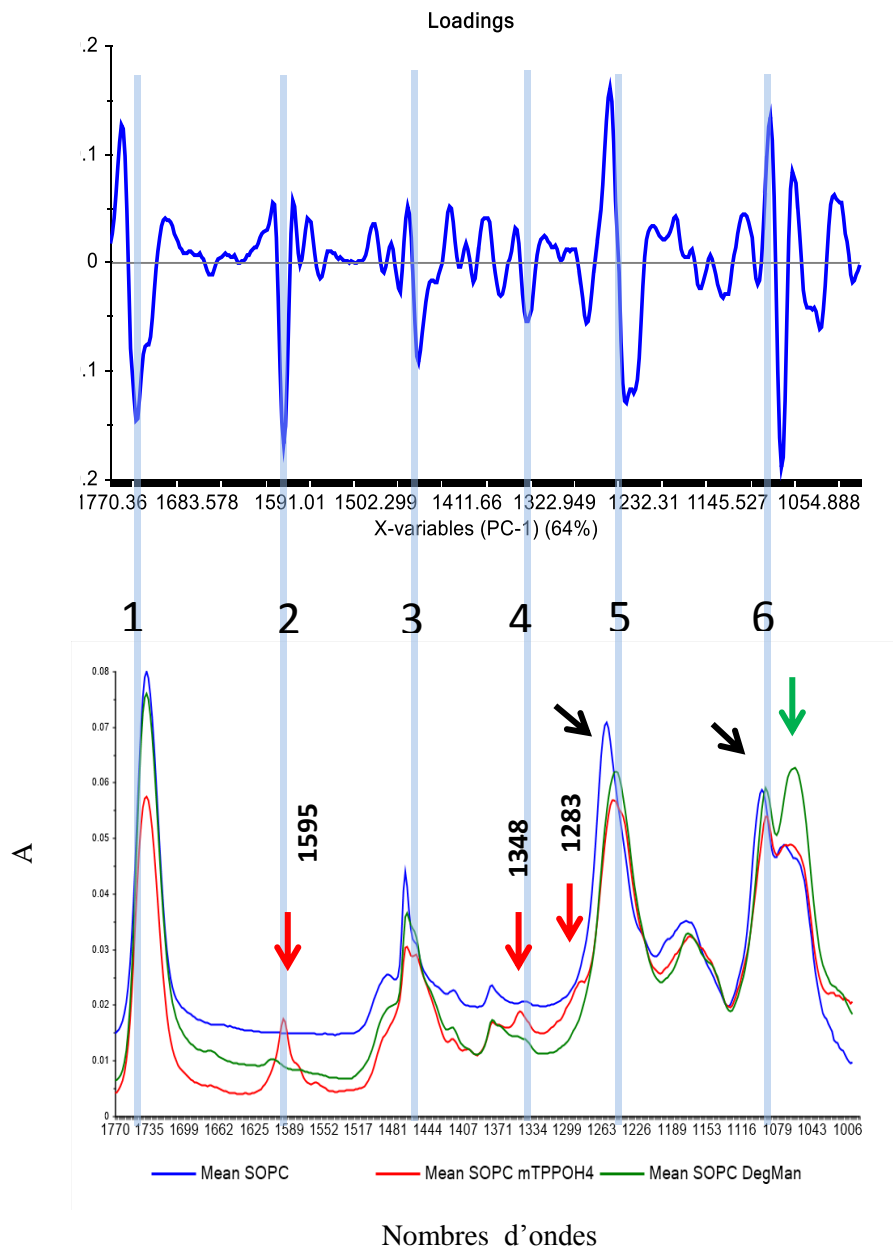


Figure 3.16: les spectres des échantillons de SOPC avec ou sans porphyrine et le loading PC1

En conclusion, d'après les résultats des analyses par le rayonnement du synchrotron, les chaînes aliphatiques (par les $\nu_{as/s} CH_2$), et la tête polaire au niveau des bandes $\nu_{s/as} PO_2$ sont affectées par l'ajout de porphyrines. Il ne semble pas y avoir un effet d'interaction plus intense d'une porphyrine par rapport à l'autre.

8.2.3. Etude de l'effet de l'hydratation

Les spectres enregistrés par ATR-FTIR et microscopie IR ont démontré quelques différences comme la fréquence de $\nu_{s/as}PO_2$ évoquée plus haut. Ceci nous a fait penser à mieux examiner ces différences pour tirer une conclusion claire quant au niveau de l'interaction SOPC-TPP, sachant que ces différences ne sont pas dues à l'appareil, mais aux conditions préalables à la mesure. On considère donc les échantillons mesurés en ATR-FTIR partiellement hydratés et ceux analysés au synchrotron déshydratés (car placés dans un dessiccateur avant l'acquisition). Les positions des bandes principales ont été relevées (tableau 3.09) pour les trois échantillons : (1) SOPC, (2) TPP mOH_4 -SOPC, (3) TPP(p DEGMan) $_3$ -SOPC.

Tableau 3.09 : Fréquences des bandes des spectres de trois échantillons aux rapports molaires 1/10 enregistrés en ATR-FTIR (Résol. spectrale $1cm^{-1}$) et microspectroscopie IR (Résol. spectrale $4cm^{-1}$). Les valeurs sont exprimées en cm^{-1} .

	ν_{CH_2} asym	ν_{CH_2} sym	$\nu_{C=O}$	δ CH ₂	ν_{PO_2} asym	ν_{as} OC- O-C	ν_{PO_2} sym	ν_{C-O-} PO ₂	ν_{as} (CH ₃) ₃ N ⁺	
ATR-FTIR	1	2918	2850	1737	1467	1246	1176	1092	1063	968
	2	2922	2852	1737	1467	1238	1171	1088	1063	968
	3	2920	2851	1737	1467	1236	1176	1088	1061	968
Synchrotron	1	2919	2850	1737	1465	1257	1174	1093	1072	968
	2	2923	2854	1737	1465	1249	1170	1091	1070- 1064	968
	3	2923	2854	1737	1465	1247	1172	1091	1060	968

*(1) SOPC, (2) TPP mOH_4 -SOPC, (3) TPP(p DEGMan) $_3$ -SOPC

La comparaison des données montre que :

- Les bandes ν_{CH_2} asym et ν_{CH_2} sym, se déplacent dans les deux conditions de mesures. L'interaction avec les chaînes des acides gras est confirmée pour les deux porphyrines d'une manière similaire. En présence d'eau, l'effet est plus prononcé pour TPP mOH_4 .

- La bande $\nu_{C=O}$ est invariable dans le cas de la bicouche partiellement hydratée comme non hydratée. Elle est indépendante de la porphyrine et du taux de l'hydratation. Dans la littérature, la bande 1737 cm^{-1} des diacyl phosphatidyl choline est réellement la somme de deux sous bandes dans le cas de lipides partiellement hydratés (Wong & Mantsch, 1988) Cependant, ceci n'a pas été observé pour nos échantillons au niveau du spectre de la dérivée seconde.
- La bande $\delta\text{ CH}_2$ dépend légèrement de l'humidité relative, mais elle est indépendante de la nature de la TPP.
- La bande $\nu_{PO_2\text{ asym}}$ est la bande la plus déplacée entre le spectre enregistré par ATR-FTIR et celui de smis. Pour ce dernier, la valeur atteint (1257 cm^{-1}) ce qui signifie que la SOPC est pratiquement déshydratée. Selon les valeurs de la littérature, elle peut atteindre au plus la fréquence 1260 cm^{-1} (Pohle et al., 2001). La dérivée seconde au niveau de la bande OH confirme l'absence des molécules d'eau. Cependant, ceci ne signifie pas une absence totale des molécules d'eau. Elles sont positionnées entre deux têtes polaires, ce qui favorise plus des interactions eau-eau, ou alors à l'intérieur du volume de la tête polaire (des interactions hydrogènes plus fortes). Il a été démontré par Scherer (1989) qu'à un minimum taux d'hydratation, il y a plus de molécules d'eau par lipides que de molécules d'eau à l'extérieur du lipide. Dans nos expériences, nous avons préalablement démontré un déplacement vers 1238 cm^{-1} de cette bande pour le ratio 1/10 en présence de TPP(*p*DEGMan)₃, et nous avons suggéré que c'était dû à l'interaction de la porphyrine avec la PO₂. Toutefois, cela pourrait résulter davantage d'une rétention importante de molécules d'eau qui hydrateraient ce groupement, plutôt que d'une interaction directe de la porphyrine avec lui. Or, dans les conditions de déshydratation, cette bande se déplace à 1247 cm^{-1} , mais reste tout de même décalée de 10 cm^{-1} par rapport à la SOPC; Ceci confirme bien l'existence d'une interaction TPP-PO₂ et ce, quel que soit le taux d'hydratation. La même conclusion pourrait s'appliquer à la TPP*m*OH₄, mais avec une légère différence au niveau de la force de liaison.
- La bande $\nu_{\text{as}}\text{ OC-O-C}$ est une bande qui discrimine clairement les deux TPPs. En effet, la TPP*m*OH₄ interagit plus fortement avec le C=O proche du glycérol, donc avec l'interface tête polaire/ chaîne aliphatique, sans doute par des liaisons hydrophobes.
- La bande $\nu_{PO_2\text{ sym}}$ est une bande légèrement hydratation dépendante. L'effet des deux porphyrines sur cette vibration est comparable.

- La bande $\nu_{\text{C-O-PO}_2}$ discrimine bien les deux porphyrines : la TPP(*p*DEGMan)₃ interagit plus fortement au niveau du C-O adjacent au PO₂, donc au niveau de la tête polaire. Sur le spectre, l'intensité de cette bande diminue clairement dans les conditions de déshydratation, sauf s'il y a de la TPP(*p*DEGMan)₃ dans l'échantillon.
- Sans surprise, la bande $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ ne se déplace pas car la choline ne peut pas faire de liaisons avec les molécules d'eau. La charge positive de l'azote empêche toute liaison avec l'hydrogène.

En résumé :

TPP(*p*DEGMan)₃ interagit avec les chaînes aliphatiques et avec la tête polaire via des liaisons directes avec le groupement PO₂⁻ ou le C-O adjacent.

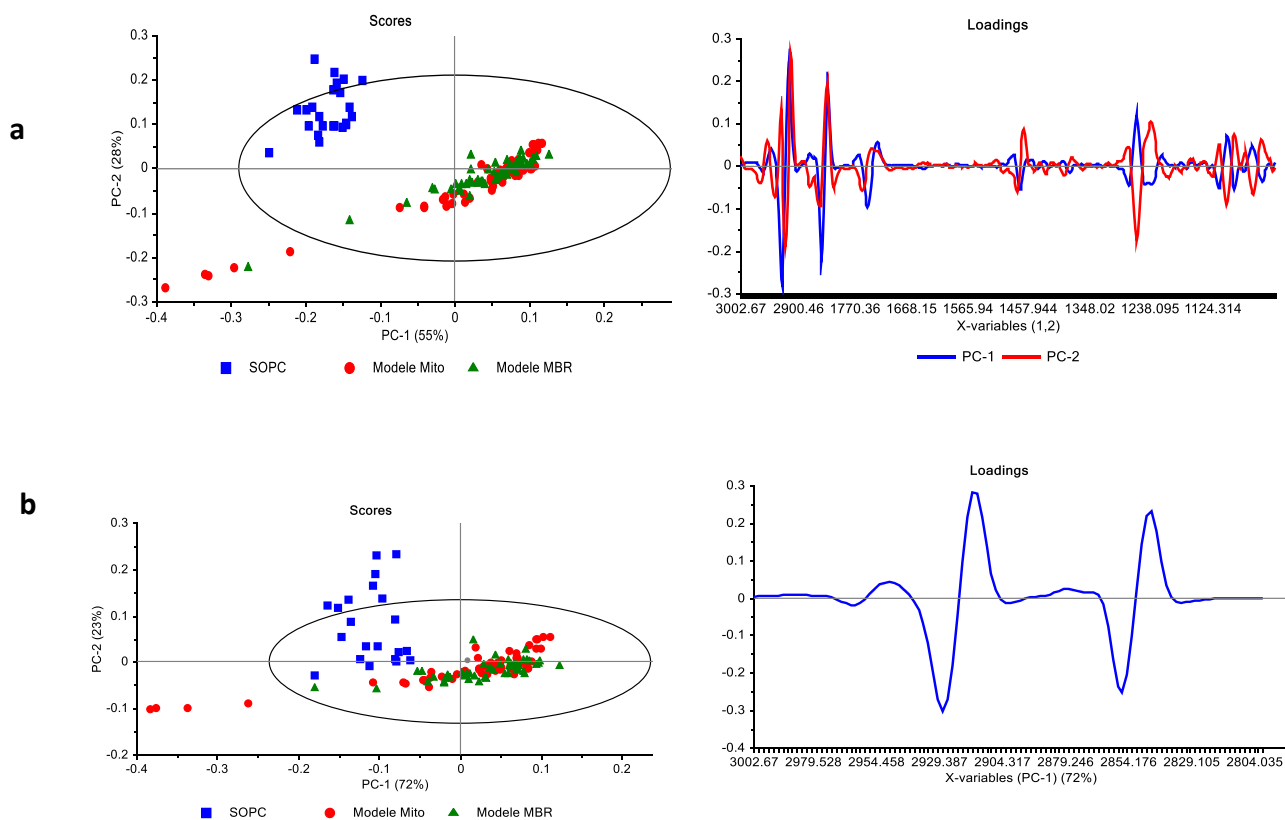
TPP*m*OH₄ interagit avec les chaînes aliphatiques, le groupement phosphate PO₂⁻ et le C=O (glycérol).

8.2.4. Comparaison des modèles lipidiques

Les modèles membranaires lipidiques préparés sont SOPC/SOPE/SOPS/Chol (56 :23 :11 :10) et (SOPC/SOPE/SOPS/Chol/CL) (42 :32 :9 :8 :6). Le premier est le modèle lipidique 2, établi dans le chapitre précédent et le second est un modèle élaboré pour mimer la membrane des mitochondries, dans lequel nous rajoutons la cardiolipine CL. Avant d'étudier l'interaction de ces modèles lipidiques avec les porphyrines, nous avons examiné leurs différences avec la SOPC pure.

Une première ACP sur l'ensemble des fréquences 3000-2800 cm⁻¹ et 1770-1000 cm⁻¹ semble distinguer la SOPC des autres modèles. Deux composantes principales sont retenues la PC1 (55%) et la PC2 (28%) (fig 3.17 a). Afin de mieux visualiser les résultats, la gamme spectrale est divisée en deux, et deux autres ACP ont été calculées sur les zones 3000-2800 cm⁻¹ (figure 3.17 b) et 1770-1000 cm⁻¹ (fig 3.17 c). Les deux modèles lipidiques n'ont pas pu être distingués l'un de l'autre. Ceci s'explique par l'absence de vibrations spécifiques de la cardiolipine (seul lipide différent entre les 2 modèles) qui est présente à un taux faible, d'une part, et dont les vibrations les plus intenses se superposent aussi avec celles des autres

phospholipides, d'autre part. La séparation des trois échantillons au niveau des bandes de la chaîne aliphatique est moins bonne que celle de la tête polaire. Ceci est dû à la présence des mêmes chaînes des phospholipides à une différence quantitative ne dépassant pas les 20%. Il faut noter que dans ces modèles, les chaînes aliphatiques sont identiques à celles de la SOPC (deux chaînes à 18 carbones et une insaturation), à l'exception de celles de la cardiolipine (4 chaînes de 18 carbones et 4 insaturations) et du cholestérol. Le loading (figure 3.17b) montre un déplacement au niveau des bandes CH₂. En examinant les spectres moyens, la bande de la $\nu_{as}CH_2$ est au niveau de 2919 cm⁻¹ pour le SOPC et 2921 cm⁻¹ pour les deux modèles, cet écart n'est pas donc significatif (< à la résolution spectrale).



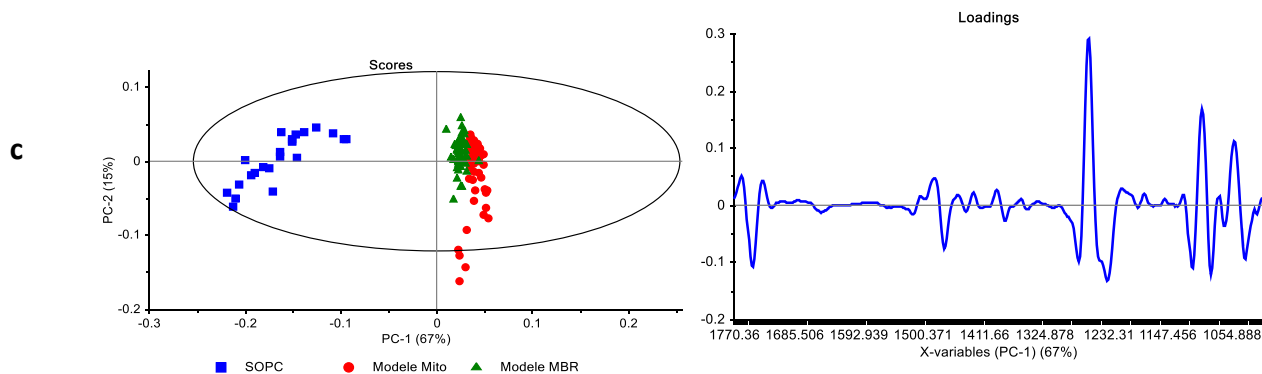


Figure 3.17 : ACP (scores et loading plots) des mélanges lipidiques et de la SOPC pure : **a/** sur la gamme spectrale ($3000-2800\text{ cm}^{-1}$ et $1770-1000\text{ cm}^{-1}$), **b/** sur les bandes $3000-2800\text{ cm}^{-1}$, **c/** sur la bande $1770-1000\text{ cm}^{-1}$.

En examinant l'ACP sur la zone $1770-1000\text{ cm}^{-1}$ (figure 3.17c), on remarque que la PC1 capture principalement un déplacement au niveau de la bande PO_2 . Il est donc important de noter la nouvelle position des bandes les plus décalées dans le mélange par rapport à la SOPC pure : $\nu_{\text{as}}\text{ PO}_2$ est déplacée de 8 cm^{-1} (de la position 1257 cm^{-1} à 1249 cm^{-1}) et $\nu_{\text{s}}\text{ PO}_2$ de 4 cm^{-1} (1093 à 1089 cm^{-1}). Ce déplacement est dû aux interactions entre les têtes polaires des phospholipides grâce au groupement carboxylate de la sérine et/ou aux trois hydrogènes de la PE, car a été démontré que le cholestérol interagit plutôt avec le glycérol. Cette bande : $\nu_{\text{as}}\text{ PO}_2$ se situe vers 1238 cm^{-1} pour la PS déshydratée et vers 1230 cm^{-1} pour la PE (Akutsu & Kyogoku, 1975), ce qui justifie sa position intermédiaire aux alentours de 1249 cm^{-1} . Par ailleurs, on remarque que le pic de la SOPC pure est plus étroit à mi-hauteur que celui des modèles ce qui suggère que le groupement PO_2 est plus déshydraté et plus immobilisé dans la bicouche constituée d'un seul phospholipide (Choi et al. 1991) et (Brumfeld et al. 1991). Sur cette même zone ($1770-1000\text{ cm}^{-1}$), nous remarquons l'apparition d'une nouvelle bande 1643 cm^{-1} qui traduit des vibrations d'élongation COO^- de la tête polaire de la sérine (figure 3.18).

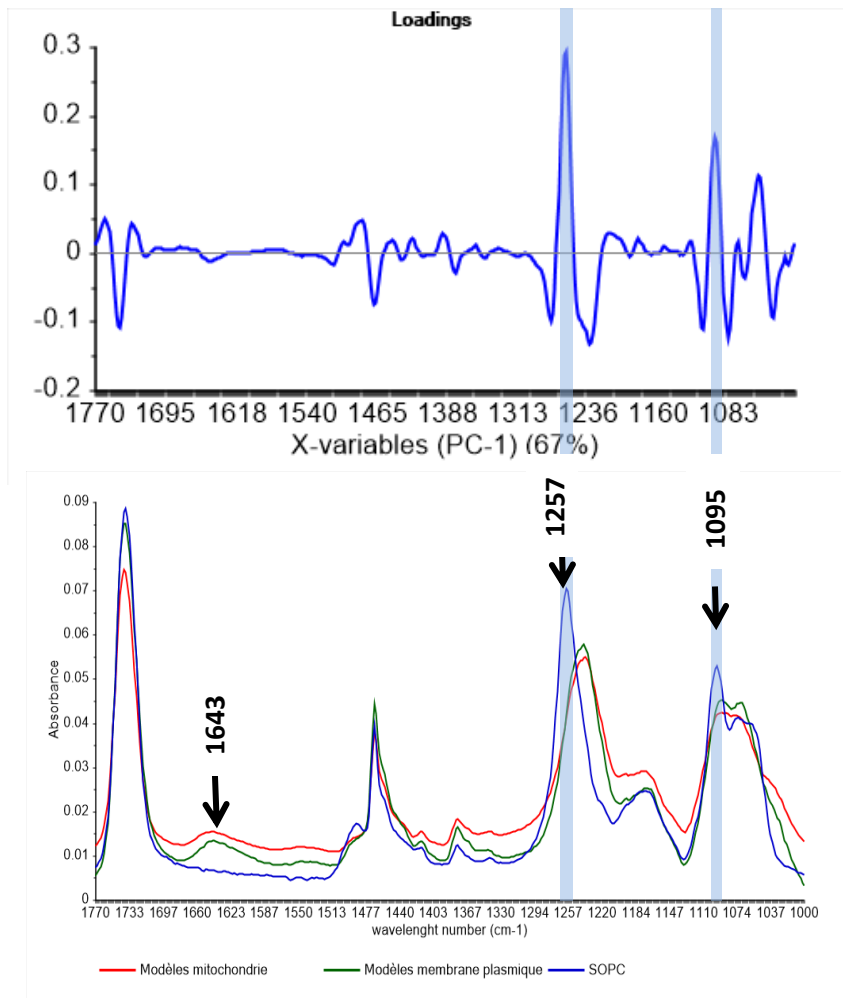


Figure 3.18: les spectres des deux modèles lipidiques et de la SOPC et le loading PC1

En conclusion, dans le cas du modèle membranaire complexe, les différences vibrationnelles par rapport au modèle simple (SOPC pure) se situent principalement au niveau du groupe phosphate des têtes polaires, site de liaison. L'effet du cholestérol sur les chaînes aliphatiques n'est pas intense étant donné sa faible concentration.

8.2.5. Modèles lipidiques mimant les membranes plasmique et mitochondriale – porphyrines

Le modèle SOPC/SOPE/SOPS/Chol (56 :23 :11 :10) a été analysé par microspectroscopie en présence de TPP(*p*DEGMan)₃ ou de TPP*m*OH₄. Une première ACP a été calculée sur les

zones 3000-2800 cm^{-1} et 1770-1000 cm^{-1} (Figure 3.19 a). Les deux composantes PC1 et PC2 expliquent 95% de la variation. La PC1 capture le déplacement au niveau des bandes CH_2 de la chaîne aliphatique qui, en présence des deux porphyrines, passent de 2921 cm^{-1} à 2925 cm^{-1} pour $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ et de 2850 cm^{-1} à 2854 cm^{-1} pour $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ selon les spectres moyens. Quant à la PC2 dont la variance est de 8%, elle est expliquée par la bande 1595 cm^{-1} (C=C) de la TPPmOH₄.

L'analyse multivariée du modèle lipidique de la mitochondrie SOPC/SOPE/SOPS/Chol/CL (42 :32 :9 :8 :6) a abouti aux mêmes résultats avec des composantes principales expliquant un taux de variance de 98% (figure 3.19 b). Seule différence, la PC2 explique aussi un certain déplacement de la bande $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$.

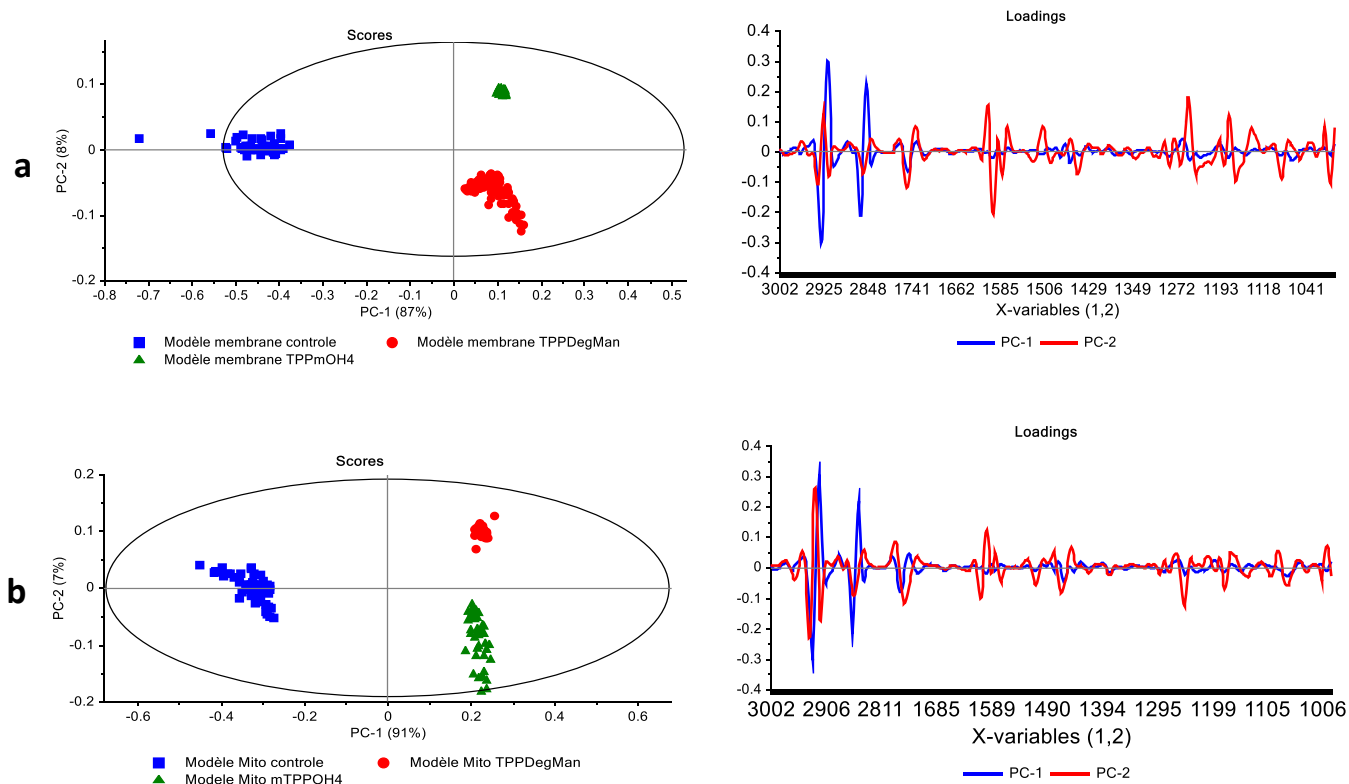


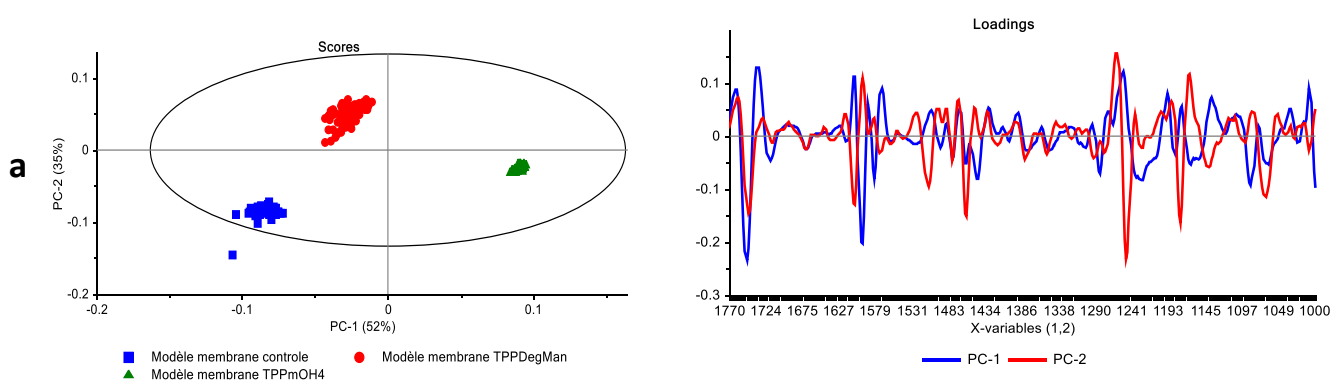
Figure 3.19 : graphes des scores et loading de la ACP calculés pour les spectres des modèles lipidiques de membrane plasmique (a) et de mitochondrie (b).

Etant donné que les loading de la figure 3.19 sont dominés par les variations de la zone 3000-2800 cm^{-1} , ce qui rend un peu difficile l'exploitation de la zone 1770 cm^{-1} -1000 cm^{-1} , une autre ACP est calculée sur cette zone (1770 cm^{-1} -1000 cm^{-1}).

L'ACP calculée sur la zone 1770 cm^{-1} - 1000 cm^{-1} (figure 3.20) permet d'obtenir une bonne séparation des trois échantillons et ceci dans le cas des deux modèles (membrane plasmique et mitochondriale).

Avec le modèle de membrane plasmique (figure 3.20 a), les spectres des échantillons contenant les porphyrines sont séparés à la fois par la PC1 (52%) et la PC2 (35%). La première composante explique 52% de la variance. Elle sépare le modèle avec la TPP mOH_4 des deux autres modèles (modèle contrôle et modèle avec TPP($pDEGMan$) $_3$). La PC1 capture essentiellement un faible déplacement de la bande C=O (2 cm^{-1}) et la présence de la bande 1595 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{C}$ aromatique) de la TPP mOH_4 . La PC2 contribue avec 35% de la variance résiduelle et sépare le modèle avec TPP($pDEGMan$) $_3$ des deux autres. Elle est expliquée par un déplacement de la bande $\nu_{\text{as}}\text{ PO}_2$ qui passe de 1240 cm^{-1} à 1234 cm^{-1} (6 cm^{-1}) uniquement en présence de TPP mOH_4 (figure 3.22). La PC2 explique aussi la déformation au niveau de $\nu_s\text{ PO}_2$ (une fusion entre les bandes 1089 cm^{-1} et 1070 cm^{-1} est observée, fig.3.21).

Pour le modèle de la membrane mitochondriale, une bonne séparation des modèles avec ou sans TPP a été obtenues. La PC1 (64%) explique une variance importante au niveau de la bande δCH_2 ce qui laisse penser que les deux porphyrines interagissent principalement au niveau de la chaînes aliphatique. La PC2 plus faible (7%) explique les bandes spécifiques de la TPP mOH_4 ;



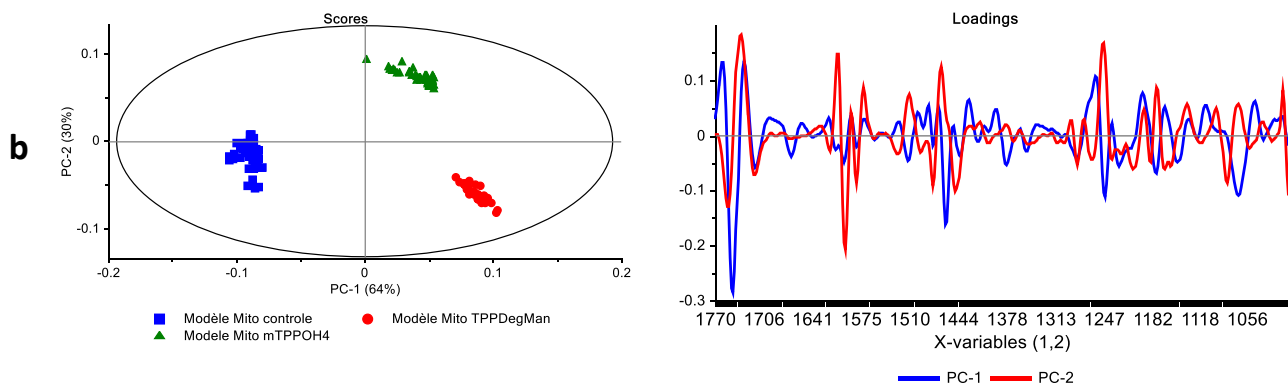


Figure 3.20 : Graphes des scores et loading de l'ACP calculés pour les spectres des modèles lipidiques de membrane plasmique (a) et de mitochondrie (b) (1770 cm^{-1} - 1000 cm^{-1})

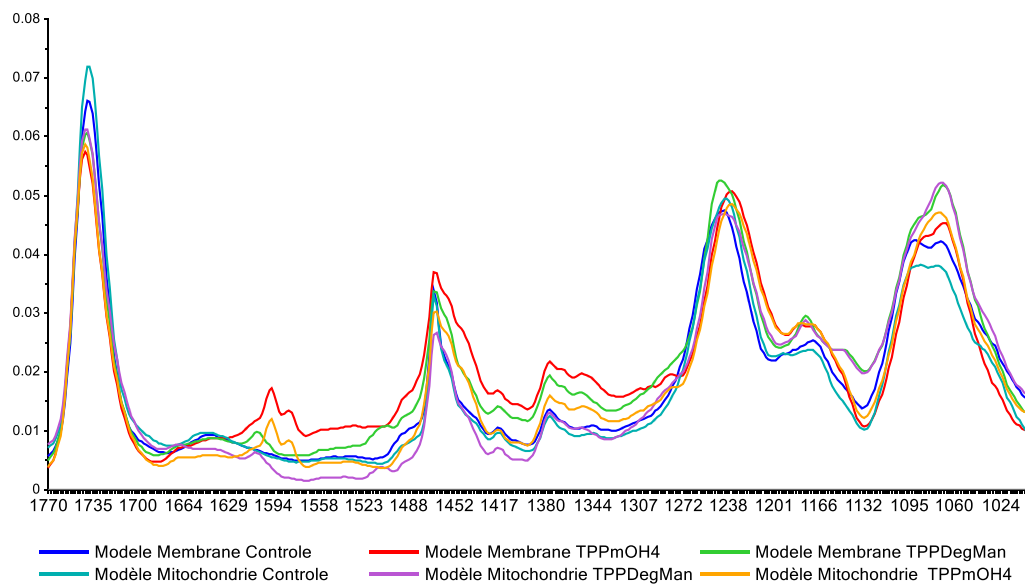


Figure 3.21: Spectres moyens des différents modèles lipidiques avec et sans porphyrines, visualisation de la zone 1770 cm^{-1} - 1000 cm^{-1}

Outre le déplacement de la bande, nous avons calculé les aires des différentes bandes qui ont été normalisées par rapport à la bande $\nu\text{ C=O}$ (tableau 3.10).

Tableau 3.10 : Rapport des aires des bandes caractéristiques des spectres des modèles lipidiques, normalisées selon la bande ν C=O. *En bleu gras, diminution de l'aire, et en vert italique augmentation de l'aire.*

	ν_{as} CH ₂	ν_s CH ₂	ν C=O	δ CH ₂	ν_{as} PO ₂	ν_s PO ₂ + ν C-O-PO ₂
Modèle membrane Contrôle	1,72	0,74	1	0,39	0,73	1,18
Modèle membrane + TPP(<i>p</i> DEGMan) ₃	1,54	0,64	1	<i>0,51</i>	0,74	<i>1,27</i>
Modèle membrane +TPP <i>m</i> OH ₄	1,56	0,69	1	<i>0,57</i>	0,64	<i>1,28</i>
Modèle mitochondrie Contrôle	1,8	0,73	1	0,35	0,66	1,05
Modèle mitochondrie + TPP(<i>p</i> DEGMan) ₃	1,29	0,64	1	<i>0,46</i>	<i>0,71</i>	<i>1,23</i>
Modèle mitochondrie +TPP <i>m</i> OH ₄	1,51	0,68	1	<i>0,49</i>	0,61	<i>1,28</i>

Comme il a été démontré par les loading des ACP, la variation la plus importante induite par la présence des TPP se situe plus au niveau du groupement du CH₂, qu'à celui du groupement PO₂. La ν_{as} PO₂ est plus affectée par l'ajout de TPP*m*OH₄ que de TPP(*p*DEGMan)₃.

Il est à noter que bien que les deux porphyrines diminuent l'aire de la bande ν_{as} CH₂, cette diminution est plus importante dans le cas du modèle mitochondrie + TPP(*p*DEGMan)₃. Ceci justifie bien la différence entre les PC2 dans la figure 3.20 b.

Ces résultats sont bien en accord avec ceux des spectres de différences (non représentés dans ce manuscrit) mais qui ont démontré aussi une augmentation de la bande ν_{as} CH₃ et ν_s CH₃.

*En conclusion, la composition lipidique des deux modèles est très similaire en terme de vibrations en moyen infrarouge. Les deux porphyrines ajoutées semblent interagir de la même manière, une interaction qui se situe principalement au niveau de la chaîne aliphatique des phospholipides. La TPP*m*OH₄ interagit plus avec le groupement PO₂ que la TPP(*p*DEGMan)₃ et cette dernière a un effet assez remarquable sur la ν_{as} CH₂ en présence de cardiolipine.*

8.3. Discussion de l'étude d'interaction porphyrines-lipides synthétiques.

Les techniques DSC et IR ont permis l'étude de l'interaction des porphyrines avec des lipides synthétiques. Les données obtenues par ATR-FTIR ont été plus difficiles à exploiter, en raison de l'humidité relative qui variait entre 7% et 14% et qui, malgré le temps relativement long d'attente avant l'analyse, ne permettaient pas d'atteindre un niveau élevé de déshydratation de l'échantillon. Les expériences au synchrotron SOLEIL, réalisés sur des échantillons déshydratés ont mieux permis de tirer des conclusions concernant cette interaction. En présence de la SOPC seule, nous avons pu mettre en évidence une interaction au niveau du groupement PO₂ de la tête polaire et de la chaîne aliphatique, avec, en plus, une interaction propre de TPPmOH₄ au niveau du C=O (glycérol).

La bande $\nu_{as}PO_2$ est assez dépendante de l'hydratation. Selon certaines études, elle peut passer de 1260 cm⁻¹ à 1230 cm⁻¹ dans des conditions variant entre 0 et 100% d'humidité relative. La bande ν_sPO_2 est principalement sensible au changement de la conformation du groupement PO₂ et légèrement à la présence de molécules d'eau (Pohle et al., 2001).

Au niveau des phases lamellaires constituées par les mélanges lipidiques, ce sont surtout les déplacements des bandes $\nu_{as}CH_2$ et ν_sCH_2 qui ont été mis en évidence en présence des porphyrines, traduisant l'interaction de ces dernières avec les chaînes aliphatiques des phospholipides. En revanche, contrairement à ce qui avait été observé avec SOPC pure, nous n'avons pas vu d'interaction entre les porphyrines et les groupements PO₂ du mélange de phospholipides. Il faut rappeler que nous avons remarqué une différence au niveau des vibrations du groupement PO₂ entre ces mélanges et la SOPC pure. Ces résultats suggèrent une certaine organisation des lipides (éventuellement en domaines) dans les phases lamellaires hétérogènes, avec peut-être un positionnement différent des groupements phosphate, les rendant moins accessibles aux porphyrines. En analysant de plus près les données de la littérature, il est possible de trouver plusieurs études qui ont décrit la structure des systèmes binaires lipidiques. Ces études concluent entre autres que : (1) la répulsion latérale dans un modèle de lipide homogène entre les molécules de PC est plus élevée que celle entre les molécules de PE (Mingins et al., 1992) ; (2) un système binaire constitué de CL et PE présente l'existence de certains domaines soit enrichis en PE pure ou enrichis en PE-CL (Lupi et al.2008) ; (3) la cardiolipine possède une structure formée d'une « petite » tête polaire commune entre deux chaînes de PA chaînes. Elle est donc de conformation plus immobile que les autres phospholipides et interagit peu avec les autres phospholipides au niveau de sa tête polaire. Ceci laisse cette dernière plus accessible à l'eau et à d'autres

molécules (Lewis & Mcelhaney, 2009) ; (4) quant au cholestérol, il interagit fortement avec les phospholipides principalement au niveau du glycérol (Arzov & Quaroni 2007) ; enfin, il est aussi possible d'envisager des interactions fortes au niveau des groupements anioniques des lipides chargés (SOPS et CL). De ce fait, si la majorité des interactions se produisent au niveau des phospholipides, les molécules de porphyrines vont plutôt interagir avec les chaînes aliphatiques, plus accessibles.

En conclusion, les interactions chimiques avec les phospholipides varient selon qu'il s'agit de phases lamellaires homogènes ou hétérogènes.

8.4. Analyse, par microspectroscopie infrarouge couplée au Synchrotron, des cellules traitées par les porphyrines.

*Trois lignées cellulaires ont été traitées par des porphyrines. Afin de simplifier, nous désignerons autrement les cellules traitées : par exemple les cellules Y79 traitées par TPP(pDEGMan)₃ seront désignées par **Y79 Deg Man** et celles traitées par TPP(pDEG-OH)₃ seront désignées par **Y79 Deg OH**. Cette dernière étant pour la première fois mentionnée dans ce manuscrit, sa structure figure dans le tableau des annexes A3.01.*

Les porphyrines synthétisées ont été évaluées pour la plupart *in vivo* en terme de phototoxicité, de photoefficacité, de capture cellulaire, et de localisation subcellulaire. Néanmoins, une question se pose toujours sur leur interaction avec la membrane cellulaire et les membranes d'autres organelles. La TPP(pDEGMan)₃ a montré une meilleure phototoxicité et capture, comparée à d'autres molécules glycoconjuguées (Laville et al., 2006). Nos travaux ont été réalisés afin de mettre en évidence le rôle joué par le sucre porté à l'extrémité de l'espaceur : nous avons donc comparé TPP(pDEGMan)₃ avec un témoin négatif, TPP(pDEG-OH)₃. Les résultats de Laville et al. (2006), ont montré une capture cellulaire de $0,78 \times 10^{-6}$ nmol/cellule pour les cellules traitées par $4\mu\text{M}$ de TPP(pDEGMan)₃ contre $0,26 \times 10^{-6}$ nmol/cellule pour les cellules traitées par TPP(pDEG-OH)₃. L'évaluation de l'activité phototoxique a démontré que l'IC₅₀ de la TPP(pDEGMan)₃ est $> 10\mu\text{M}$ à l'obscurité et égale à $0,35\mu\text{M}$ après traitement par la lumière (514 nm) (Maillard et al., 2007). Ces travaux ont aussi démontré une faible photocytotoxicité de la TPP(pDEG-OH)₃. En effet, les cellules sont vivantes à 100% avec une dose de $2\mu\text{M}$ (Laville et al., 2006). En tenant compte de ces

informations et de l'expérience du Dr Poyer dans l'étude de la phototoxicité des porphyrines, il a été décidé de fixer la dose de traitement des cellules analysées dans cette partie à 5 μ M.

Dans la continuité de ces travaux, il a été décidé d'étudier par IR l'interaction des TPP avec les cellules de rétinoblastome.

Les spectres enregistrés peuvent être assimilés à la moyenne du contenu d'une cellule. Pour les cellules Y79 et WERI-Rb1, en raison de leur petite taille, il était difficile de distinguer leur noyau du cytoplasme, contrairement aux cellules ARPE-19.

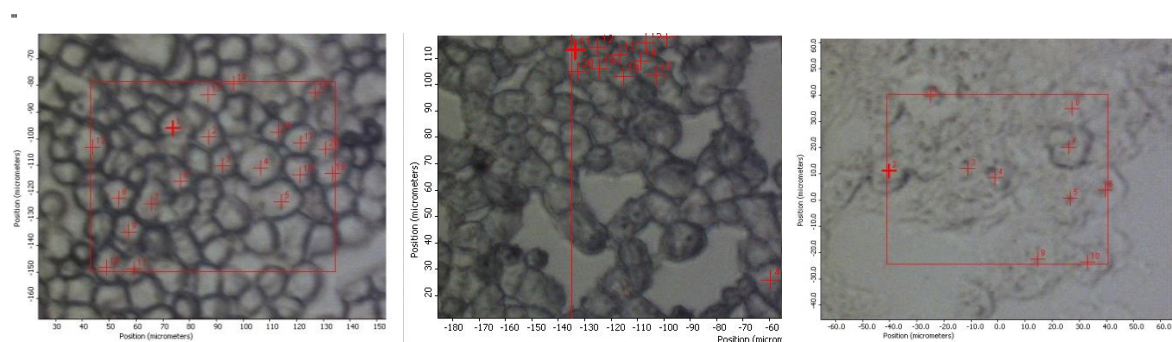


Figure 3.22 : Les cellules Y79, WERI-Rb1 et ARPE-19 (de gauche à droite) observées par un spectromètre FT-IR équipé d'un microscope CONTINUUM XL sur la ligne SMIS du Synchrotron SOLEIL (objectif x32).

8.4.1. Correction de l'effet Mie

L'examen des spectres montre une distorsion de la ligne de base entre 1600-2800 cm^{-1} sans déplacement de la bande amide I. Afin de s'assurer de l'absence de la diffusion Mie, nous avons utilisé le logiciel Unscrambler® qui permet d'afficher la figure « scatter effect ». Un graphe comparable à celui de l'annexe A 3.01c (page 195) était obtenu par une simple correction linéaire de ligne de base suivie d'une EMSC. Au regard de ce résultat, il a été décidé de ne pas corriger la diffusion de Mie afin de ne pas induire des modifications sur les données et ce, d'autant plus que les spectres obtenus après prétraitement étaient acceptables. Par ailleurs, comme les spectres ont été enregistrés sur des amas cellulaires et non des cellules isolées, nous supposons que nous avons évité considérablement l'effet de diffusion de la lumière.

8.4.2. Analyse multivariée des données spectrales des cellules

Après un lissage, une correction linéaire de la ligne de base, une normalisation sur la gamme spectrale suivie d'un EMSC sur tous les spectres, nous avons procédé à l'analyse multivariée. Pour simplifier l'interprétation des résultats, certaines bandes n'ont pas été incluses dans le jeu de données.

- La bande OH (dans la zone $4000-3001\text{ cm}^{-1}$) n'a pas été considérée car elle est associée principalement à la quantité de l'eau.
- La zone de $2789-1771\text{ cm}^{-1}$ a été supprimée pour sa non –signification biologique.
- La zone de $980-800\text{ cm}^{-1}$ a été aussi supprimée pour sa faible transmission à travers la lame CaF_2 .

Ainsi les zones retenues sont : $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ et $1770-989\text{ cm}^{-1}$.

L'attribution des bandes est réalisée à partir du tableau 3.01 du paragraphe 7 de ce chapitre (page 142).

8.4.2.1. Discrimination entre les lignées cellulaires :

Les spectres des 3 lignées cellulaires témoins ont été prétraités en suivant les étapes suivantes : lissage (20 points), correction de la ligne de base linéaire, normalisation sur la totalité de la gamme spectrale et finalement la correction EMSC (Extended Multiplicative Signal Correction). Les spectres moyens de chaque groupe de cellules ont été calculés (Fig.3.23).

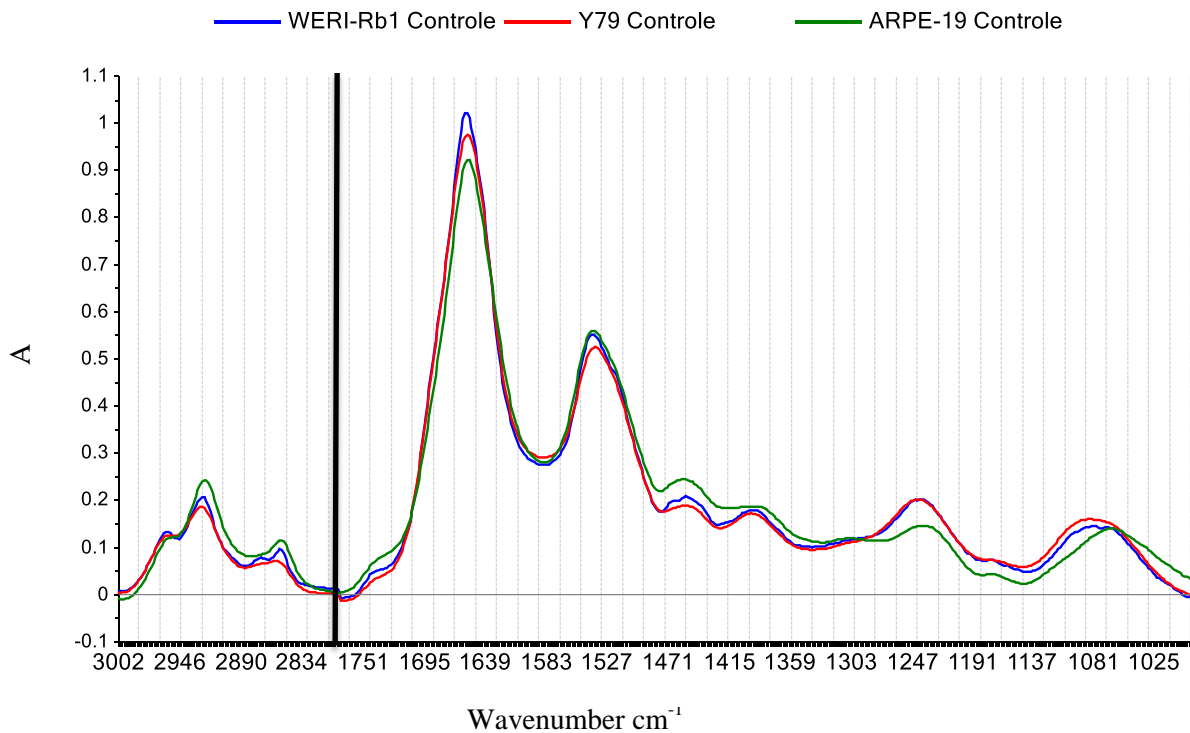


Figure 3.23 : Spectre moyens des trois lignées cellulaires non traitées.

L'analyse en composantes principales (ACP) des spectres obtenus montre une nette séparation entre les spectres de la lignée ARPE-19 et ceux des lignées du rétinoblastome (Y79 et WERI-Rb1) en fonction des composantes principales PC1 (55%) et PC2 (18%) (fig.3.24).

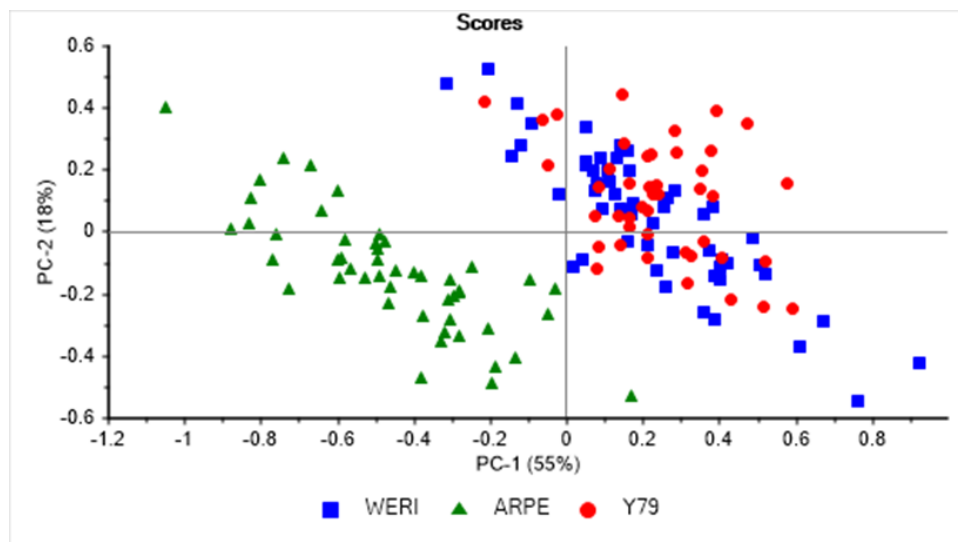


Figure 3.24: Analyse en composantes principales des spectres prétraités des différentes lignées cellulaires

L'affichage des « loading » des PC1 et PC2 permet de mettre en évidence les bandes discriminantes (figure 3.25, tableau 3.11).

Les comparaisons spectrales montrent des différences principalement sur la structure secondaire des protéines (bandes Amide I). Les positions exactes reflètent l'implication des hélices α dans la discrimination entre les lignées. D'un autre côté, il est possible d'observer une différence au niveau des lipides (bandes spécifiques des CH₂ (symétriques et asymétriques) et des acides nucléiques.

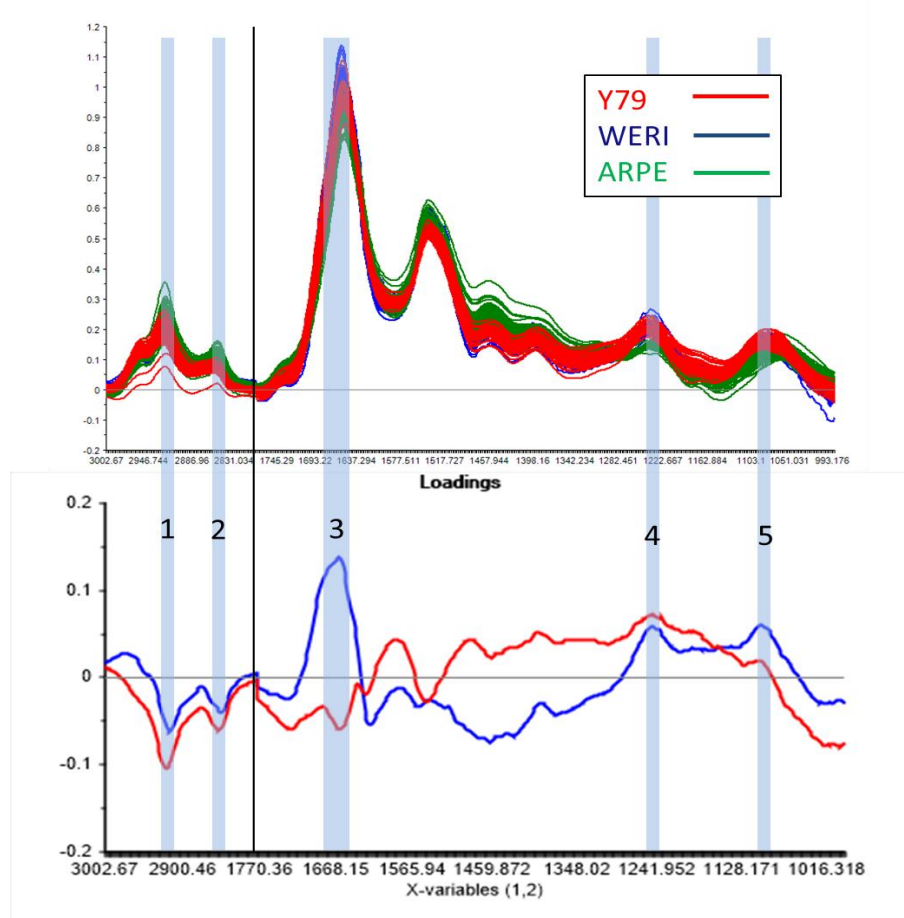


Figure 3.25 : (a). Les spectres des lignées ARPE-19, Y79 et WERI-Rb1. (b). Loading des PC1 et PC2

Tableau 3.11 : Attribution des bandes discriminantes entre les cellules Y79, WERI-Rb1 et ARPE-19.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attribution	Analyse *
1 = 2923	ν_{as} (C-H) de CH ₂ des lipides	+ ARPE-19
2 = 2855	ν_s (C-H) de CH ₂ des lipides	+ ARPE-19
3 = 1660	Amide I Hélice α des protéines	+ WERI-Rb1 et Y79
4 = 1247	ν_{as} PO ₂ ⁻ de l'acide nucléique	+ WERI-Rb1 et Y79
5 = 1080	ν PO ₂ ⁻ de l'acide nucléique	+ WERI-Rb1 et Y79

* Cette analyse n'est pas une interprétation biologique mais une meilleure visualisation des résultats de l'ACP.

Afin de mettre en évidence de possibles différences entre les deux lignées du rétinoblastome, nous avons calculé une ACP uniquement sur les lignées WERI-Rb1 et Y79.

Les spectres des deux lignées montrent de grandes similitudes et l'observation directe ne permet pas de trouver des différences significatives. L'analyse en composantes principales ne permet pas une séparation directe en se basant sur les 5 premières composantes. Cependant, l'observation de la répartition en fonction de la PC6 (3%) permet une discrimination (fig. 3.26).

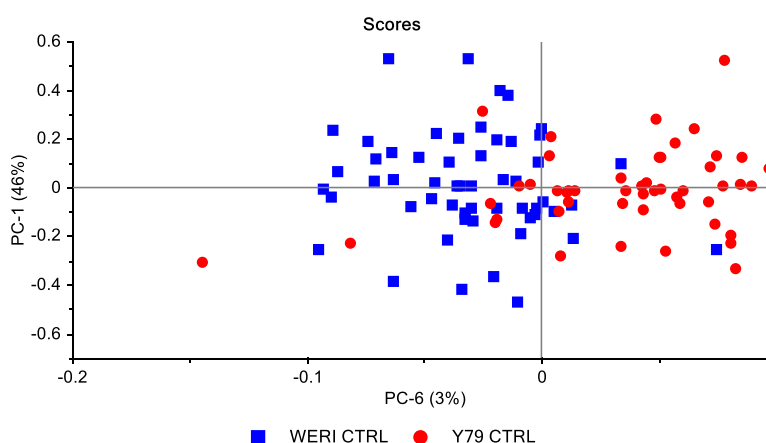


Figure 3.26 : Scores plot des cellules WERI-Rb1 et Y79

Nous avons eu recours à une analyse multivariée supervisée afin d'expliquer cette variation spectrale. La PLS-DA (Partial Least Square Discriminant Analysis) est une approche qui permet de mieux visualiser les variances inter-classes avec une désignation préalable des

classes. Trois PLS-DA ont été calculées, la première en divisant les données en cellules cancéreuses et non cancéreuses, par la suite en considérant les trois ensembles et finalement en travaillant sur les lignées du rétinoblastome, Y79 et WERI-Rb1, uniquement.

- Analyse discriminante entre les cellules selon le caractère tumoral

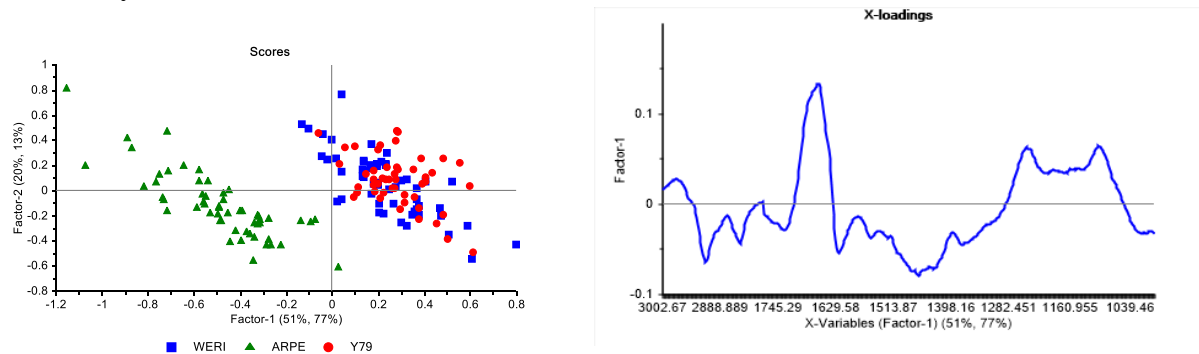


Figure 3.27 : PLS-DA sur deux catégories les cellules cancéreuses et non cancéreuses.

Ce résultat confirme ce qui a été conclu dans la première ACP (fig 3.24 et 3.25). Les deux premiers facteurs de discrimination expliquent 90% de la variation (facteur-1 77% et facteur 2 13%). Selon le poids des valeurs de régression, la différence entre les lignées tumorales et saine se situe au niveau des protéines, puis des acides nucléiques et une variation moins faible est due aux lipides.

Le rapport CH_3/CH_2 a été calculé pour les différentes lignées. En effet, les bandes à 2945 et 2852 cm^{-1} (élongations asym et sym des CH_2) sont principalement associées aux lipides, et les bandes CH_3 (élongations asym et sym) sont associées aux protéines. Ce rapport était le plus faible pour les cellules ARPE-19 (0,20) vs 0,45 et 0,27 pour WERI-Rb1 et Y79 respectivement. Ce qui traduit une augmentation des protéines dans les cellules de rétinoblastome, ceci est en corrélation avec la littérature. Par ailleurs, et en examinant les spectres moyens figure 3.23, nous remarquons un élargissement des bandes 1088 et 1250 cm^{-1} pour les cellules tumorales avec une intensité plus élevée de ces bandes. Elles correspondent à la vibration de PO_2 des acides nucléiques. Ce résultat est en accord avec la littérature (Rehman et al., 2013), et cette intensité élevée de ces bandes correspond à une activité mitotique élevée dans les tissus et les cellules tumorales.

- Analyse discriminante entre les trois lignées cellulaires

La PLS-DA ne peut pas être retenue dans ce cas, car non seulement la PC1 explique 40% de la variance, mais il faut 6 composantes pour expliquer 90% de la variance par un modèle représentant la variance entre 3 variables seulement (« sur-modélisation »).

- Analyse discriminante entre les deux lignées cellulaires tumorales

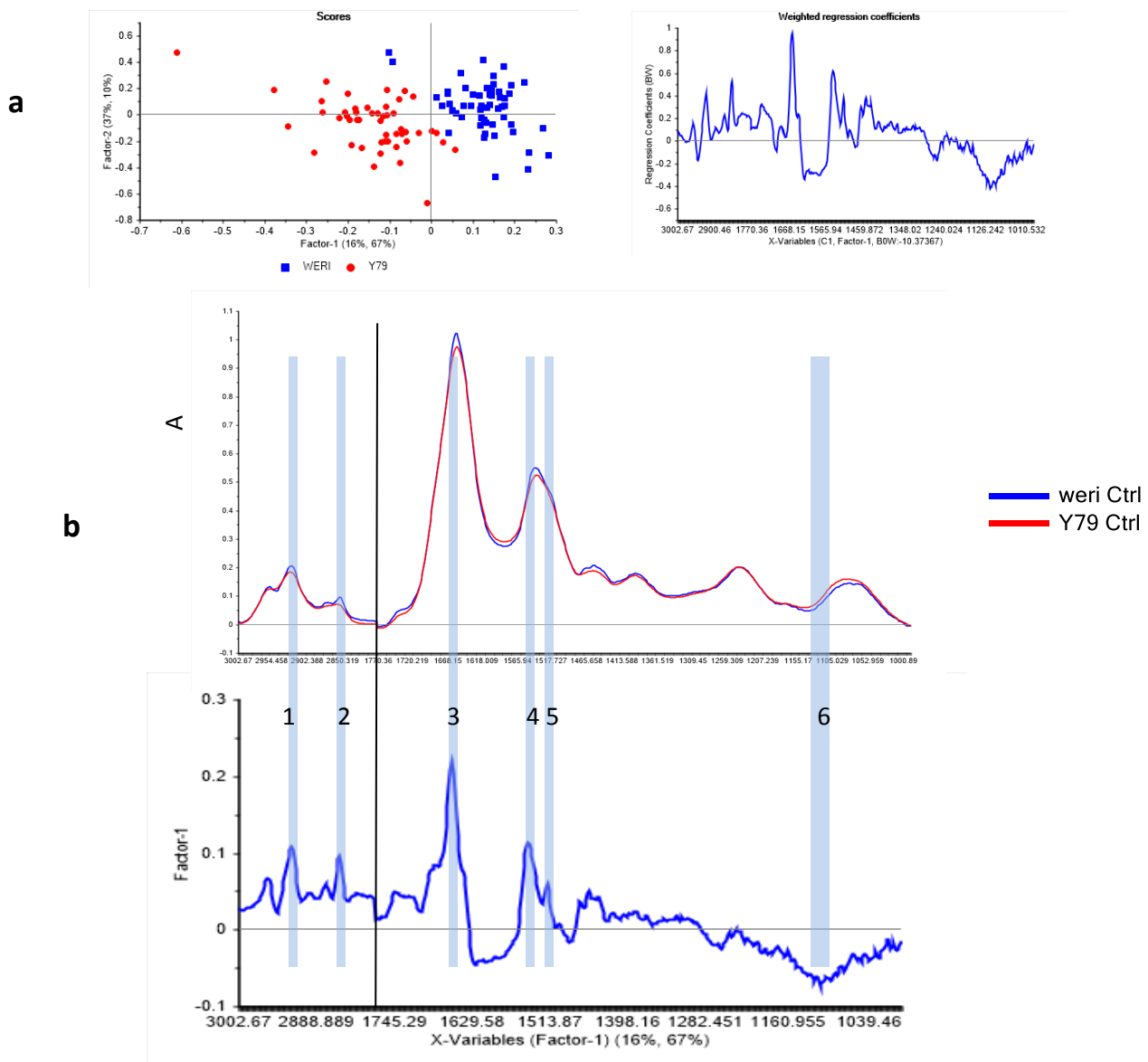


Figure 3.28 PLS-DA : (a) graphe des scores, (b) spectres moyens de Y79 et WERI-Rb1 contrôle, avec le facteur 1 discriminant.

Pour cette analyse, le jeu de données ne contient que les spectres des lignées cellulaires tumorales. Les deux facteurs principaux facteurs 1 et 2 modélisent 77% de la variance, ce qui est acceptable et explique le choix de la PLS-DA qui réussit à expliquer une variance subtile de 3% au niveau de la PCA de la figure 3.26. Le facteur 1 explique principalement une variance au niveau des bandes amide I et II (figure 3.28) les bandes discriminantes ont été attribuées dans le tableau 3.12.

Tableau 3.12: Attribution des bandes discriminantes entre les cellules Y79 et WERI-Rb1. * Cette analyse n'est pas une interprétation biologique mais une meilleure visualisation des résultats de l'ACP.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attribution	Analyse*
1 = 2923	ν_{as} (C-H) de CH ₂ des lipides	+ WERI-Rb1
2 = 2852	ν_s (C-H) de CH ₂ des lipides	+ WERI-Rb1
3 = 1654	Amide I Hélice α des protéines	+ WERI-Rb1
4 = 1544	Amide II Feuillet β : chaînes antiparallèles des protéines	+ WERI-Rb1
5 = 1515	Amide II Hélice α des protéines	+ WERI-Rb1
6 = 1105	ν (P=O) des acides nucléiques	+ Y79

Les spectres moyens révèlent aussi que toutes les bandes discriminantes au niveau des lipides ou protéines sont plus intenses dans les cellules WERI-Rb-1. Le rapport des aires CH₃/CH₂ est égal à 0,27 pour les Y79 et 0,45 pour les cellules WERI-Rb-1. Selon ce rapport, les cellules WERI-Rb1 semblent être deux fois plus riches en protéines que les cellules Y79 et 1,5 fois plus riches en lipides.

L'observation détaillée des bandes Amide I et II montre des différences qui peuvent être associées comme suit : légère augmentation des feuillets β antiparallèles de l'amide I et des hélices α des deux amides dans la lignée WERI-Rb1.

En conclusion, les résultats de l'analyse des cellules témoins sont en accord avec la littérature. Les cellules cancéreuses contiennent plus des protéines, ont une activité mitotique élevée et une concentration plus faible de lipides, comparées aux cellules saines.

La deuxième étape de l'étude consiste à mettre en évidence les variations potentielles dues à l'ajout de la porphyrine dans le milieu de culture avant la fixation de cellules.

8.4.2.2. Cellules Y79

Une ACP sur les données des cellules Y79 non traitées et traitées par l'une de TPP a été calculée (fig 3.29).

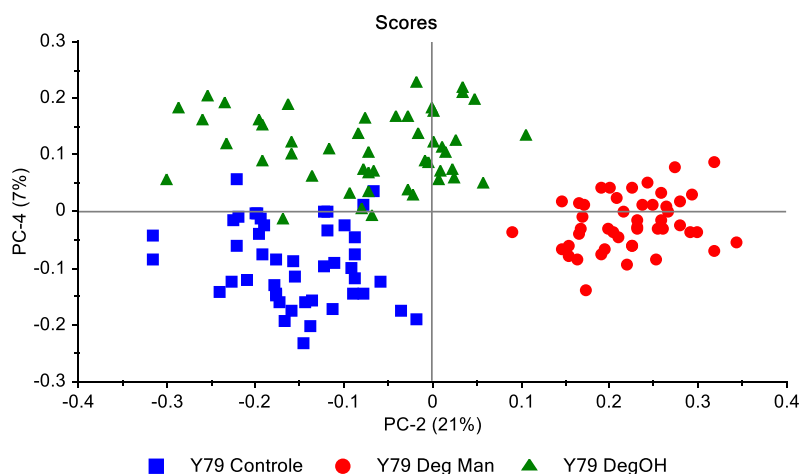


Figure 3.29 : ACP sur les spectres de la lignée Y79 : non traitées (Contrôles), traitées par TPP(*p*-DEG-OH)₃ et traitées par TPP(*p*-DEGMan)₃

La figure 3.29 montre une séparation entre les différents traitements des cellules Y79 en fonction des PC2 et PC4. Or, ces deux composantes n'expliquent que 22% de la variation. On procède donc à une PLS-DA (figure 3.30).

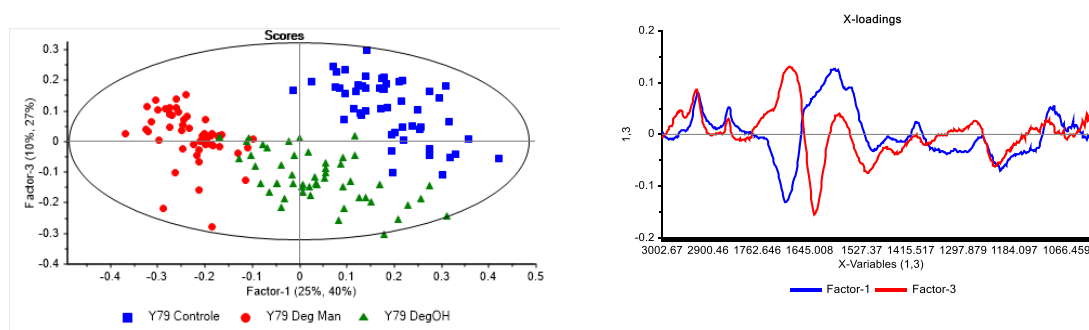


Figure 3.30 : PLS-DA sur les cellules Y79 traitées et non traitées.

Trois facteurs expliquent la variabilité de la matrice des catégories à 80% à savoir facteur 1 (40%) facteur 2 (14%) et facteur 3 (27%). La meilleure séparation est donc obtenue par les facteurs 1 et 3. En effet, le facteur 1 discrimine les cellules traitées par la TPP(*p*DEGMan₃) des cellules contrôles. Quant au facteur 3, il discrimine les cellules Y79-TPP(*p*DEGOH)₃ des cellules contrôles. Les bandes discriminantes ont été identifiées et résumées dans la figure 3.31 et le tableau 3.13.

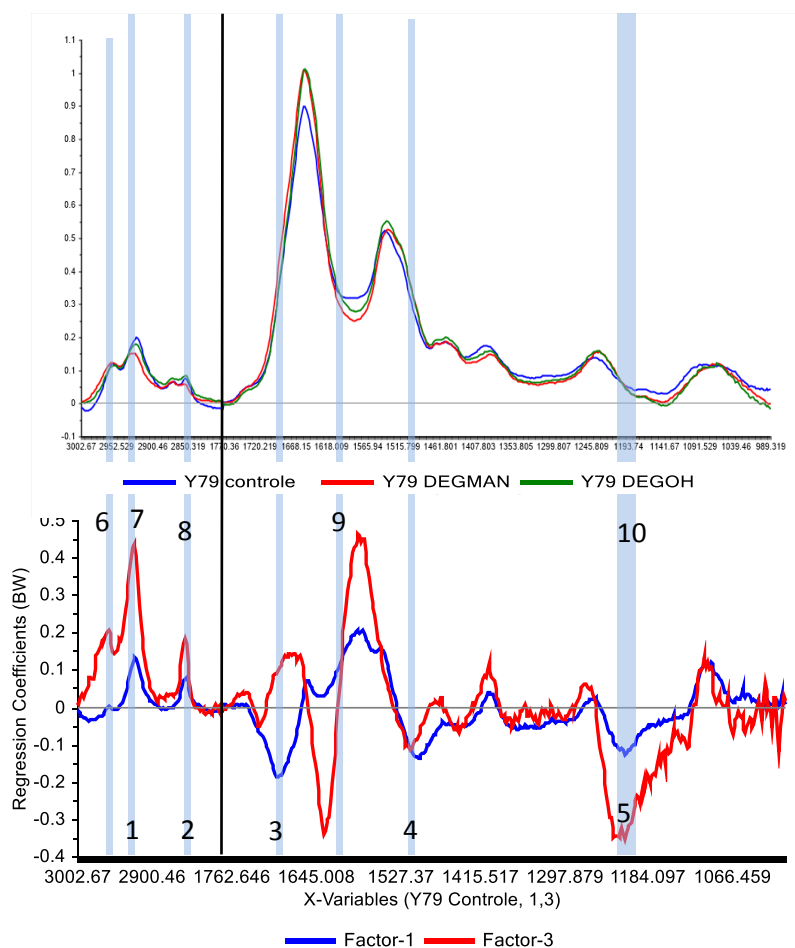


Figure 3.31 : Spectres moyens des cellules Y79 traitées et non traitées, Facteurs 1 et 3 de la PLS-DA.

Tableau 3.13 : Attribution des bandes discriminantes entre les cellules Y79 selon PC2

	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attribution
Facteur 1		
1	2921	ν_{as} (C-H) de CH ₂ des lipides
2	2848	ν_s (C-H) de CH ₂ des lipides
3	1693	Amide I : feuillet β : chaînes parallèles des protéines
4	1502	Variation de la fréquence de la limite de la bande Amide II : Ce qui permet de supposer un déplacement de cette bande suite au traitement
5	1213	ν_{as} (P=O) des acides nucléiques
Facteur 3		
6	2958	ν_{as} (C-H) de CH ₃
7	2921	ν_{as} (C-H) de CH ₂ des lipides
8	2848	ν_s (C-H) de CH ₂ des lipides
9	1631	Variation de la fréquence de la limite supérieure de la bande Amide I
10	1213	ν_{as} (P=O) des acides nucléiques

Selon ces résultats, les deux porphyrines semblent avoir un effet sur les chaînes aliphatiques des lipides, les protéines et l'ADN. Toutefois, l'effet le plus prononcé est observé en présence de TPP(*p*-DEGOH)₃ selon le graphe du poids des coefficients de régression. L'interaction au niveau de la tête polaire, si elle existe, ne peut pas être déterminée car les vibrations $\nu_{as/s}$ PO₂ chevauchent celles des amides I et II. Par ailleurs, la dérivée seconde sur zone de la bande amide I et II des spectres ne fournit pas une information supplémentaire (figure de l'annexe A3.05 page 197).

8.4.2.3. Cellules WERI-Rb1

Pour les cellules WERI-RB-1, nous avons procédé de la même manière au pré-traitement des spectres. L'ACP (figure 3.32) ne permet pas de séparer les cellules.

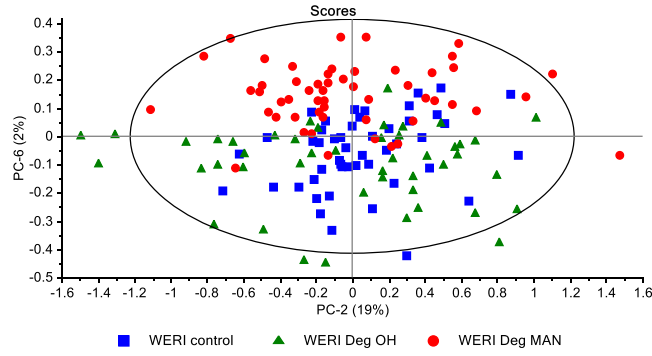


Figure 3.32 : ACP sur les spectres de la lignée WERI-Rb-1 : contrôle, traitées par TPP(*p*-DEG-OH)₃ et traitées par TPP(*p*-DEGMan)₃

Une PLS-DA a aussi été calculée, mais nous n'avons pas réussi à obtenir une bonne séparation des cellules WERI-Rb-1 selon la TPP rajoutée. En effet, la PLS-DA ne converge pas à la PC3 et les deux premiers facteurs de la variabilité des échantillons ne sont expliqués que par 30%, ce qui est assez faible. Ce résultat est tout de même surprenant car les deux lignées de cellules cancéreuses WERI-Rb1 et Y79 répondent habituellement de la même façon au traitement par PDT (données non publiées). Nous nous attendions donc à une interaction similaire.

8.4.2.4. Cellules ARPE-19

Le même pré-traitement a été appliqué aux spectres des cellules ARPE-19. La toute première ACP séparant les cellules est celle de PC2 qui explique 21% de la variance et PC6 (très faible) (figure 3.33).

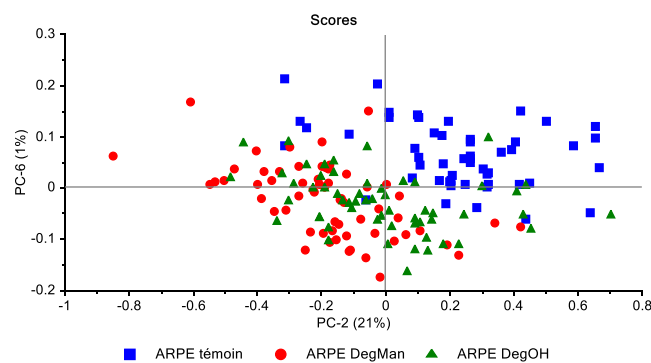


Figure 3.33 : ACP sur les spectres de la lignée ARPE-19 : contrôle, traitées par TPP(*p*-DEG-OH)₃ et traitées par TPP(*p*-DEGMan)₃

Afin de pouvoir mieux visualiser ces différences, si vraiment elles existent, une bonne séparation pourrait être obtenue par une PLS-DA. Mais les résultats de cette analyse supervisée, ne discriminent pas les trois échantillons, ce qui laisse penser que les porphyrines n'interagissent pas du tout ou pas assez avec la structure cellulaire.

8.4.2.5. Comparaison de toutes les lignées traitées et non traitées

Tout comme les lignées cellulaires contrôles (fig 3.24), les cellules ARPE-19 traitées ou non traitées sont distinguées de deux autres lignées cancéreuses (traitées et non traitées) Ce résultat est attendu, car l'effet de l'ajout d'une porphyrine quelle qu'elle soit n'est pas très prononcé ni assez clair sur les spectres infrarouge pour une même lignée traitée ou non traitées.

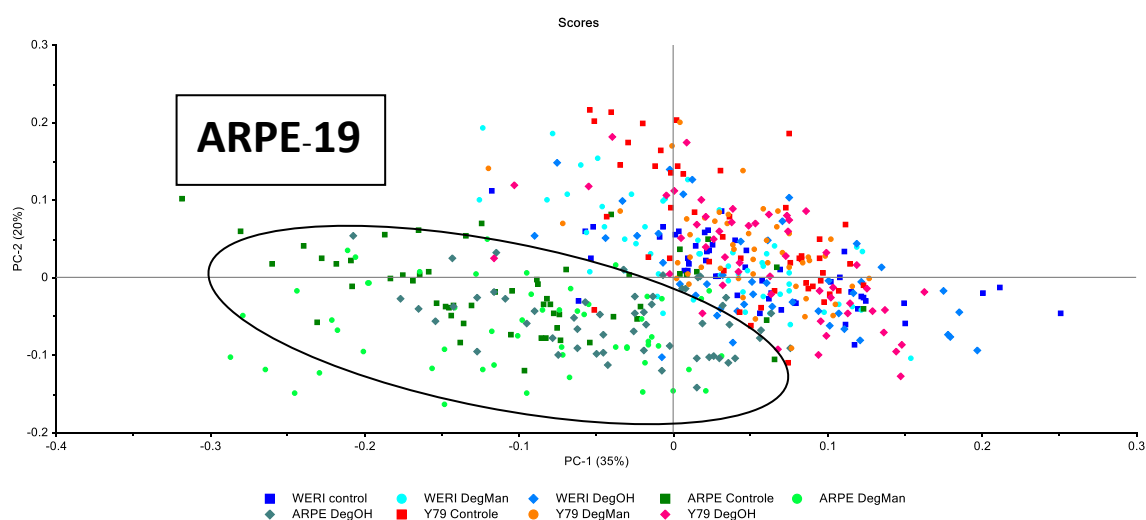


Figure 3.34 : ACP sur toutes les lignées cellulaires traitées et non traitées.

8.4.3. Discussion

La spectroscopie infrarouge est largement utilisée dans le domaine biomédical et le diagnostic des maladies. L'un des avantages de cette technique est qu'elle permet de détecter les changements chimiques accompagnant toute modification morphologique au niveau des cellules dans le cas d'une maladie. L'IR a par exemple été utilisée pour distinguer entre des

tissus sains et des tissus tumoraux, dans le cas de cancer de sein (Walsh et al., 2012), de la prostate (Baker et al., 2009), du colon (Wolthuis et al., 2008) et du poumon (Bird et al., 2012).

Dans ce chapitre, l'IR a été utilisée afin de tenter de localiser les porphyrines au niveau des cellules cancéreuses et saines dérivées de la rétine et de préciser le type d'une éventuelle interaction.

En se basant sur la capacité de l'IR à révéler les différences de la composition et de la structure des lipides, des protéines et des acides nucléiques, nous avons mis en évidence une différence entre une lignée cellulaire saine d'une part, et les deux autres lignées cancéreuses d'une autre part. Il est important de rappeler que les lignées Y79 et WERI-Rb1 sont des cellules tumorales dérivées des photorécepteurs (origine neurale), tandis que les cellules ARPE-19 proviennent de l'épithélium pigmentaire rétinale sain. La différence d'origine des tissus peut très bien jouer sur les résultats en IR, mais aucune autre lignée cellulaire provenant de la rétine, et saine, n'est commercialement disponible. En examinant le rapport CH_3/CH_2 traduisant le rapport protéines/lipides, nous avons remarqué une concentration plus élevée de protéines dans les lignées cancéreuses par rapport à la lignée de cellules ARPE-19. De plus, l'exploitation de la zone spectrale 990-1450 cm^{-1} qui est caractérisée particulièrement par les déformations asymétriques et symétriques des groupements PO_2^- des acides nucléiques (ADN et ARN, respectivement vers 1088 et 1250 cm^{-1}) a démontré une intensité plus élevée au niveau des cellules cancéreuses. Ces vibrations ont été considérées comme un marqueur de la présence de la tumeur (Lasch et al., 2004) qui s'explique par une activité mitotique importante. En tenant compte de nos résultats qui sont en corrélation avec les données de la littérature (en terme de taux de protéines et d'activité mitotique), les cellules ARPE-19 peuvent potentiellement être utilisées comme témoins négatifs dans les expériences. Les différences trouvées avec les cellules tumorales sont sans doute davantage liées à l'état de cancer qu'à l'origine du tissu.

Les cellules de rétinoblastome WERI-Rb1 et Y79 sont, d'une manière générale, très comparables du point de vue de leur composition chimique. Ceci a été démontré par l'ACP dans la figure 3.26. Néanmoins, les différences subtiles qui ont pu être mises en évidence par la PLS-DA et le rapport CH_3/CH_2 calculé, qui était plus élevé pour les cellules WERI-Rb1 que pour les Y79, nous permettent de suggérer que les cellules WERI-Rb1 sont plus riches en lipides et en protéines que les cellules Y79.

Traitées par la TPP(*p*DEGMan)₃ et la TPP(*p*DEGOH)₃, les cellules Y79 ont pu être discriminées et les variations au niveau de certaines bandes ont pu être expliquées. Cependant, les cellules WERI-Rb1 n'ont pas pu être distinguées, ni en fonction de la présence de la porphyrine, ni en fonction de la nature de cette porphyrine. Ce résultat est assez surprenant car les deux lignées répondent de la même manière vis-à-vis de la PDT. Afin d'éliminer l'hypothèse que ceci soit dû à notre pré-traitement, et par conséquent, à la qualité de nos spectres avant l'analyse multivariée, une autre méthodologie a été également appliquée. Un second pré-traitement qui consiste en une dérivée seconde, suivie d'une normalisation vectorielle, a été effectué de la même manière pour les deux lignées cellulaires. Les résultats des ACP sont similaires à ceux précédemment obtenus. Autrement dit, aucune séparation des cellules WERI-Rb-1 n'a pu être obtenue. Il serait intéressant de refaire les expériences pour vérifier s'il s'agit pas d'un problème au moment de la préparation des cellules (nombre de passages (« âge ») des cellules ...) ou de la dose utilisée tout simplement (qui pourrait être trop faible si la capture cellulaire est limitée).

Une bonne discrimination des cellules Y79, selon la TPP rajoutée, a été obtenue avec ce deuxième pré-traitement des spectres. Les composantes principales retenues PC1 et PC3 expliquent 58% de la variance. Tout comme cela a été conclu au paragraphe précédent, les deux porphyrines interagissent avec les bandes amides I et II des protéines, mais la TPP(*p*DEGOH)₃ semble interagir plus fortement avec les chaînes aliphatiques des lipides. Il est à noter que l'effet sur les acides nucléiques est négligeable par rapport aux interactions avec les autres composants (lipides et protéines). Des travaux avaient démontré que la capture cellulaire est de $0,78 \cdot 10^{-6}$ nmol/cellule pour les cellules Y79 traitées par 4 μ M de TPP(*p*DEGMan)₃ contre $0,26 \cdot 10^{-6}$ nmol/cellule pour les cellules Y79 traitées par TPP(*p*DEGOH)₃ (Laville et al., 2006). Par conséquent, il est possible que les effets sur les protéines et les lipides soient observés même à très faibles doses (dose réelle au niveau de la cellule).

Pour les cellules ARPE-19, aucune séparation entre les cellules traitées et non traitées n'a pu être observée. Pourtant, rien n'empêcherait une interaction de type non spécifique sauf si la dose de porphyrines mise en contact avec les cellules était trop faible pour ces expériences.

En conclusion, toutes les cellules ont été traitées avec des doses de 5 μ M de porphyrines, ce qui semble être insuffisant pour une évaluation de l'internalisation de la porphyrine par IR, ce

qui explique les trop faibles variations observées entre les cellules traitées et non traitées (figure 3.34).

9. Références bibliographiques :

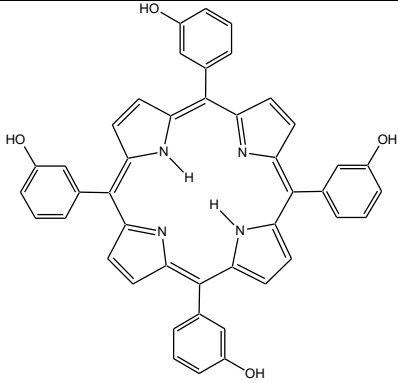
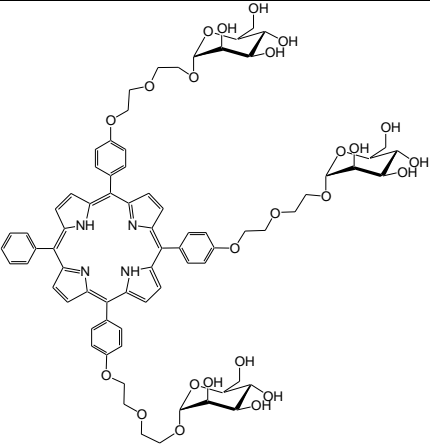
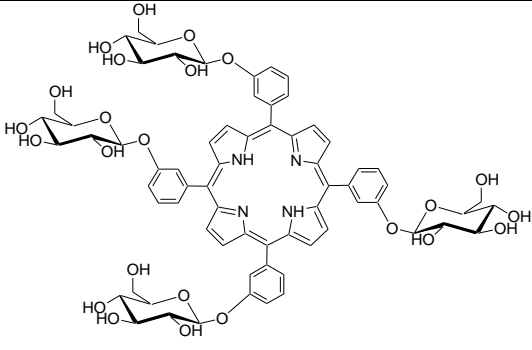
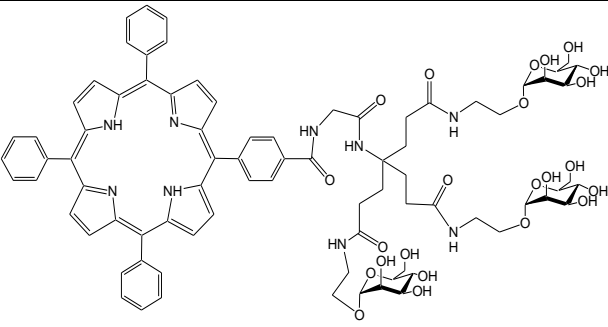
- Akutsu H., Kyogoku Y., Infrared and Raman spectra of phosphatidyl-ethanolamine and related compounds. *Chem.Phys.Lipids* 14(1975) 113–122.
- Arsov Z., Quaroni L., Direct interaction between cholesterol and phosphatidylcholines in hydrated membranes revealed by ATR-FTIR spectroscopy. *Chem.Phys.Lipids* 150(2007)35-48
- Baker M.J., Gazi E., Brown M.D., Shanks J.H., Clarke N.W., Gardner P., Investigating FTIR based histopathology for the diagnosis of prostate cancer. *J.Biophotonics* 2(2009)104–113.
- Bird B., Miljković M., Remiszewski S., Akalin A., Kon M., Diem M., Infrared spectral histopathology (SHP): a novel diagnostic tool for the accurate classification of lung cancer. *Lab Invest.* 92(2012)1358–1373.
- Brumfeld V., Bach D., Miller I.R., Fourier transform infrared spectroscopy of aqueous dispersions of phosphatidylserine-cholesterol mixtures. *Eur Biophys J.* 19(1991) 287–293.
- Casal H.L., Mantsch H.H., Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 779(1984)381–401.
- Choi S., Ware W.J., Lauterbach S.R., Phillips W.M., Infrared Spectroscopic Studies on the Phosphatidylserine Bilayer Interacting with Calcium Ion: Effect of Cholesterol. *Biochemistry* 30(1969) 8563–8568.
- Crowe L.M., Crowe H.J., Solution effects on the thermotropic phase transition of unilamellar liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1064 (1991) 267-274.
- Desroches M.C., Kasselouri A., Meyniel M., Fontaine P., Goldmann M., Prognon P., Maillard P., 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 (2004) 11698 - 11705.
- El Maghraby G.M., Williams A.C., Barry B.W., Drug interaction and location in liposomes: Correlation with polar surface areas. *Int.J.Pharm.* 292(2005)179–185.
- El-Nahass M.M., Zeyada H.M., Aziz M.S., Makhlof M.M., Optical absorption of tetraphenylporphyrin thin films in UV–vis–NIR region. *Spectrochim.Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 62(2005)11-5.

- Fringeli U.P., The structure of lipids and proteins studied by attenuated total reflection (ATR) infrared spectroscopy. II. Oriented layers of a homologous series: phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine. *Z.Naturforsch.C* 32(1977) 20–45.
- Gasper R., Dewelle J., Kiss R., Mijatovic T., Goormaghtigh E., IR spectroscopy as a new tool for evidencing antitumor drug signatures. *Biochim.Biophys. Acta* 1788(2009) 1263–1270.
- Gauger D.R., Pohle W., FT-IR spectroscopy for exposing the CH vibrational bands from the polar parts of phospholipids. *J.Mol.Struct.* 744–747(2005) 211–215.
- Holler F., Burns D.H., Callis J.B., Direct Use of Second Derivatives in Curve-Fitting Procedures. *Appl.Spectrosc.* 43(1989)877–882.
- Hull M.C., Cambrea L.R., Hovis J.S., Infrared spectroscopy of fluid lipid bilayers. *Anal.Chem.* 77(2005)6096-6099.
- Kong J., Yu S., Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 39(2007)549-559.
- Lasch P., Haensch W., Naumann D., Diem M., Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis. *Biochim.Biophys. Acta* 1688(2004)176-186
- Laville I., Pigaglio S., Blais J.C., Doz F., Loock B., Maillard P., Grierson D.S., Blais J., Photodynamic efficiency of diethylene glycol-linked glycoconjugated porphyrins in human retinoblastoma cells. *J.Med.Chem.*49(2006)2558–2567.
- Lewis R.N., McElhaney R.N., Fourier transform infrared spectroscopy in the study practical considerations. *Methods Mol. Biol.* 400(2007)207–226.
- Lupi S., Perla A., Maselli P., Bordi F., Sennato S., Infrared spectra of phosphatidylethanolamine-cardiolipin binary system. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 64(2008)56-64.
- Maillard P., Loock B., Grierson D.S., Laville I., Blais J., Doz F., Desjardins L., Carrez D., Guerguin-Kern J.L., Croisy A., In vitro phototoxicity of glycoconjugated porphyrins and chlorins in colorectal adenocarcinoma (HT29) and retinoblastoma (Y79) cell lines. *Photodiagnosis Photodyn.Ther.* 4(2007) 261–268.
- Nagle J.F., Theory of the Main Lipid Bilayer Phase Transition. *Annu.Rev.Phys.Chem.* 31(1980)157–196.
- Old O.J., Fullwood L.M., Scott R., Lloyd G. R., Almond L.M., Shepherd N.A., Stone N., Barr H., Kendall C., Vibrational spectroscopy for cancer diagnostics. *Anal. Methods* 6(2014)3901–3917.
- Papahadjopoulos D., Moscarello M., Eylar E.H., Isac T., Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 401(1975)317–

- Pohle W., Gauger D.R., Fritzsche H., Rattay B., Selle C., Binder H., Böhlig H., FTIR-spectroscopic characterization of phosphocholine-headgroup model compounds. *J.Mol.Struct.* 563-564(2001)463–467.
- Rehman, I. ur, Movasaghi, Z., & Rehman, S. *Spectroscopy and Molecular Changes in Cancer Cells in Molecular Vibrational spectroscopy for tissue analysis*. Boca Raton: CRC Press (2013).
- Sahu R., Mordechai S., Fourier transform infrared spectroscopy in cancer detection. *Future Oncol.* 1(2005)635-647.
- Scherer J.R., On the position of the hydro-phobic/philic boundary in lipid bilayers. *Biophys.J.* 55(1989)957–964.
- Schultz Z.D., Levin I.W., Vibrational spectroscopy of biomembranes. *Annu.Rev.Anal.Chem(Palo Alto Calif)* 4(2011)343–366.
- Kohler A., Sulé-Suso J., Sockalingum G.D., Tobin M., Bahrami F., Yang Y., Pijanka J., Dumas P., Cotte M., van Pittius D.G., Parkes G., Martens H., Estimating and correcting mie scattering in synchrotron-based microscopic fourier transform infrared spectra by extended multiplicative signal correction. *Appl.Spectrosc.* 62(2008)259–266.
- Stigter D., Mingins J., Dill K.A., Phospholipid interactions in model membrane systems. *Biophys.J.* 61 (1992) 1603-1615.
- Sun Z.C., She Y.B., Zhou Y., Song X.F., Li K., Synthesis, Characterization and Spectral Properties of Substituted Tetraphenylporphyrin Iron Chloride Complexes. *Molecules* 16(2011)2960–2970.
- Vilchèze .C., McMullen T.P., McElhaney R.N., Bittman R., The effect of side-chain analogues of cholesterol on the thermotropic phase behavior of 1-stearoyl-2-oleoylphosphatidylcholine bilayers: a differential scanning calorimetric study. *Biochim. Biophys. Acta* 1279(1996)235–242.
- Walsh M.J., Kajdacsy-Balla A., Holton S.E., Bhargava R., Attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopic imaging for breast histopathology. *Vib.Spectrosc.* 60(2012)23-28.
- Whelan D.R., Bambery K.R., Heraud P., Tobin M.J., Diem M., McNaughton D., Wood B.R., Monitoring the reversible B to A-like transition of DNA in eukaryotic cells using Fourier transform infrared spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* 39(2011)5439–5448.
- Wolthuis R., Travo A., Nicolet C., Neuville A., Gaub M.P., Guenot D., Ly E., Manfait M., Jeannesson P., Piot O., IR spectral imaging for histopathological characterization of xenografted human colon carcinomas. *Anal.Chem.* 80(2008) 8461–8469.
- Wong P.T.T., Mantsch H.H., (1988). High-Pressure Infrared Spectroscopic Evidence of Water

10. Annexes

Tableau A3.01 : Liste des porphyrines utilisées dans le chapitre 3 et leurs structures chimiques.

	
<p>TPPmOH₄ ; MW : 678.73 Nombre de OH= 4 <i>clogP</i> = 10.38</p>	<p>TPP(<i>p</i>DEG-Man)₃ ; MW : 1413.47 Nombre de OH= 12 <i>clogP</i> = 1.68</p>
	
<p>TPP(<i>m</i>GluOH)₄ ; MW= 1327.3 Nombre de OH = 16 <i>clogP</i> = -0.28</p>	<p>TPP[<i>p</i>-dendr(DEG-Man)₃ ; MW : 1691.72 Nombre de OH = 12 <i>clogP</i> = -1.86</p>

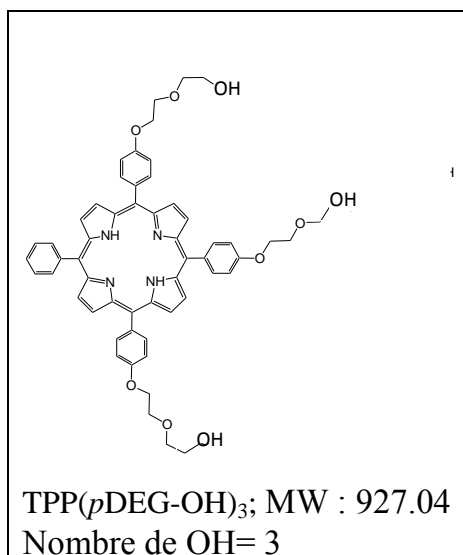


Tableau A3.02 : Caractéristiques physiques des lames utilisées à Soleil

Matériau	Domaine d'utilisation	Radiation	Indice de réfraction	Application dans ce projet
CaF ₂ Fluorure de calcium	0.1250-9 μm	UV-Visible-IR	1.4365 à 0.5 μm	Ont été utilisées pour l'analyse des cellules.
ZnS Sulfure de Zinc	0.4-14 μm	ProcheUV-Visible-IR	2.2223 à 8 μm	Ont été utilisées pour l'analyse des modèles lipidiques

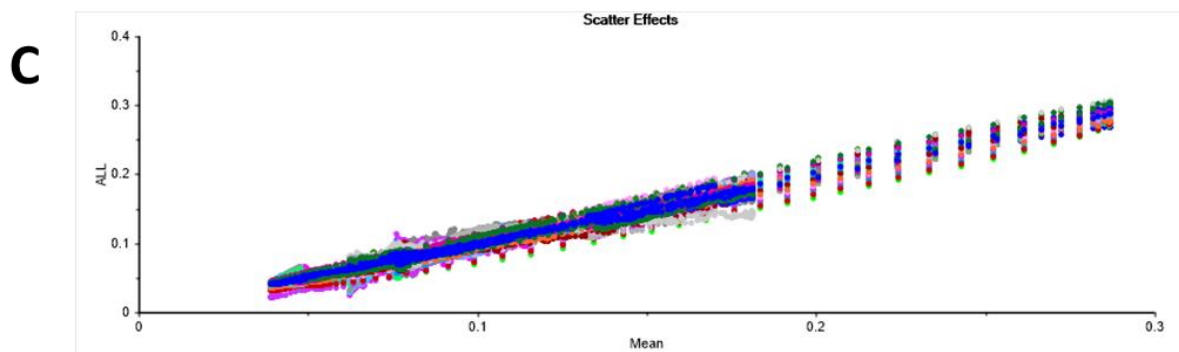
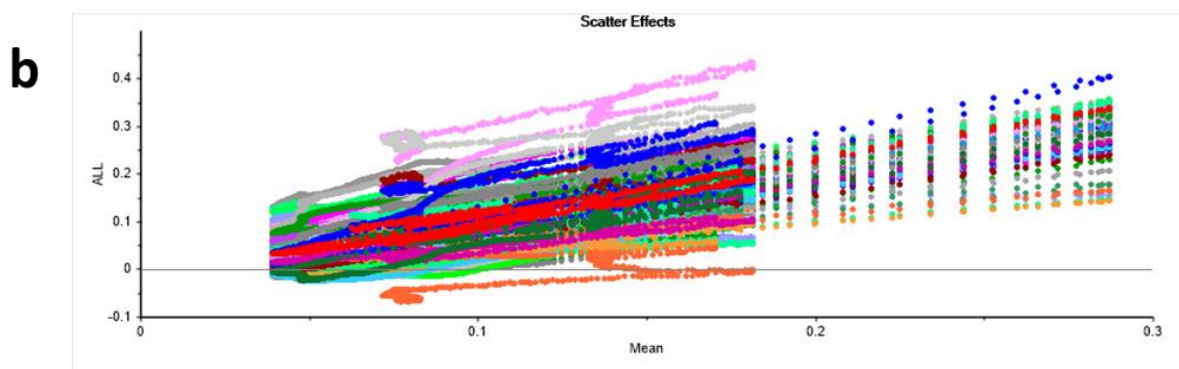
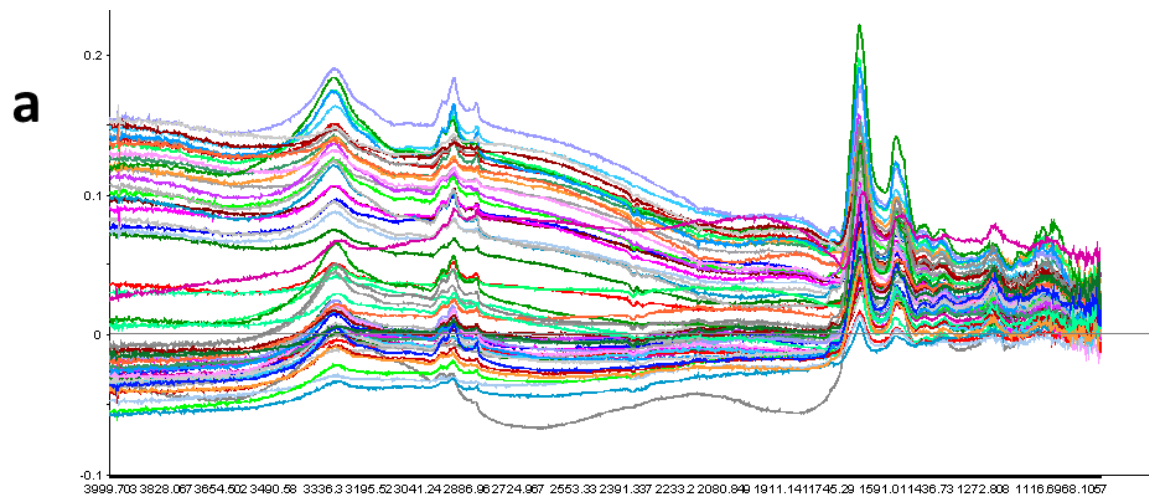


Figure A3.01 : **(a)** les spectres bruts des cellules Y79 traitées à la TPP (p -DEGMan)₃, **(b)** Le graphe de la diffusion « scatter effect » avant la correction Mie (plusieurs pentes et ordonnées à l'origine). **(c)** Le graphe de la diffusion « scatter effect » après correction Mie (les droites se croisent à un seul point à l'origine).

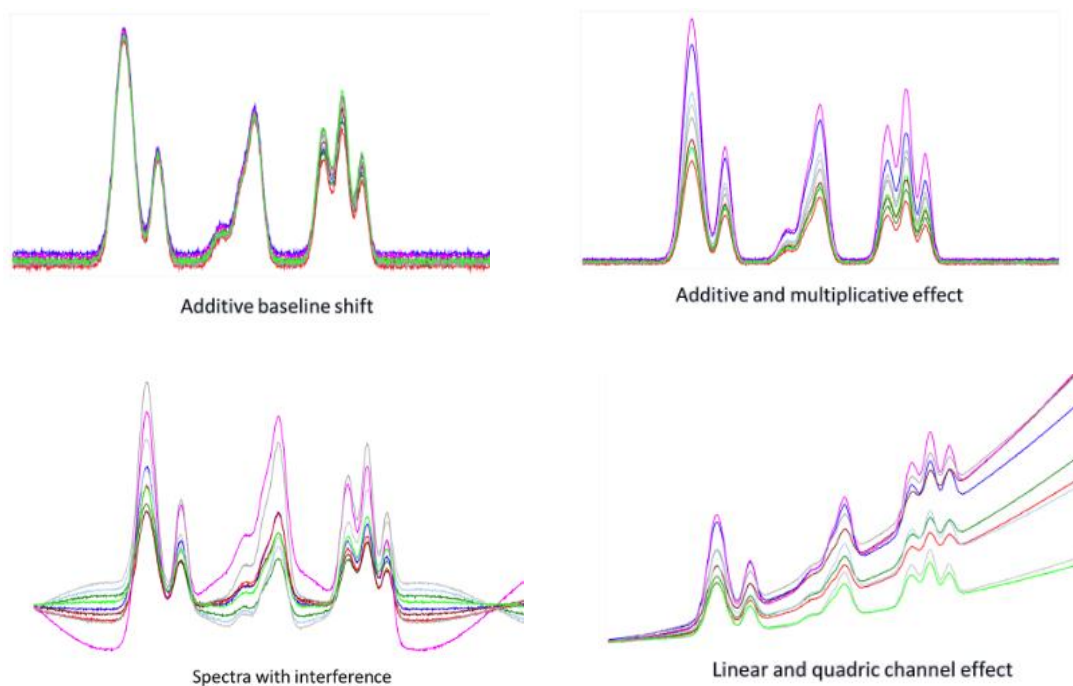


Figure A3.02 : Les différents cas d'utilisation de la EMSC (Unscrambler®).

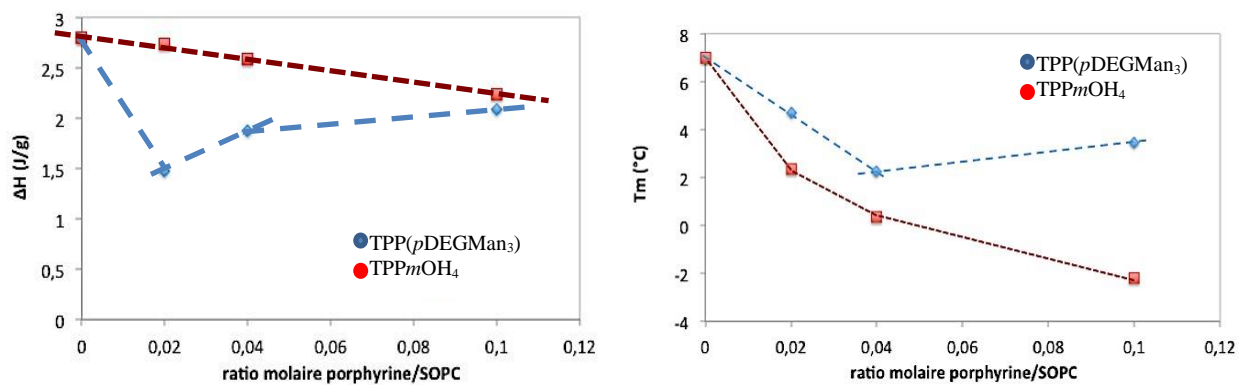


Figure A 3.03 : Variation de l'enthalpie et de la T_m pour les mélanges porphyrines (TPP(pDEGMan₃) ou TPPmOH₄) avec la SOPC en fonction des ratios molaires 1/50, 1/25 et 1/10

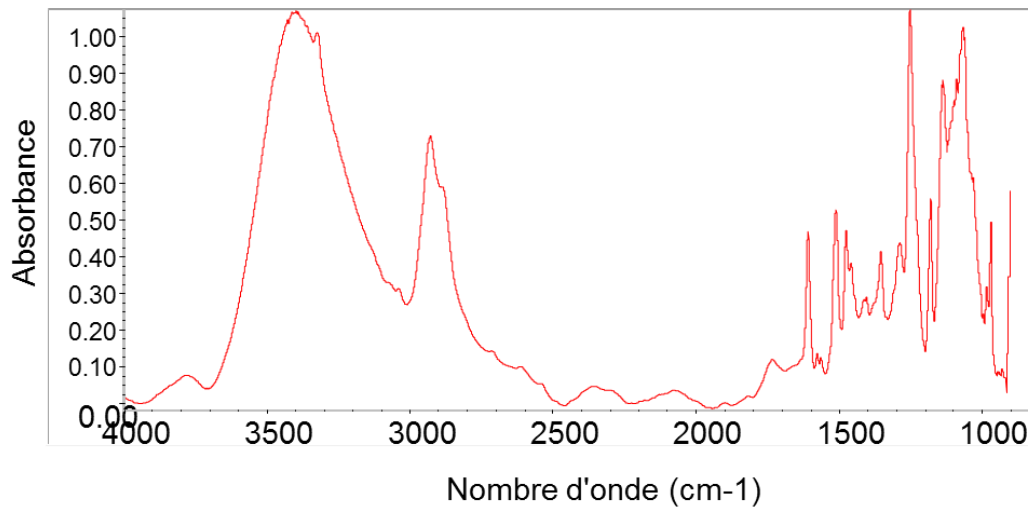


Figure A3.04 : Spectre d'absorption IR de la TPP(*p*DEGMan₃) sur la zone 4000cm⁻¹ - 1000cm⁻¹

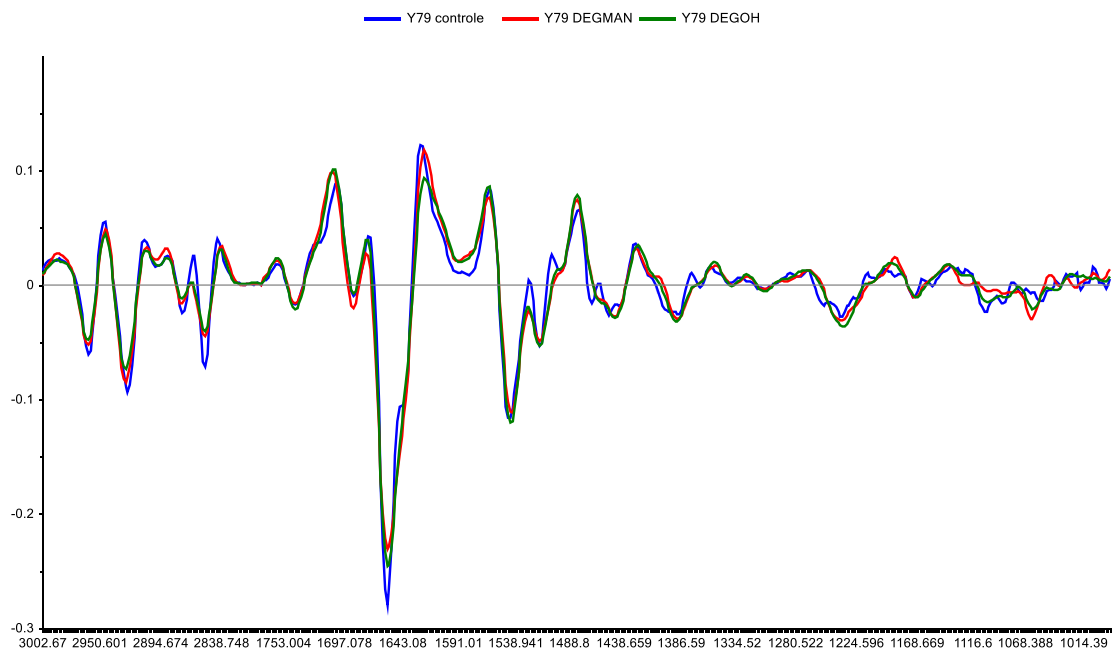


Figure A3.05 : Spectres de la dérivée seconde des cellules Y79 traitées et non traitées

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les recherches développées par l'Institut Curie pour appliquer la PDT au rétinoblastome ont conduit à la synthèse, par l'équipe de Philippe Maillard, de plusieurs séries de tetraphenylporphyrines (TPP) (Ballut et al., 2011 ; 2012 ; Croisy et al., 2004 ; Maillard et al., 2007). Pour être effectivement cytotoxique, l'oxygène singulet résultant de la réaction chimique entre ces TPP et la lumière doit être produit à l'intérieur même des cellules tumorales. Le mode d'internalisation des molécules photosensibilisantes constitue donc une problématique importante (Allisson et al., 2010 ; Agostinis et al., 2011).

Une même stratégie, la glycoconjugaison, a été employée pour diminuer les deux inconvénients principaux des TPP : leur forte hydrophobie et leur faible spécificité. Quatre générations de TPP glycoconjuguées ont été synthétisées jusqu'à ce jour (Ballut et al., 2011 ; 2012 ; Croisy et al., 2004 ; Maillard et al., 2007). Certaines ont été évaluées à l'échelle cellulaire et/ou murine (Maillard et al., 2007 ; Laville et al., 2006 ; Poyer et al., 2012 ; Thomas et al., 2015). Celles qui se sont montrées les plus cytotoxiques ont été aussi caractérisées d'un point de vue physico-chimique, afin de déterminer la relation entre structure chimique et franchissement de la membrane cellulaire (Desroches et al., 2004 ; Makky et al. 2010 ; Makky et al. 2011 ; Makky et al. 2012 ; Ibrahim et al. 2011). Tous ces travaux ont montré que les porphyrines glycoconjuguées pouvaient pénétrer dans les cellules par des mécanismes complexes : transport facilité par un récepteur à mannose, mais aussi diffusion passive dans certains cas.

C'est dans le contexte d'une meilleure compréhension de l'interaction non spécifique des porphyrines avec la membrane que se situe cette présente thèse. Notre intérêt est dirigé en particulier vers l'interaction des TPPs avec les lipides.

Si les résultats des travaux réalisés ont été présentés dans les chapitres précédents plutôt par approche et méthodologies analytiques, il est intéressant de les comparer du point de vue du type de système d'étude. En effet, trois modèles lipidiques ont été analysés: le modèle à un seul lipide, le modèle à plusieurs lipides et le modèle cellulaire. Nous avons utilisé quatre systèmes : les lipides et groupements greffés sur colonne, la monocouche lipidique, les phases lamellaires et finalement, avec les cellules, l'échelle supramoléculaire au niveau de laquelle l'interface porphyrine-protéine a été également considérée.

Systeme du lipide simple

Dans un premier temps, 26 porphyrines de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} génération (glycoconjuguées ou non, contraintes ou flexibles, ou encore dendrimériques) ont été étudiées par une approche chromatographique. Cette étude chromatographique, réalisée avec 5 colonnes différentes - la colonne IAM, membrano-mimétique, et 4 colonnes permettant de décomposer les interactions (C18/C8, PolarTec (Rafferty et al., 2012) et HILIC (Kawachi et al., 2011)) - a permis la caractérisation d'un grand nombre de porphyrines en utilisant une même technique et de mêmes conditions opératoires. En analysant les interactions des TPPs avec des groupements polaires ou apolaires, elle a démontré que les porphyrines peuvent être divisées en groupes tenant compte de la présence ou l'absence d'espaceurs, de l'absence ou la présence de sucres, et de la nature du sucre. L'analyse multivariée ACP a permis de visualiser les différents types d'interactions et de comparer, en même temps, chaque porphyrine vis-à-vis des autres (Essaid et al., 2015). L'avantage de cette analyse est qu'elle permet de prédire l'interaction d'autres porphyrines non testées appartenant à l'une des trois générations. Par exemple, celle utilisée dans les expériences d'analyse des cellules, la TPP(*p*DEG-OH)₃ n'avait pas été étudiée par la méthode chromatographique. Nous pouvons cependant prédire que cette porphyrine devrait se positionner entre le groupe des « espaceurs » et ceux des molécules « sans sucres ». Elle est probablement plus retenue que la TPP(*p*DEG-Man)₃ sur la colonne IAM, étant donné que les interactions hydrophobes dominent au niveau de cette colonne. Le caractère membrano-mimétique de la colonne IAM rend son application très utile pour une première classification des TPP en fonction de leur capacité d'interaction non spécifique avec une membrane et la sélection de molécules potentiellement intéressantes. Il suffit ensuite de retenir une molécule/groupe pour approfondir la caractérisation des interactions. C'est pour cette raison que dans la suite de nos travaux, un nombre réduit de porphyrines a été retenu pour les analyses.

TPP(*p*DEG-Man)₃ fait partie des porphyrines de la 2^{ème} génération, à trois espaceurs auxquels des groupements sucres sont greffés (Laville et al., 2003 ; 2004 ; 2006 ; Maillard et al. 2007). Une efficacité photosensibilisante particulière de la TPP(*p*DEG-Man)₃ a été observée dans des expériences *in vivo* et son étude clinique est envisagée (Poyer et al., 2012). La TPP(*p*DEG-Man)₃ a été synthétisée afin de cibler spécifiquement des récepteurs à mannose surexprimés au niveau des cellules de rétinoblastome (Naeem et al., 2007 ; Maillard et al., 2007 ; Gallud et al. 2015). Cependant, certains travaux ont démontré que cette TPP pénètre

dans la cellule par voie plutôt passive, en dépit de la présence du mannose. Tout ceci explique pourquoi nous nous sommes focalisés sur cette porphyrine en particulier. La compréhension de son interaction non spécifique avec la membrane était intéressante.

Une seconde molécule a été retenue, la TPP mOH_4 . Cette porphyrine possède une structure qui ressemble à celle d'un médicament très utilisé en PDT (le Foscan® qui diffère de la TPP mOH_4 par la saturation d'un pyrrole), ce qui justifie aussi notre choix. Comme TPP($pDEG-Man$)₃, TPP mOH_4 est un PSr efficace en PDT, mais c'est une molécule de la première génération, non glycoconjuguée, et donc plus hydrophobe et potentiellement moins spécifique que TPP($pDEG-Man$)₃.

Nous avons choisi la SOPC comme phospholipide simple, modèle membranaire, ses chaînes aliphatiques comptent 18 carbones et elle possède une chaîne saturée et une chaîne insaturée, comme de nombreux phospholipides membranaires.

La spectroscopie vibrationnelle a permis de préciser les interactions molécule/phospholipide pour ces deux composés et de différencier véritablement le comportement d'une substance très hydrophobe ($clogP = 10.38$ pour la TPP mOH_4), par rapport à une substance qui l'est nettement moins ($clogP = 1.68$ pour TPP($pDEG-Man$)₃). L'analyse par cette méthode, de l'interaction des porphyrines avec des phases lamellaires de SOPC a permis de démontrer que TPP mOH_4 interagit avec les chaînes aliphatiques, le groupement phosphate PO_2^- et le glycérol (C=O). TPP($pDEG-Man$)₃ interagit également avec les chaînes aliphatiques et la tête polaire, mais *via* des liaisons directes avec le groupement PO_2^- ou le C-O adjacent. Ces résultats ont été conclus principalement pour des mélanges TPP/SOPC 1:10 à des conditions d'hydratation nulles ou partielles. Ils indiquent que la TPP mOH_4 s'insère davantage dans le « cœur » hydrophobe de la SOPC. Ce résultat est cohérent avec ceux publiés précédemment par Desroches et al. (2004) et Ibrahim et al. (2011) et avec notre étude chromatographique qui montre que la TPP mOH_4 (ainsi que les autres TPP du groupe 'sans sucre') s'insèrent plus facilement dans la couche phospholipidique. Des différences importantes au niveau de l'effet des deux substances sur la température et l'enthalpie de transition de phase de SOPC ont également été mises en évidence par analyse calorimétrie différentielle, dans des conditions d'hydratation très élevées (90%). Elles ont permis de confirmer les observations de la spectroscopie infrarouge et de ranger les deux composés suivant la classification de Papahadjopoulos (1975) et d'El Maghraby (2005) : selon ces classifications, TPP mOH_4 (à

concentration élevée) se rangerait dans le groupe 3 des molécules lipophiles qui pénètrent profondément dans la bicouche lipidique et la TPP(*p*DEG-Man)₃ dans le groupe 2 des molécules amphiphiles qui pénètrent partiellement dans la bicouche. Dans le système du lipide simple, à une concentration élevée en porphyrine, la TPP(*p*DEG-Man)₃ s'insère donc partiellement dans la bicouche formée, tandis que la TPP*m*OH₄ s'insère plus profondément.

Système du mélange de phospholipides et cholestérol:

Les modèles à plusieurs lipides sont considérés comme davantage biomimétiques que le système « lipide simple ». Ces systèmes prennent davantage en compte la complexité de la membrane biologique, à condition de proposer un modèle se rapprochant des conditions biologiques. Mais ceci n'est pas toujours évident. Dans le cadre de l'étude l'interaction avec les TPP, un premier modèle à quatre lipides (SOPC/SOPE/SOPS/Chol) était proposé par Makky (Makky et al. 2010) à partir des données de la littérature Yorek et al., 1985) et un autre (SDHAPC /SOPE/SOPS/Chol) dans la thèse de Dagchildjian (thèse 2013) à partir d'une étude du lipidome total des cellules de rétinoblastome, sans distinction des organelles. Nous avons repris cette approche, nous l'avons complétée, approfondie et étendue à la caractérisation du lipidome des membranes cellulaires et mitochondriales des cellules de rétinoblastome, mais aussi de cellules saines d'épithélium rétinien humain.

Les lipides extraits des cellules Y79 et ARPE-19 ont été quantifiés et identifiés par LC/MS-MS. Notre étude lipidomique des phospholipides est la plus complète à ce jour pour ces deux lignées. Celle du rétinoblastome avait été largement étudiée précédemment (Yorek et al. 1985; Spector et Yorek 1985; Reid et al. 1974 ; Antczak et al. 2009), mais principalement du point de vue de la composition en acides gras, sans fournir de détails sur l'association des chaînes aliphatiques dans les phospholipides. En utilisant les résultats que nous avons obtenus, nous avons proposé plusieurs modèles associant des phospholipides des trois classes principales (PC, PE et PS) et du cholestérol. La technique de Langmuir permettant de contrôler la composition de monocouches lipidiques mixtes et de déterminer leur compressibilité, nous avons utilisé une balance de Langmuir pour former des monocouches de compositions variées dont nous avons comparé les propriétés à celles étalées à partir des extraits lipidiques analysés en LC/MS-MS. Nous avons remarqué que la compressibilité du modèle augmente avec l'accroissement du nombre des insaturations et de la longueur des chaînes aliphatiques. En revanche, les proportions de chaque classe les unes par rapport aux

autres ont peu d'effet. Nous avons aussi observé que le modèle renfermant les espèces majoritaires de chaque classe n'était pas forcément le meilleur en terme de compressibilité par rapport aux extraits biologiques. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que nos modèles ne renferment pas de lipides apolaires, à l'exception du cholestérol. Ces lipides apolaires n'ont pas pu être encore identifiés en raison de leurs diversités et de leurs complexités structurales. Comme nous étions plutôt intéressés par les phospholipides, notre méthode chromatographique n'était pas vraiment adaptée pour l'analyse de tous les lipides de l'échantillon. Une autre méthode est en cours de développement dans notre laboratoire, qui pourrait être utilisée après valorisation afin de compléter l'analyse lipidomique des deux lignées cellulaires étudiées. Il est également connu que les membranes cellulaires contiennent beaucoup d'acides gras libres. Ces acides gras, monocaténares, affectent la compressibilité des monocouches de phospholipides. Ceci a été démontré sur des monocouches de DPPC, mais aussi avec des phospholipides insaturés comme DOPC (Hac-Wydro et al., 2009). Il pourrait donc être envisagé d'introduire une faible proportion d'acide gras libre dans le mélange. L'efficacité de ces acides gras libres pour abaisser le module de compressibilité de notre modèle reste toutefois à confirmer et si c'est effectivement le cas, la proportion doit être optimisée.

Bien que nos modèles ne soient pas optimaux selon le critère que nous nous étions fixé, nous avons testé l'interaction de TPP(*p*DEG-Man)₃ avec les monocouches de lipides extraits des membranes plasmiques et ER des cellules Y79 et ARPE-19, ainsi qu'avec la monocouche du modèle 5 (SDHAPC/SOPE/SOPS/Chol). La porphyrine a été injectée dans la sous-phase, sous une monocouche formée à une pression de surface de 30 mN/m. L'expérience qui n'a pu être réalisée qu'une fois a été peu concluante, aussi bien pour le modèle que pour les extraits lipidiques. Il serait peut-être judicieux d'essayer d'autres valeurs de pression de surface comme l'avait fait Ali Makky (Makky et al. 2010) pour mieux mettre en évidence la capacité des porphyrines à pénétrer dans ces monocouches. Le temps nous a manqué pour poursuivre ces expériences.

L'interaction entre deux autres modèles (SOPC/SOPE/SOPS/Chol) et (SOPC/SOPE/SOPS/Chol/CL) et les deux porphyrines d'intérêt a été étudiée par spectroscopie infrarouge. Le premier modèle mimait la membrane cellulaire, le second la membrane mitochondriale. Les travaux de Laville et al. (2006) ont montré, en effet, que certaines TPP glycoconjuguées, après internalisation, se localisent au niveau des

mitochondries. Il était donc intéressant d'étudier également une composition lipidique mimant celle de la membrane mitochondriale. Nous n'avons pas pu tirer de conclusion à partir de la comparaison entre modèle membranaire et modèle mitochondrial en terme d'interaction avec les porphyrines, ce qui peut s'expliquer par la faible différence de compressibilité entre les deux modèles artificiels, alors que cette différence est notable au niveau des extraits lipidiques. Des expériences complémentaires seraient nécessaires. Toutefois, nous avons pu observer que l'interaction des TPPs TPP(*p*DEGMan)₃ et TPP*m*OH₄ avec les têtes polaires des lipides est beaucoup réduite par rapport au système du « *phospholipide simple* ». Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'organisation de la bicouche lipidique en présence de cholestérol laisserait seulement les chaînes aliphatiques accessibles aux TPPs.

Les modèles membranaires lipidiques que nous avons conçus pourraient être améliorés afin d'être plus mimétiques non seulement du point de vue composition lipidique polaire/apolaire mais aussi du point de vue de la distribution spatiale des phospholipides. En effet, l'asymétrie de la membrane biologique est connue, avec sa plus grande richesse en PE et PS du côté interne, et en PC et SM du côté externe de la membrane (van Meer et al. 2011). Le cholestérol lui-aussi se partagerait un peu différemment au niveau des deux feuillettes. Dans ce contexte, il pourrait être intéressant de concevoir des vésicules lipidiques asymétriques, et de tester leur interaction avec les porphyrines par spectroscopie de fluorescence ou DSC. L'utilisation des systèmes asymétriques n'est pas encore très répandue. L'une des manières de former des vésicules est de partir de deux monocouches préparées séparément (Marquardt et al., 2015) Ces systèmes ne sont toutefois pas en état d'équilibre et l'asymétrie a une durée de vie limitée à quelques heures seulement.

Système cellulaire : modèle supramoléculaire :

Dans la continuité de ce qui précède, l'interaction entre les TPPs et les cellules de rétinoblastome a été aussi étudiée pour deux porphyrines. Cette fois, la TPP(*p*DEG-Man)₃ a été comparée à la TPP(*p*DEG-OH)₃, identique à la première, mais avec des hydroxyles à la place des mannoses. La dose utilisée (5µM) est deux fois moins élevée que l'IC₅₀ dans l'obscurité préalablement déterminée pour TPP(*p*DEG-Man)₃ (Laville et al., 2006). Les expériences ont été menées sur des cellules Y79 et WERI-Rb1 de rétinoblastome ainsi que les cellules épithéliales ARPE-19. L'étude de l'interaction a été réalisée par microspectroscopie

IR sur la ligne SMIS (synchrotron Soleil), sans illumination préalable des cellules : l'objectif était seulement de déterminer la localisation des porphyrines (plutôt associées avec les lipides ou avec les protéines). De manière inattendue, l'effet de l'ajout des porphyrines été observée pour les cellules Y79 et non les cellules WERI-Rb1. Nous nous attendions pourtant à ce que les deux lignées répondent d'une manière comparable. Les résultats obtenus avec les cellules WERI-Rb1 sont encore inexpliqués. Pour les cellules Y79, l'interaction des TPPs avec les chaînes aliphatiques a été confirmée et nous avons pu également mettre en évidence une interaction avec des protéines. En revanche, nous n'avons pas pu discriminer les deux porphyrines : les cellules n'ont pas pu être discriminées clairement à partir de la première ACP, une légère différence au niveau de la structure secondaire des protéines a pu être observée.

En ce qui concerne les cellules ARPE-19, aucune discrimination des porphyrines n'a pu être observée au niveau de cette lignée qui n'est pas supposée interagir, de manière spécifique, avec l'une ou l'autre des porphyrines.

Mis à part les résultats décevants concernant les cellules WERI-Rb1 et la constatation que la dose de TPP utilisée est probablement trop faible pour voir leur effet, les résultats obtenus avec les cellules Y79 montrent que la différence des effets des porphyrines est davantage visible au niveau des protéines qu'au niveau des lipides, en particulier au niveau de leur structure secondaire. Ce résultat est probablement dû à une interaction directe avec les protéines. Il n'est pas possible de savoir de quelle type de protéines il s'agit, mais on pourrait imaginer qu'il s'agisse de LDL (Konan et al., 2002 ; Richter et al., 1993), de récepteurs à sucre (Naeem et al., 2007) ou même d'autres protéines solubles avec lesquelles les TPP pourraient interagir une fois internalisées. Ceci pourrait être appliqué aux deux porphyrines, car des études réalisées à l'Institut Curie ont démontré que TPP(*p*DEG-OH₃) et TPP(*p*DEG-Man)₃ ne se localisent pas au même endroit dans la cellule.

Ces résultats restent encore à confirmer en augmentant la dose de TPP, tout en restant à une concentration inférieure à l'IC₅₀ à l'obscurité. Par ailleurs le mécanisme de la PDT peut également être étudié par microspectroscopie IR. Dans ce cas, les cellules après incubation avec la porphyrine, seront traitées par la lumière (afin de mimer le traitement PDT) juste avant l'analyse par IR.

C'est un peu dans ce contexte que les cellules analysées sur la ligne SMIS ont aussi été analysées par spectroscopie vibrationnelle Raman suite à un photobleaching. Dans ces expériences, un appareil à haute résolution de type Labram HR800 de Horiba a été utilisé, et le photobleaching avec le laser 633 nm a été réalisé pendant 5 à 10 min, le temps de faire disparaître la forte fluorescence des TPP qui chevauche le signal raman. Les résultats n'ont malheureusement pas pu être exploités au moment de la rédaction de ce manuscrit en raison de la mauvaise qualité des spectres obtenus après photobleaching. Mais il pourrait être intéressant de renouveler cette expérience. Il est à noter que des expériences d'interaction d'un système « lipide simple » avec les TPPs ont été analysées par spectroscopie Raman, mais la fluorescence trop élevée des TPPs a empêché d'obtenir un signal exploitable. Les longueurs d'ondes testées sont 633 nm dans notre laboratoire, 514 nm au Synchrotron SOLEIL et 488 nm au laboratoire EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes, (Faculté de Pharmacie de Tours avec la collaboration de Pr CHOURPA). Aucune longueur d'onde n'a permis d'obtenir un résultat satisfaisant.

Une des perspectives qui peuvent être envisagées pour compléter les analyses sur les cellules est de réaliser une analyse par spectroscopie IR *in situ* de cellules vivantes en présence de porphyrine. Ceci permettrait d'étudier l'effet des doses au cours de la croissance cellulaire. Cette méthode pourrait être très utile afin de suivre la capture cellulaire en continu et au cours de la division des cellules. Cette approche pourrait aussi également être couplée à une activation de la porphyrine par la lumière et par conséquent permettre d'étudier l'effet de la PDT jusqu'à l'arrivée en apoptose qui se manifesterait par une baisse de l'absorbance globale au niveau de la cellule. Des études similaires sont bien développées dans la littérature et ont montré une efficacité de cette méthode (Fale et al, 2015).

- Références bibliographiques :

Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn SM, Hamblin M.R, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson B.C., Golab J., Photodynamic Therapy of Cancer : An Update. CA Cancer J.Clin. 61 (2011) 250–281.

Allison R.R., Sibata C.H., Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. Photodiagnosis Photodyn Ther. 7 (2010) 61–75.

- Antczak C., Kloepping C., Radu C., Genski T., Müller-Kuhrt L., Siems K., Stanchina E. de, Abramason D.H., Djaballah, Revisiting old drugs as novel agents for retinoblastoma: in vitro and in vivo antitumor activity of cardenolides, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (2009) 3065-3073.
- Ballut S., Naud-Martin D., Looock B., Maillard P., A strategy for the targeting of photosensitizers synthesis, characterization, and photobiological property of porphyrins bearing glycodendrimeric moieties, *J. Org. Chem.* 76 (2011) 2010–2028.
- Ballut S., Makky A., Chauvin B., Michel J.-P., Kasselouri A., Maillard P., Rosilio V., Tumor targeting in photodynamic therapy. From glycoconjugated photosensitizers to glycodendrimeric one. Concept, design and properties. *Org. Biomol. Chem.* 10 (2012) 4485–4495.
- Croisy A., Lucas B., Maillard P., Les macrocycles tétrapyrroliques glycoconjugués. Utilisation en photothérapie dynamique (PDT), *Actual Chim. Thérap.* 31 (2005) 181–244.
- Desroches M.C., Kasselouri A., Meyniel M., Fontaine P., Goldmann M., Prognon P., Maillard P., 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 (2004) 11698 - 11705.
- Essaid D., Chaminade P., Maillard Ph., Kasselouri A., Lipophilicity of porphyrins and their retention in IAM, C8-C18 and HILIC chromatographic systems. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 114 (2015) 227-240.
- Fale P.L., Altharawi A., Chan, K.L.A., In situ Fourier transform infrared analysis of live cells' response to doxorubicin. *Biochim. Biophys. Acta* 1853 (2015) 2640 - 2648.
- Gallud A., Warther D., Maynadier M., Sefta M., Poyer F., Thomas C.D., Rouxel C., Mongin O., Blanchard-Desce M., Morère A., Raehm L., Maillard P., Durand J.O., Garcia M., Gary-Bobo M., Identification of MRC2 and CD209 receptors as targets for photodynamic therapy of retinoblastoma using mesoporous silica nanoparticles. *RSC Adv.* 5 (2015) 75167–75172.
- Hac-Wydro K., Jedrzejek K., Dynarowicz-Latka P., Effect of saturation degree on the interactions between fatty acids and phosphatidylcholines in binary and ternary Langmuir monolayers, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 72 (2009) 101-111.
- Ibrahim H., Kasselouri A., You C., Maillard Ph., Rosilio V., Pansu R., Prognon P., Meso-tetraphenyl porphyrin derivatives: The effect of structural modifications on binding to DMPC liposomes and albumin, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 217 (2011) 10–21.
- Laville, I., Figueiredo, T., Looock, B., Pigaglio, S., Maillard, Ph., Grierson, D.S., 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(2003) 1643-1652.

Kawachi Y., Ikegami T., Takubo H., Ikegami Y., Miyamoto M., Tanaka N., Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5903–5919.

Laville, I., Pigaglio, S., Blais, J. C., Looock, B., Maillard, Ph., Grierson, D.S., Blais, J. A study of the stability of tri(glucosyloxyphenyl)chlorin, a sensitizer for photodynamic therapy, in human colon tumoural cells: a liquid chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry analysis, *Bioorg. & Med. Chem.* 12 (2004) 3673-3682.

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

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 membranes of retinoblastoma cells. *Langmuir* 26 (2010) 11145–11156.

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 (2011) 656-666.

Makky A., Daghdjian K., Michel J.P., Maillard Ph., Rosilio V., Assessment of the relevance of supported planar bilayers for modeling specific interactions between glycoconjugated porphyrins and retinoblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 2831-2838.

Maillard P., Looock 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 Photodyn Ther.* 4, (2007) 261–268.

Marquardt D., Geier B., Pabst G., Asymmetric lipid membranes: towards more realistic model systems. *Membranes (Basel)* 5 (2015) 180-196.

Papahadjopoulos D., Moscarello M., Eylar E.H., Isac T., Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 401 (1975) 317-335.

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

Rafferty J.L., Siepmann J.I., Schure M.R., A molecular simulation study of the effects of

- stationary phase and solute chain length in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1223 (2012) 24–34.
- Reid T.W., Albert D.M., Rabson A.S., Russel P., Craft J., Chu E.W., Tralka T.S., Wilcox J.L., Characteristics of an established cell line of retinoblastoma, *J. Natl. Cancer Inst.* 53 (1974) 347-360.
- Richter A.M., Waterfield E., Jain A.K., Canaan A.J., Allison B.A., Levy J.G., Benzoporphyrin Derivative Monoacid Ring A (Bpd), To Tumor Tissue In A Mouse Tumor Model. *Photochem. Photobiol.* 57(1993)1000–1006.
- Spector A.A., Yorek M.A., Membrane lipid composition and cellular function, *J. Lipid Res.* 26 (1985) 1015-1035.
- Thomas C.D., Poyer F., Maillard P., Chauvin B., Lupu M., Mispelter J., Cellular density, a major factor involved in PDT cytotoxic responses: Study on three different lines of human retinoblastoma grafted on nude mice. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 12 (2015) 267–275.
- van Meer G., De Kroon A.I., Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* 124 (2011) 5-8.
- Yorek M.A., Figard P.H., Kaduce T.L., Spector A.A., Comparison of lipid metabolism in two human retinoblastoma cell lines, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26 (1985) 1148-1154.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les porphyrines glycoconjuguées synthétisées par l'équipe de Philippe Maillard ont montré, pour certaines, une efficacité phototoxique *in vitro*, ce qui les positionne en tant de bons candidats pour la thérapie photodynamique du rétinoblastome. Cependant, le mécanisme d'internalisation de ces porphyrines n'est toujours pas bien expliqué. Ces molécules peuvent interagir de manière spécifique avec des récepteurs à mannose surexprimés à la surface des cellules de rétinoblastome (transport facilité) ou de manière non spécifique, par diffusion passive.

L'objectif de ce travail était la compréhension du mécanisme d'interaction entre des porphyrines (TPP) utilisables en thérapie photodynamique du rétinoblastome et des membranes cellulaires. Afin d'atteindre cet objectif, trois systèmes lipides-porphyrines ont été utilisés avec plusieurs approches analytiques ou physico-chimiques.

Dans un premier temps, nous avons comparé l'affinité de 26 porphyrines vis-à-vis de phospholipides plus ou moins complexes, greffés à des phases stationnaires chromatographiques. Nous avons démontré que l'interaction dépend de la structure de la TPP : absence ou présence de résidus glycosylés, nature des sucres et absence ou présence des espaceurs.

Ensuite, et dans l'objectif de concevoir un modèle mimétique de la membrane plasmique et mitochondriale des cellules de rétinoblastome, nous avons analysé les lipides extraits des membranes cellulaires, après fractionnement des cellules. Nous avons quantifié et identifié toutes les espèces des phospholipides (PC, PS, PI, PE et CL) et d'un sphingolipide (la SM), le cholestérol a été aussi quantifié. Des modèles membranaires à quatre lipides (PC-PE-PS-Chol) ont été proposés sur la base de cette analyse et leur compressibilité a été comparée à celle des extraits biologiques en utilisant une balance de Langmuir.

L'interaction de deux porphyrines d'intérêt, différant par la présence ou l'absence de 3 espaceurs terminés par des résidus mannose avec l'un des modèles membranaires ou de la SOPC, a été analysée par spectroscopie IR couplée ou non au rayonnement synchrotron sur la ligne SMIS. Nous avons démontré que les interactions des deux porphyrines sont similaires, quand elles interagissent avec un modèle complexe, mais qu'elles sont légèrement différentes

lorsque ces porphyrines sont en contact avec une bicouche de SOPC. La TPP mOH_4 interagit plus avec le C=O (glycérol) alors que la TPP($pDEGMan$)₃ interagit davantage avec le groupement PO₂ du lipide.

Cette approche a été poursuivie par l'évaluation de la localisation des TPPs à l'échelle cellulaire, par microspectroscopie IR couplée au rayonnement synchrotron. Une discrimination selon les porphyrines a été observé par des outils de la chimiométrie, PCA et PLS-DA, pour les cellules Y79, mais pas pour les cellules WERI-Rb1 ni les cellules ARPE-19.

Au vu de ces résultats, quelques perspectives peuvent être proposées pour continuer ces travaux :

- L'approche chromatographique pourrait être améliorée en utilisant des colonnes biomimétiques plus modernes ou développées. Certains systèmes offrent la possibilité d'étudier l'interaction avec un organelle donné, en immobilisant à titre d'exemple, des mitochondries sur des support IAM ce qui donne naissance à des membranes d'affinité mitochondriale. Ces systèmes ne sont pas encore d'utilisation courante, mais leur application pourrait augmenter dans les prochaines années.
- Nous proposons d'utiliser d'autres méthodes de chromatographie liquide couplée à la MS/MS et qui permettront de mieux exploiter la partie apolaire des lipides pour finaliser l'analyse lipidomique. Par ailleurs, l'analyse des phospholipides réalisée dans le cadre de cette thèse pourrait être comparée à celle des xénogreffes.
- Nous proposons d'affiner le modèle membranaire artificiel afin de mieux mimer les propriétés viscoélastiques des mélanges lipidiques biologiques. Ceci pourrait être réalisé en jouant sur les longueurs des chaînes et le nombre d'insaturations ou en incluant d'autres lipides que les phospholipides.
- Une étude par spectroscopie Raman des cellules traitées par les porphyrines pourrait être envisagée. Etant donné la complémentarité des deux techniques de spectroscopie vibrationnelle (certaines bandes absorbent plus en Raman qu'en infrarouge), il serait peut-être possible de mettre en évidence certaines signatures vibrationnelles non identifiées en utilisant la spectroscopie Raman. Cependant, ceci doit être précédé par un photo-blanchiment pour réduire la fluorescence de la TPP.

- Enfin, une étude *in situ* par spectroscopie IR, pourrait être réalisée par dépôt de cellules vivantes de rétinoblastome (toujours dans leur milieu de culture) au-dessus d'un système ATR. Les cellules pourraient être ensuite traitées avec les porphyrines et illuminées pour mimer la PDT. Cette étude d'analyse en continu pourrait mettre en relief les modifications chimiques consécutives à l'interaction des cellules avec les porphyrines, sous réserve que la dose soit efficace et non cytotoxique en l'absence de lumière.

Titre : Photosensibilisateurs pour la thérapie photodynamique (PDT) des cancers: impact des modifications structurales sur leur interaction avec des membranes

Mots clés : Photothérapie dynamique, rétinoblastome, porphyrine, lipidomique, modèle membranaire

Résumé : La photothérapie dynamique (PDT) consiste à injecter un photosensibilisateur (PSr) au patient, puis à illuminer sa tumeur. En présence d'oxygène, le PSr activé entraîne la formation d'oxygène singulet cytotoxique. Nos collaborateurs à l'Institut Curie ont synthétisé des dérivés porphyriniques glycoconjugués (TPP) pour traiter le rétinoblastome par PDT. Des études de caractérisation de ces TPP *in vitro* ont montré une internalisation dans la cellule par voie passive. C'est dans ce contexte que nous avons analysé l'interaction de certaines TPP avec les lipides membranaires. Dans un premier temps, cette interaction a été étudiée par une approche chromatographique sur des colonnes C18/C8, PolarTec, HILIC et IAM. Nous avons démontré une variation de l'interaction selon la structure des TPP. Par la suite, nous avons mis en évidence par DSC, les changements d'organisation de bicouches phospholipidiques produits par deux TPP

d'intérêt, et déterminé par FTIR-ATR, la localisation de la perturbation au niveau des têtes polaires ou des chaînes aliphatiques des lipides. Cette approche a été poursuivie par l'évaluation de la localisation des TPP à l'échelle cellulaire, par microspectroscopie IR couplée au rayonnement synchrotron. Une discrimination des TPP a été mise en évidence par des outils chimiométriques pour les cellules Y79, mais pas pour les lignées WERI-Rb1 ni ARPE-19. Afin de développer un modèle membranaire artificiel de rétinoblastome, nous avons réalisé par spectrométrie de masse (Orbitrap) une analyse lipidomique approfondie des phospholipides des membranes plasmiques et mitochondriales des lignées Y79 et ARPE-19. Nous avons analysé les propriétés visco-élastiques des extraits membranaires et proposé un modèle artificiel complexe mimant au moins partiellement ces propriétés. Ce modèle pourrait permettre le criblage *in vitro* des TPP.

Title : Photosensitizers for photodynamic therapy (PDT) of cancers: impact of structural changes on their interaction with membranes

Keywords : Photodynamic therapy, retinoblastoma, porphyrin, lipidomic, membrane model.

Abstract : Photodynamic therapy (PDT) is a treatment modality in which a photosensitizer (PSr) is injected to a patient. Then the tumor is illuminated with a laser. The excited PSr induces the production of cytotoxic singlet oxygen. Our collaborators at the Institut Curie have synthesized glycoconjugated tetraphenylporphyrins (TPP) for the treatment of retinoblastoma by PDT. These compounds were characterized *in vitro* and studies showed that the most promising porphyrin crossed the cell membrane by passive transport. It is in this context that this research was developed: the objective was to study the interaction of a series of porphyrins with membrane lipids. Firstly, porphyrin interaction with lipids was studied by a chromatographic approach on C18/C8, PolarTec, HILIC and IAM columns. Results showed a variation in the interaction according to porphyrin structures.

Then, we demonstrated the effect of two TPPs on phospholipid bilayers organization by DSC, and determined the localization of this interaction (polar heads or lipid aliphatic chains) by FTIR-ATR. The effect of TPPs on lipids and proteins was studied at the cellular level by IR microspectroscopy coupled with synchrotron radiation. A discrimination of porphyrins could be made by chemometric tools for Y79 cells but not for WERI-Rb1 nor ARPE-19 ones. In order to develop an artificial membrane model, we performed lipidomic analysis by mass spectrometry (Orbitrap) of plasma and mitochondrial lipid membranes of Y79 and ARPE-19 cells. We determined the viscoelastic properties of lipid extracts and proposed an artificial lipid model partially mimicking these viscoelastic properties. This model could allow TPP screening *in vitro*.

Université Paris-Saclay

Espace Technologique / Immeuble Discovery

Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

