



HAL
open science

Influence de la composition lipidique sur la résistance de membranes bio-mimétiques au stress oxydant

Aurélien Bour

► **To cite this version:**

Aurélien Bour. Influence de la composition lipidique sur la résistance de membranes bio-mimétiques au stress oxydant. Biophysique [physics.bio-ph]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS394 . tel-02555176

HAL Id: tel-02555176

<https://theses.hal.science/tel-02555176>

Submitted on 27 Apr 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.

**THESE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITE
ECOLE DOCTORALE PHYSIQUE ILE-DE-FRANCE (ED 564)**

Laboratoire Jean Perrin

Discipline

Physique

Présentée par

Aurélien BOUR

Pour obtenir le grade de Docteur de Sorbonne Université

**Influence de la composition lipidique sur la résistance de
membranes bio-mimétiques au stress oxydant**

Soutenance le 13/09/2018 devant un jury composé de :

Stéphanie BONNEAU	Directrice de thèse
Sophie CRIBIER	Examinatrice
Jean-Baptiste FOURNIER	Examineur
Carlos MARQUES	Rapporteur
Fabienne MEROLA	Rapporteuse
Nicolas PUFF	Invité

Liste des abréviations

14:0 PC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
18:1 PC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
18:1 PC $\Delta 6$	1,2-dipetroselenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
18:1 PC (<i>trans</i>)	1,2-dielaidoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
18:2 PC	1,2-dilinoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
18:3 PC	1,2-dilinolenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
18:2 PE	1,2-dilinoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
ADE	Area Difference Elasticity
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ADP	Adénosine Di-Phosphate
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
Ce6	Chlorine-e6
CL	Cardiolipide
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FADH ₂	Forme réduite de la Flavine Adénine Dinucléotide
GP	Generalized Polarization
GUV	Giant Unilamellar Vesicle (vésicule unilamellaire géante)
HEPES	Tampon d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
LUV	Large Unilamellar Vesicle (grande vésicule unilamellaire)
MIM	Membrane Interne Mitochondriale
MLV	MultiLamellar Veiscl (Vésicule multilamellaire)
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADH	Forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide
PBS	Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate)
PE	PhosphatidylEthanolamine
PC	PhosphatidylCholine
PPIX	ProtoPorphyrine IX
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species (espèces activées de l'oxygène)
SUV	Small Unilamellar Vesicle (petite vésicule unilamellaire)
UV	Ultra-Violet

Tables des matières

1 Introduction	3
1.1 De l'eau aux bicouches lipidiques	5
1.1.1 L'eau	5
1.1.2 Amphiphiles et organisation spontanée	8
1.1.3 Les lipides	10
1.2 Structure membranaire dans la cellule	11
1.2.1 Composition	11
1.2.2 Compartimentation et asymétrie	15
1.2.3 Les mitochondries	16
a) Historique	16
b) Description	17
c) Production d'ATP et mort cellulaire	19
d) Liens entre fonction, structure et cardiolipide	23
1.3 Oxydation du vivant	26
1.3.1 Initiateurs de l'oxydation	26
1.3.2 Stress oxydant	28
1.3.2.1 Lésions des molécules biologiques	28
1.3.2.2 Peroxydation des lipides	29
1.3.2.3 Produits d'oxydation des lipides	30
1.3.2.4 Mécanismes de régulation cellulaire de l'oxydation	31
1.4 Objectifs du travail présenté	32
1.5 Organisation du manuscrit	32
2 Systèmes étudiés	35
2.1 Vésicules lipidiques	36
2.1.1 Membranes biomimétiques	36
2.1.2 Formation de vésicules lipidiques	37

2.1.3 Propriétés mécaniques d'une membrane	38
2.1.4 Tension de membrane et tension de lyse d'une vésicule	40
2.1.5 Perméabilité d'une membrane	41
2.1.6 Autres propriétés	42
2.2 Photo-oxydation de vésicules lipidiques	44
2.2.1 Photo-sensibilisateur	44
2.2.2 Chlorine-e6	45
2.2.3 Production d'oxygène singulet	48
2.2.4 Le choix du photosensibilisateur	49
2.2.5 Effets de l'oxydation des lipides sur la morphologie d'une vésicule	50
2.2.6 Perméabilisation d'une vésicule géante par oxydation	53
Conclusion du chapitre	55

3 Matériel & méthodes **57**

3.1 Produits	58
3.1.1 Solutions tampons et solvants	58
3.1.2 Lipides et membranes	58
3.1.2.1 Lipides	58
3.1.2.2 Mitoplastes	60
3.1.3 Photo-sensibilisateurs	60
3.1.4 Autres produits	60
3.2 Préparation des vésicules	62
3.2.1 Préparation des LUV	62
3.2.2 Préparation des GUV	63
3.3 Appareils	65
3.3.1 Spectroscopie d'absorbance et de fluorescence	65
3.3.2 Microscopie	66
3.3.2.1 Matériel	66
3.3.2.2 Acquisition et traitement des images	66
3.3.2.3 Analyse	67
3.3.2.4 Microscopie de fluorescence	68
3.3.3 Microspectroscopie Raman / Pincettes optiques	69
3.3.3.1 Principe	69
3.3.3.2 Caractéristiques du montage	69
3.3.3.3 Traitement des spectres obtenus	70
3.3.4 Autres appareils	71

4 Interactions entre la Chlorine-e6 et les membranes lipidiques	73
4.1 Mesure d'affinité entre la chlorine-e6 et les membranes lipidiques	75
4.2 Résultats et discussions	77
4.2.1 Spectres d'émission de fluorescence obtenus	77
4.2.2 Constantes d'affinité	78
Conclusion du chapitre	80
5 Effets du cardiolipide dans la résistance des membranes lipidiques à un stress oxydant	83
5.1 Conception des membranes	86
5.2 Transitions de forme et perméabilisation de vésicules subissant un stress oxydant	87
5.2.1 Effets du cardiolipide sur la dynamique des changements morphologiques	87
5.2.2 Variations de l'aire membranaire et ouverture de pores durant la phase II	89
5.2.2.1 Délai entre deux ouvertures de pores	90
5.2.2.2 Evolution du module élastique et de la tension de membrane lors de la perméabilisation	91
5.3 Oxydation de membranes composées de PC, PE et cardiolipide	94
5.3.1 Effets du PE	95
5.3.2 Comportement d'une IM-GUV oxydée	95
5.4 Discussions	98
5.4.1 Origine de l'augmentation de la pression osmotique responsable des cycles de gonflement	98
5.4.2 Défauts membranaires et perméabilisation	98
Conclusion du chapitre	99

6 Influence des insaturations des chaînes carbonées dans la résistance des membranes au stress oxydant	101
6.1 Transitions de forme et perméabilisation	103
6.1.1 Transitions de forme durant la phase A	103
6.1.2 Perméabilisation	104
6.1.3 Module élastique et tension de membrane	106
6.2 Chimie en temps réel de l'oxydation photo-induite	107
6.2.1 Pics principaux des spectres Raman des lipides	108
6.2.2 Evolution temporelle des spectres Raman	109
6.3 Discussions	111
6.3.1 Temps de début de perméabilisation	111
6.3.2 Nécessité de la délocalisation des électrons	112
Conclusion du chapitre	113
Conclusions générales et perspectives	115
Annexes	125
A.1 Macro ImageJ utilisée pour le repérage des contours des vésicules	126
A.2 Macro ImageJ utilisée pour la quantification du contraste	126
A.3 Macro ImageJ d'ajustement de l'exponentielle décroissante du contraste des vésicules	127

Chapitre 1

Introduction

Table des matières :

1.1 De l'eau aux bicouches lipidiques	5
1.1.1 L'eau	5
1.1.2 Amphiphiles et organisation spontanée	8
1.1.3 Les lipides	10
1.2 Structure membranaire dans la cellule	11
1.2.1 Composition	11
1.2.2 Compartimentation et asymétrie	15
1.2.3 Les mitochondries	16
a) Historique	16
b) Description	17
c) Production d'ATP et mort cellulaire	19
d) Liens entre fonction, structure et cardiolipide	23
1.3 Oxydation du vivant	26
1.3.1 Initiateurs de l'oxydation	26
1.3.2 Stress oxydant	28
1.3.2.1 Lésions des molécules biologiques	28
1.3.2.2 Péroxydation des lipides	29
1.3.2.3 Produits d'oxydation des lipides	30
1.3.2.4 Mécanismes de régulation cellulaire de l'oxydation	31
1.4 Objectifs du travail présenté	32
1.5 Organisation du manuscrit	32

1 Introduction

Au cours de l'évolution, les cellules se sont adaptées à l'apparition d'une forte proportion de dioxygène dans l'atmosphère [Gould, 1991]. Des organites particuliers, les mitochondries, sont apparus au sein des cellules eucaryotes. L'hypothèse la plus couramment acceptée, appelée hypothèse endosymbiotique, est que ces mitochondries ont été acquises par les cellules primitives par endocytose d'une α -protéobactérie. Ces organismes ont apporté aux cellules eucaryotes les mécanismes aptes non seulement à limiter les effets délétères du dioxygène, jusque là toxique pour la cellule, mais aussi à tirer partie de son abondance [Brenner et al., 2005].

La chaîne respiratoire, présente dans les mitochondries, produit davantage d'énergie que la glycolyse seule (de l'ordre de 10 à 15 fois plus) en catalysant une cascade de réactions utilisant l'oxygène et les produits de la glycolyse. Ces réactions sont des réactions d'oxydation : il s'agit, pour une molécule, d'une perte d'électrons [Alberts et al., 1990]. Le fonctionnement de la chaîne respiratoire engendre une production importante d'espèces réactives de l'oxygène. Il a été montré que ces espèces interviennent dans la transduction des signaux [Reczek et Chandel, 2015], dans la différenciation cellulaire [Sauer et al., 2001], dans le fonctionnement de la mémoire [Dawson et al., 1992], dans la fécondation [Agarwal et al., 2006] et dans la régulation des gènes [Dalton et al., 1999] notamment.

L'oxydation est essentielle au fonctionnement et à la vie de la cellule mais une concentration excessive de ces espèces réactives de l'oxygène est aussi la cause de dommages importants dans la cellule, pouvant conduire à sa mort, voire à la mort de l'organisme. La mort programmée de la cellule, l'apoptose, est cependant une façon pour l'organisme de circonscrire ce problème. L'ADN subit des lésions en permanence conduisant parfois à des mutations ponctuelles entraînant une carcinogénèse (formation d'une cellule cancéreuse) [Aust et Eveleigh, 1999]. Notons d'ailleurs que les agents cancérigènes sont souvent générateurs de radicaux libres (UV, alcool, amiante, ...). De nombreuses protéines sont également altérées par l'oxydation et sont alors inactivées [Favier, 2003]. Enfin, l'oxydation a de nombreux effets sur les membranes lipidiques [Heuvingh et Bonneau, 2009 ; Riske et al., 2009 ; Kerdous et al., 2011].

Les membranes lipidiques délimitent la cellule et chacun des organites qui la composent. Il existe ainsi un milieu intra-cellulaire et un milieu extra-cellulaire, dont les compositions et propriétés physico-chimiques peuvent être différentes et contrôlées. De même, dans les cellules eucaryotes, chaque organite possède un milieu interne aux propriétés spécifiques que sa membrane permet de maintenir, à la fois, grâce à la barrière lipidique qui la constitue et grâce aux protéines qui y sont présentes.

L'oxydation des lipides, en modifiant leur nature chimique, modifie les propriétés physiques de la membrane : cette dernière peut perdre sa fonctionnalité et son intégrité,

entraînant bien souvent la mort cellulaire. Par ailleurs, un changement de la structure chimique des lipides peut altérer le fonctionnement des protéines membranaires.

Dans la membrane mitochondriale interne, en particulier, la nécessité de contrôler le niveau d'oxydation est particulièrement critique : il doit être suffisant pour le bon fonctionnement de la chaîne respiratoire mais pas trop élevé sous peine de mort cellulaire ou de nombreuses pathologies. Les maladies neuro-dégénératives (maladies d'Alzheimer ou de Parkinson par exemple) [Desport et Couratier, 2002], certaines myopathies (comme le syndrome de Barth) [Acehan et al., 2011], des cancers [Aust et Eveleigh, 1999] impliquent des dommages cellulaires dus à l'oxydation. Une oxydation excessive est également associée au vieillissement des cellules [Finkel et Holbrook, 2000]. En particulier, c'est le stress oxydant intervenant au sein des mitochondries qui semble avoir un rôle particulier dans le vieillissement [Lenaz et al., 2002 ; Cui et al., 2012 ; Cadenas et Davies, 2000 ; Sastre et al., 2003]. Il existe d'ailleurs une espèce de mollusques, *Arctica Islandica*, dont la longévité est corrélée avec la grande résistance à l'oxydation de ses membranes mitochondriales [Munro et Blier, 2012].

Ainsi l'intégrité des membranes mitochondriales est de première importance dans la vie d'une cellule, alors même qu'elle subie continûment une oxydation, induite en partie par son propre fonctionnement.

A travers ce premier chapitre introductif, nous expliquerons comment la nature chimique des lipides, en interaction avec l'eau, aboutit à la constitution de membranes lipidiques. Nous étudierons ensuite leurs rôles biologiques, en nous focalisant sur les membranes mitochondriales. Dans une dernière partie, nous ferons le bilan des effets, bénéfiques ou dommageables, de l'oxydation des molécules biologiques sur les cellules.

1.1 De l'eau aux bicouches lipidiques

1.1.1 L'eau

L'eau est le principal constituant des êtres vivants et un élément indispensable à toute forme de vie [Brack, 1993]. En volume, l'eau représente environ 70% du corps humain [Schloerb et al., 1950]. En outre, l'eau possède plusieurs propriétés physiques particulières, différentes de celles observées pour des composés chimiquement proches. Ses températures de solidification et d'ébullition, à pression atmosphérique, sont étonnamment élevées (fig. 1) comparées à celles du sulfure d'hydrogène H_2S (respectivement $-85^{\circ}C$ et $-60^{\circ}C$), du sélénure d'hydrogène H_2Se ($-66^{\circ}C$ et $-41,4^{\circ}C$) ou du tellure d'hydrogène H_2Te ($-49^{\circ}C$ et $-2,2^{\circ}C$) alors que ces molécules ont une structure électronique analogue (valeurs issues de [PubChem Open Chemistry Database]).

L'eau est liquide à température ambiante et à pression atmosphérique et cette caractéristique est nécessaire à la vie. La biochimie que nous connaissons est d'ailleurs, de façon générale, une chimie dans l'eau. En effet, l'état liquide de l'eau permet le mouvement des molécules qui y sont dissoutes, ce qui n'est pas le cas de son état solide, et permet également une fréquence des rencontres entre molécules plus élevée qu'à l'état gazeux, augmentant ainsi la probabilité des réactions chimiques.

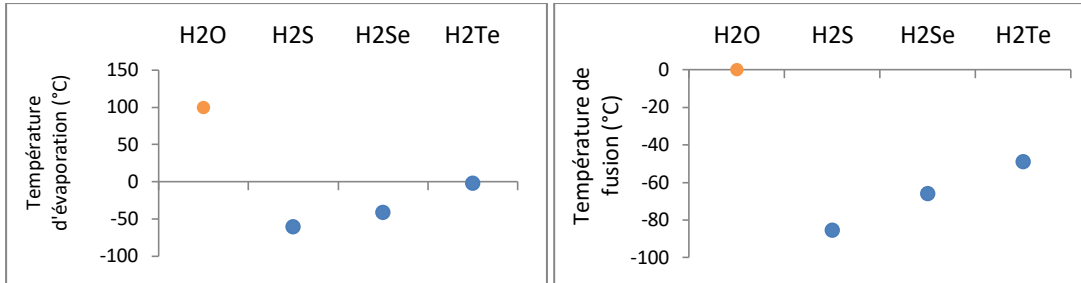


Figure 1 : Température d'évaporation et d'ébullition (à pression atmosphérique) des composés de même valence que l'oxygène, et di-hydrogénés

Ces propriétés particulières s'expliquent par la structure électronique de la molécule H_2O [Campbell et Farell, 2007]. L'atome d'oxygène, doté d'un petit noyau et de 6 électrons de valence, est un des atomes les plus électronégatifs, derrière le fluor, alors que les atomes d'hydrogène le sont peu (dans l'échelle d'électronégativité de Pauling, $\chi_O = 3,4$ et $\chi_H = 2,1$ [Rumble, 2017]). Les électrons des liaisons covalentes sont donc attirés davantage par l'oxygène, le dotant alors de 2 charges négatives partielles. D'autre part, les 2 doublets non-liants de l'oxygène et les deux liaisons qu'il forme avec les hydrogènes adoptent une structure tétraédrique, conférant un angle de 105° entre les 2 liaisons $O - H$ de la molécule. La répartition des charges entre oxygène et hydrogènes, ainsi que la géométrie coudée de H_2O induisent un moment dipolaire $\vec{\mu}$, intrinsèque à la molécule d'eau (fig. 2).

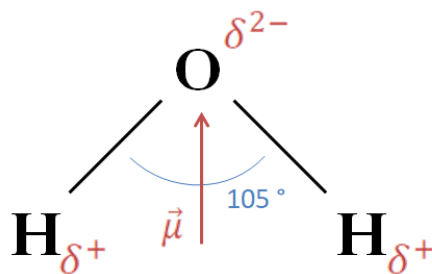


Figure 2 : Représentation de la molécule H_2O . La répartition des charges électriques partielles entre O et H et la géométrie non linéaire de la molécule induisent un moment dipolaire.

De ce fait, des molécules d'eau proches s'orientent selon les interactions entre leurs moments dipolaires : les atomes d'oxygène d'une molécule se lient à un atome d'hydrogène d'une autre. Cette liaison est appelée liaison hydrogène (ou liaison H). L'énergie d'une telle liaison est de l'ordre de 20 kJ/mol , c'est-à-dire plus grande que pour une liaison de type Van der Waals (de quelques dizaines de J/mol à quelques kJ/mol)

mais inférieure d'un ordre de grandeur à une liaison covalente (quelques centaines de kJ/mol) [Nelson et Cox, 2008].

En moyenne, 4 liaisons H se forment autour d'une molécule d'eau et s'arrangent selon un tétraèdre autour de l'oxygène. Cette organisation crée, à plus large échelle, un réseau tridimensionnel de molécules d'eau [Geiger et al, 1979]. A température ambiante, l'énergie thermique est du même ordre que l'énergie de dissociation d'une liaison H. Les liaisons H ont donc une durée de vie courte (de l'ordre de la picoseconde) [Sciortino et Fornili, 1989], c'est pourquoi l'eau liquide n'a pas un comportement viscoélastique à l'échelle de temps classiquement perceptible (quelques secondes). On peut cependant mettre ce comportement en évidence par exemple en mesurant la vitesse d'un son dont la période est inférieure à la durée de vie de la liaison H dans l'eau : cette vitesse est deux fois supérieure à celle d'un son de fréquence plus basse, et donc comparable à celle du son dans la glace [Sciortino et Sastry, 1994].

Les liaisons H confèrent à l'eau ses propriétés physiques particulières. Elles rendent l'eau liquide plus compacte et même plus dense que l'eau solide (densité de la glace : entre 0,91 et 0,94 selon qu'elle soit cristalline ou amorphe [Bragg, 1921 ; Ghormley et Hochanadel, 1971]), ce qui a pour conséquence que la glace flotte sur l'eau liquide. Cette propriété n'est d'ailleurs partagée que par très peu de composés, comme le gallium [Lide, 2009]. En outre, lors d'un changement d'état de l'eau, par exemple de l'état liquide à l'état gazeux, il est nécessaire d'apporter une énergie supplémentaire pour rompre ces liaisons. Cela explique les températures d'ébullition et de solidification élevées de l'eau.

Figure 3 : Représentation schématique du comportement des molécules d'eau autour d'une molécule amphiphile [Nelson et Cox, 2008]

Les liaisons H ne sont pas exclusives à l'eau. Elles se forment entre un atome électronégatif et un atome d'hydrogène covalamment lié à un autre atome électronégatif. Ainsi les molécules d'eau peuvent créer des liaisons hydrogène avec le groupement $-OH$ d'un alcool, ou bien avec le groupement carbonyle d'une cétone par exemple [Nelson et Cox, 2008]. De manière générale, l'eau est un bon solvant pour les molécules polaires car de nouvelles liaisons H peuvent s'établir, stabilisant ainsi l'ensemble du réseau formé. Ces molécules sont dites hydrophiles. A l'inverse, l'introduction d'une molécule apolaire dans

un milieu aqueux déstabilise le réseau de l'eau, qui se ré-organise de manière à isoler cette molécule (fig. 3). Cette configuration diminue l'entropie des molécules du réseau formé et rend donc fortement défavorable la solvation de molécules apolaires dans l'eau: c'est l'effet hydrophobe. Si les molécules apolaires ne sont pas solubles dans l'eau, c'est donc pour des raisons essentiellement entropiques et non énergétiques.

1.1.2 Amphiphiles et organisation spontanée

Les amphiphiles sont des molécules constituées à la fois d'une partie hydrophobe (apolaire : une chaîne carbonnée ou des cycles aromatiques par exemple) et d'une partie hydrophile (polaire). Toutefois, ces deux parties ne sont pas indépendantes : un groupement peu polaire lié à une très longue chaîne carbonnée ne donnera pas une molécule amphiphile, l'hydrophobie l'emportant sur l'hydrophilie dans ce cas. Il est donc nécessaire que l'importance de ces deux zones soit équivalente soit par leur taille, soit par leur polarité [Nelson et Cox, 2008].

En milieu aqueux, le coût énergétique et entropique des contacts entre molécules amphiphiles et molécules d'eau est d'autant plus faible que les parties hydrophiles sont exposées à l'eau, et que les parties hydrophobes ne le sont pas. Ce compromis peut être obtenu de 2 façons : la répartition des amphiphiles à une interface entre l'eau et un milieu apolaire, ou une auto-organisation des amphiphiles.

○ Répartition à l'interface :

S'il existe dans le système une interface entre milieu aqueux et milieu non-aqueux (entre eau et air ou entre eau et huile par exemple), les amphiphiles se placent à la surface, exposant leur partie polaire à l'eau et leur partie apolaire à l'autre milieu. La tension de surface, coût énergétique dû au fait que les molécules d'eau à l'interface établissent moins de liaisons hydrogène, diminue en présence d'amphiphiles : leur partie polaire stabilise le réseau de l'eau en diminuant le nombre de H_2O en surface. Pour cette raison, ces molécules amphiphiles sont appelées tensioactifs.

Une expérience réalisée par Benjamin Franklin en 1762 a montré qu'une simple cuillère d'huile (environ 2 mL) s'étale sur presque un quart de la surface de l'eau de l'étang de Clapham en Angleterre, ce qui correspond à environ 10^{23} molécules, répandues sur 2000 m^2 [De Gennes, 1992]. Si davantage d'amphiphiles que ne peut en accepter l'interface se présentent, la minimisation de l'énergie entre l'eau et les amphiphiles s'établit alors par l'auto-organisation des amphiphiles dans le milieu aqueux.

- Auto-organisation :

Les molécules amphiphiles s'auto-organisent en structures permettant de rassembler leurs parties hydrophobes tout en exposant leurs parties hydrophiles à l'eau. L'une des organisations possibles est l'organisation en micelles, par exemple, dans laquelle les molécules amphiphiles forment une boule dont la surface est constituée des parties polaires (ainsi exposées au milieu aqueux) et qui protège les parties hydrophobes, regroupées à l'intérieur de la structure. Il peut également exister des micelles cylindriques, des « tubes », formés de la même manière, ou encore des bicouches, c'est-à-dire deux plans parallèles contenant les parties hydrophiles et définissant un volume entre les plans contenant les parties hydrophobes (fig. 5).

Figure 4 : Organisation de lipides en micelle. Les chaînes carbonnées, hydrophobes, constituent le cœur de la micelle. Les têtes polaires, hydrophiles, se situent en surface, exposées au milieu aqueux. La répulsion stérique et/ou électromagnétique assure une distance minimale entre les têtes [Israelachvili, 2011].

Le type de structure le plus stable pour une espèce d'amphiphile est essentiellement déterminé par la géométrie préférentielle de la molécule. Les parties hydrophobes tendent à se regrouper, ce qui va dans le sens d'une diminution de la surface de l'interface "structure amphiphile - eau" alors que les parties polaires tendent à s'éloigner, soit par contrainte stérique, soit par répulsion de charge, ce qui va dans le sens d'une augmentation de la surface de cette même interface. La structure la plus favorable énergétiquement dépend ainsi du paramètre d'empilement de la molécule amphiphile considérée, c'est-à-dire du ratio entre le volume occupé par la ou les chaînes hydrophobes (v) et le volume du cylindre dont la base est l'aire de la tête polaire (a_0) et la hauteur est la longueur effective (l_c) de la chaîne carbonnée : $\frac{v}{a_0 l_c}$ (fig. 4).

1.1.3 Les lipides

Figure 5 : Correspondances entre des molécules amphiphiles (dont les lipides font partie), leur paramètre d'empilement, la forme géométrique virtuelle associée et le type de structure spontanément formée. Les zones noires dans la dernière colonne schématise la géométrie moyenne adoptée par la molécule amphiphile. [Israelachvili, 2011]

Les lipides sont des molécules amphiphiles, dont la partie hydrophile est un groupement appelé "tête polaire", et la partie hydrophobe une ou plusieurs chaîne(s) carbonée(s), de longueur et de saturation variables. Comme pour les autres amphiphiles, c'est leur paramètre d'empilement qui définit la structure qu'ils forment en milieu aqueux (fig. 5).

Apportons quelques précisions sur la définition de a_0 et de l_c dans le cas des lipides. a_0 est la surface autour du groupement hydrophile pour laquelle la répulsion entre parties hydrophiles et l'attraction entre parties hydrophobes s'équilibrent. D'autres effets peuvent également modifier a_0 , notamment la courbure de la membrane, que nous discuterons plus loin. La longueur de la partie hydrophobe l_c correspond à une extension critique de la chaîne carbonée du lipide : une extension plus faible reste possible mais une extension plus longue n'est favorable ni entropiquement ni énergétiquement, à la manière des polymères d'une extension supérieure à leur rayon de giration [Etienne et David, 2012]. Cette longueur l_c est donc inférieure à la longueur maximum de la chaîne carbonée, mais reste du même ordre de grandeur [Gruen, 1985].

Certains lipides ont un paramètre d'empilement compris entre 1/2 et 1, et s'auto-organisent donc en milieu aqueux sous la forme de vésicules lipidiques (fig. 5) : une bicouche sphérique fermée. Selon le paramètre d'empilement des lipides de la vésicule, on peut estimer son rayon minimum par [Israelachvili et al., 1975] :

$$R \approx \frac{l}{1 - \frac{v}{a_0 l_c}} \quad (1.1)$$

Remarquons que $\frac{v}{a_0 l_c} = 1$ mène ainsi à $R \rightarrow \infty$, c'est-à-dire à une structure de bicouche plane.

L'auto-arrangement des lipides en bicouches est d'une importance cruciale en biologie, car cette organisation correspond à la structure de base des membranes biologiques.

1.2 Structure membranaire dans la cellule

1.2.1 Composition

Un des modèles de membrane biologique le plus couramment admis, le modèle de mosaïque fluide (fig. 6), a été décrit par SJ Singer [Singer, 1972]. Dans ce modèle, les lipides constituent une bicouche plane, qui sert de matrice aux protéines membranaires. Lipides et protéines sont libres de mouvements latéraux dans le plan de la bicouche (d'où le terme "fluide"), ainsi que de mouvements de rotation axiale sur eux-mêmes. Le coefficient de diffusion latérale moyen des lipides dans une large variété de membranes

biologiques est de l'ordre de $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [Berg et al., 2002] (notons que cette valeur est de l'ordre de 10 fois plus grande pour des membranes modèles [Lahda et al., 1996]), un lipide peut ainsi visiter la surface de la membrane plasmique d'une cellule en quelques minutes. Pour les protéines, le coefficient de diffusion latérale peut varier sur plusieurs ordres de grandeurs selon sa taille et son affinité et son ancrage dans les lipides de la membrane. Par exemple, il est de l'ordre de $0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour une rhodopsine [Wey et al., 1981] et de l'ordre de $10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour une fibronectine ancrée à la membrane plasmique par des filaments d'actine [Berg et al., 2002]. Notons que le coefficient de diffusion latérale dépend de la composition de la membrane. Les mesures diffèrent d'ailleurs selon qu'elles sont effectuées sur membranes modèles ou sur cellules. Une plus forte concentration de protéines a notamment tendance à faire décroître ce coefficient [Jacobson et al., 1987].

En revanche, les mouvements de lipides ou de protéines d'un feuillet vers l'autre (appelés flip-flop ou diffusion transverse) sont restreints (pour un phospholipide, on compte en moyenne un flip-flop en plusieurs heures [Smith et Green, 1974]), ce qui induit la possibilité d'asymétrie de composition entre les deux feuillets de la membrane. Ce modèle, qui a maintenant plus de quarante ans reste pourtant pertinent dans la plupart des études menées sur les membranes [Nicolson, 2013].

Figure 6 : Modèle membranaire de la mosaïque fluide. Lipides et protéines sont libres de déplacements latéraux dans le plan de la membrane tandis que les mouvements d'un feuillet à l'autre sont fortement restreints. [Nelson et Cox, 2008]

Les lipides constituant les membranes biologiques sont extrêmement variés : il existe plusieurs natures de tête polaire, des chaînes carbonées de longueurs différentes et plus ou moins insaturées. Une classification des lipides en 7 catégories est généralement admise [Fahy et al., 1994].

- Les mono-, di- ou **triglycérides** (aussi nommés acylglycérols) selon le nombre d'acides gras qui estérifient le glycérol, sont les lipides constituant les graisses animales et végétales et permettent de stocker l'énergie métabolique. Leur

dégradation permet la production de grandes quantités d'ATP. En moyenne, les glycérides permettent de stocker 38 kJ d'énergie par gramme de lipides [Berg et al., 2002].

- Les **glycolipides** sont des monosaccharides estérifiés ou amidifiés par des acides gras. Ils se situent généralement sur la face externe des membranes cellulaires chez les eucaryotes et ont pour rôles principaux de faciliter les interactions entre cellules et de stabiliser les membranes lipidiques [Voet et al, 2013].
- Les **polycétides** sont chimiquement très variés : ils comprennent des macrolides (macrocycles de lactone liés à des sucres) mais également des polyènes, des polyéthers ou des tétracyclines. Il s'agit de métabolites secondaires, c'est-à-dire de composés non directement impliqués dans le développement ou la reproduction d'un organisme, mais qui lui sont néanmoins indispensables à long-terme. Il peut par exemple s'agir de toxines produites par un végétal [Huffman et al., 2010], d'un antibiotique [Robinson, 1991] ou même d'un insecticide.
- Les **lipides prénoliques** sont formés à partir de l'isoprène. Plusieurs sous-classes dérivées font partie des prénols, comme les caroténoïdes qui agissent comme anti-oxydants ou comme précurseurs de la vitamine A [Rao et Rao, 2007], ou comme les quinones dont dérivent notamment les vitamines E et K [Brunmark et Cadenas, 1989].
- Les **sphingolipides** sont des lipides dont le squelette est celui d'une sphingosine (un acide gras lié à 2 fonctions alcool et une fonction amine) et qui est lié à d'autres acides gras, et éventuellement, à d'autres groupements comme des sucres ou des groupements phosphate. Ils sont présents, entre autres, dans les membranes plasmiques. Ils ont un rôle important dans la transmission du signal impliquée dans la croissance des cellules, dans la différenciation de ces dernières, dans l'apoptose ainsi que dans la reconnaissance des cellules par le système immunitaire [Bartke et Hannun, 2009].
- Les **stérols** sont composés d'un noyau stérane avec un groupe OH sur le carbone 3. Divers acides gras ou groupements peuvent également être greffés sur le cycle à 5 carbones du stérane. Les stérols sont des constituants importants des membranes biologiques : ils incluent les stéroïdes qui agissent comme hormones ou vecteur de signalisation cellulaire, les acides biliaires, les phytostérols chez les plantes, ainsi que le cholestérol. Ce dernier intervient à de nombreux niveaux dans la cellule, et plusieurs pathologies sont liées à un excès ou à un déficit de cholestérol [Maxfield et Tabas, 2005]. Ce lipide se place au cœur des membranes modifiant profondément leur organisation et leur mécanique. L'oxydation de membranes contenant du cholestérol a d'ailleurs été étudié au sein de mon équipe de recherche [Kerdous et al., 2011].

- Les **phospholipides** sont constitués d'un groupe acide phosphorique lié à une molécule polaire (la partie hydrophile) ainsi qu'à, généralement, deux chaînes aliphatiques (la partie hydrophobe). Le nombre d'insaturations le long de ces chaînes carbonées modifie la mobilité des lipides dans la membrane : une insaturation forme un coude plus rigide qu'une liaison simple et nuit donc à l'alignement des lipides, augmentant ainsi la fluidité générale de la membrane [Kates et al., 1984]. Les phospholipides, avec les sphingolipides décrits précédemment, sont les principaux constituants des membranes biologiques. Ils participent également au métabolisme et à la signalisation cellulaire. Puisqu'il en sera question dans les études décrites dans ce manuscrit et qu'ils sont parmi les plus présents dans les membranes de cellules eucaryotes, citons parmi eux les phosphatidylcholines (PC), les phosphatidylethanolamines (PE) ou encore le diphosphatidyl-glycérol (ou cardiolipide).

Les protéines sont les autres constituants des membranes biologiques. Il s'agit de macromolécules, formées de chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Selon les organites, le ratio entre protéines et lipides est différent : de l'ordre de 50% (en masse) de protéines dans la membrane plasmique [Cooper et Hausman, 2004], entre 15 et 30% de protéines dans les membranes myélinisées isolant les axones des cellules nerveuses [Morell et Quarles, 1999]. Dans le cas de la membrane interne des mitochondries, la proportion de protéines est de l'ordre de 70% [Haller-mayer et Neupert, 1973 ; Schenkel et Bakovic, 2014]. Les protéines étant des molécules bien plus grosses que les lipides, le rapport protéines sur lipides en nombre de molécules dans une membrane est plutôt de l'ordre de 1 pour 50 [Alberts et al., 1990].

La nature des protéines varie également selon l'organite, avec certaines régions d'un même organite et même entre les deux feuillettes d'une même membrane. Les protéines ont des fonctions spécifiques : par exemple, les enzymes catalysent de nombreuses réactions telles que la glycolyse, des canaux protéiques transmembranaires actifs ou passifs transportent ou autorisent la diffusion de molécules spécifiques à travers la membrane, les glycoprotéines interviennent dans la reconnaissance intercellulaire. L'efficacité et le fonctionnement des protéines membranaires dépendent cependant de leur environnement lipidique, de la proximité de certaines autres protéines et de la disponibilité de ressources, facteurs pour lesquels la compartimentation et l'asymétrie de composition membranaire jouent un rôle essentiel.

1.2.2 Compartimentation et asymétrie

L'importance de la compartimentation, c'est-à-dire le fait que plusieurs milieux aux propriétés physiques et chimiques différentes soient définis au sein d'une cellule, ainsi que

de l'asymétrie de composition membranaire, s'illustre à travers de nombreuses fonctions des organites cellulaires.

Les **lysosomes**, par exemple, sont de petites vésicules de 0,5 μm de diamètre présents dans les cellules eucaryotes (à l'exception des hématies). Leur membrane permet la séparation de leur milieu interne, dans lequel le pH est maintenu au voisinage de 5 grâce à des pompes à protons membranaires, du cytosol, dans lequel le pH est voisin de 7,2. Les enzymes contenues dans le lysosome, dont le rôle est la digestion intra-cellulaire contrôlée, sont des hydrolases acides, fonctionnant de manière optimale lorsque le pH est de l'ordre de 5. Ainsi, la compartimentation des milieux permet le confinement et l'efficacité des enzymes lysosomales. [Weissmann, 1965 ; Bainton, 1981]

La **membrane plasmique** a pour rôle premier de délimiter une cellule : la semi-perméabilité de cette membrane assure le maintien, dans le cytosol, du pH et de la concentration de nombreux ions et molécules. La membrane plasmique est enrichie en sphingolipides et en stérols (fig. 7) [Van Meer et al., 2008]. Ces deux lipides sont connus pour augmenter la résistance de la membrane au stress mécanique et pour assurer la préservation de son intégrité [London et Brown, 2000]. Cependant, la composition des deux feuillet de la membrane plasmique est très différente, on parle d'asymétrie de composition : les lipides terminant par une choline (phosphatidylcholine et sphingomyéline) sont préférentiellement situés dans le feuillet externe, quand les lipides dotés d'un groupement aminé terminal (phosphatidyléthanolamine ou phosphatidylsérine) sont préférentiellement situés dans le feuillet interne. Cette asymétrie de composition engendre une asymétrie des charges électriques significative. Cette répartition des charges est nécessaire au fonctionnement de certaines protéines, comme par exemple la protéine kinase C [Newton, 1993], une protéine impliquée dans de nombreuses cascades de signalisation, notamment, dans les mécanismes de la mémoire. Les glycolipides, présents uniquement en surface de la cellule, c'est-à-dire sur le feuillet externe de la membrane plasmique sont un autre marqueur de l'asymétrie de cette membrane [Yamakawa et Nagai, 1978]. Certains de ces glycolipides : les sulfatides et les gangliosides, sont impliqués dans le fonctionnement des pompes à ions sodium-potassium, protéines transmembranaires échangeant les 2 ions en question à contre-gradient à travers la membrane en consommant de l'ATP [Curatolo, 1987]. Les glycolipides sont également des marqueurs de surface [Hakomori, 1975]. Dans les membranes plasmiques d'érythrocytes, les glycolipides sont des sites antigéniques et sont d'une grande importance en médecine car ils interviennent dans la détermination du groupe sanguin du système Kell, système complémentaire aux systèmes ABO et Rhésus [Westhoff et Reid, 2004].

L'asymétrie de composition lipidique de la membrane plasmique prend naissance dans le **reticulum endoplasmique**, organite des cellules eucaryotes où sont produits la grande majorité des lipides de la membrane plasmique, des membranes mitochondriales, de l'appareil de Golgi... Les phospholipides sont produits dans le feuillet cytosolique du reticulum endoplasmique et des flippases assurent le maintien de la bicouche en translocant des lipides du feuillet interne vers le feuillet externe. Les flippases étant spécifiques d'un type de lipides, elles sont responsables de la distribution asymétrique des lipides dans la membrane du reticulum [Banfield, 2011].

Figure 7 : Composition phospholipidique moyenne des membranes de différents organites [Van Meer et al., 2008]. La composition lipidique est ici exprimée en pourcentage du total des phospholipides chez les mammifères (en bleu foncé) et chez la levure (en bleu clair). Les encarts indiquent le pourcentage molaire de cholestérol et d'ergostérol dans ces membranes.

Compartimentation et asymétrie membranaire sont ainsi essentielles dans la régulation des échanges entre compartiments. Cela est également vrai et particulièrement important pour les membranes de mitochondries.

1.2.3 Les mitochondries

a) Historique

Des structures, identifiées bien plus tard comme étant les mitochondries, ont été plusieurs fois observées dès 1840, c'est-à-dire quelques années après la découverte du noyau cellulaire. Elles n'ont été reconnues comme formant un même organite qu'en 1890 par Altmann (fig. 8) [Altmann, 1894] qui les appellent alors "bioplastes".

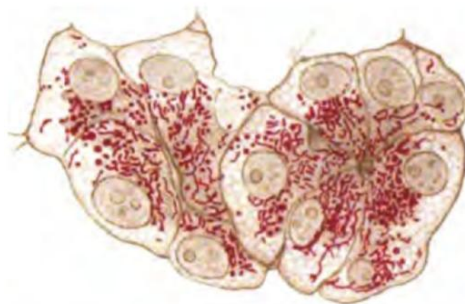


Figure 8 : Observation de cellules de foie d'une grenouille verte commune [Altman, 1894]. Il s'agit d'une des premières visualisations de mitochondries, bien qu'elles n'aient pas encore ce nom à l'époque.

Il faudra encore attendre 1898 pour que Carl Benda leur donne le nom de mitochondries, du grec "mitos" : fil ou ficelle et "chondros" : granule. Mitochondrie est donc un nom purement descriptif des observations et pour cause, jusqu'en 1934, il n'était possible que d'observer ces "granules en enfilade" au microscope électronique. En 1934 cependant est mis au point un protocole d'extraction d'une fraction de foie de cochon d'inde riche en mitochondrie [Bensley and Hoerr, 1934], ce qui a rendu possible les premières caractérisations biochimiques de cet organite. C'est ainsi que dans les années 1950, le "système de transfert d'électrons" permettant la respiration cellulaire est décrit [Hatefi et al., 1962], de même que la structure des mitochondries.

b) Description

Figure 9 : (A gauche) Schéma d'une mitochondrie. *Illustration* : Tutorvista. (A droite) Micrographies électroniques illustrant la diversité et les points communs structurels entre les mitochondries de différents tissus. Barre d'échelle : 200 nm [Vafai et Mootha 2012]

Les mitochondries sont généralement décrites comme des cylindres d'environ 1 μm de diamètre et de 1 à 7 μm de long. Cependant, on sait que ces organites changent de forme constamment : ils se raccourcissent, s'allongent, gonflent, se ramifient et même fusionnent et se séparent d'autres mitochondries [Bereiter-Hahn et Vöth, 1994 ; Hom et Sheu, 2009].

Chaque mitochondrie est délimitée par deux membranes : la membrane mitochondriale externe et la membrane mitochondriale interne (MIM), délimitant ainsi trois milieux : le milieu externe (c'est-à-dire le cytoplasme de la cellule), l'espace intermembranaire (entre les deux membranes), et la matrice mitochondriale (fig. 9).

La membrane externe est constituée de lipides et de protéines dont le rapport en masse est de l'ordre de 0,9 μg de lipides pour 1 μg de protéines [Comte et al., 1976]. La plupart de ces protéines sont des porines, c'est-à-dire des canaux permettant les échanges de petites molécules et ions entre l'extérieur de la mitochondrie et l'espace intermembranaire.

La membrane interne est très différente. Elle est formée de nombreuses convolutions de 30 à 40 nm de large [Lea et al., 1994], appelés crêtes ou cristae, qui micro-compartimentent la membrane interne [Mannella, 2006]. Du fait de ces repliements, la quantité de membrane interne est particulièrement importante : la surface totale de la membrane interne est égale à environ 5 fois la surface de la membrane plasmique [Coopes et Hausman, 2007].

La membrane mitochondriale interne contient 0,5 μg de lipides pour 1 μg de protéines [Comte et al., 1976]. Environ 70% en masse des protéines correspondent aux complexes protéiques de la chaîne de transfert d'électrons ainsi qu'à l'ATP-synthétase [Alberts et al., 1990]. Sa composition lipidique diffère également de celles des autres membranes de la cellule. En particulier, elle contient en forte proportion un lipide spécifique : le cardiolipide (de l'ordre de 18%) (fig. 10) [Daum, 1984; Krebs et al., 1979; Ren et al., 2014].

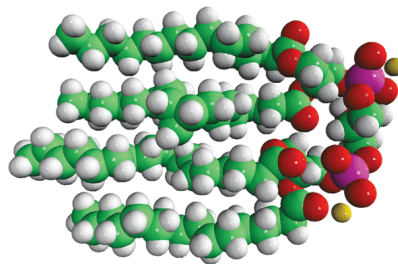


Figure 10 : Structure chimique du cardiolipide. En vert sont représentés les atomes de carbone, en rouge les oxygènes, en blanc les hydrogènes, en violet les phosphate et en jaune les contre-ions sodium. *Image provenant du site internet de Avanti Polar Lipids.*

Le nom "cardiolipide" vient du fait que ce lipide a au départ été découvert dans des cellules cardiaques. On sait aujourd'hui qu'il est présent et produit dans toutes les mitochondries. Le cardiolipide est constitué de deux phosphatidylglycérol liés entre eux par des liaisons ester sur un glycérol. Le cardiolipide comporte ainsi quatre chaînes aliphatiques. Ce lipide est responsable de l'imperméabilité très élevée aux ions et aux grosses molécules de la membrane interne mitochondriale, qui reste perméable aux seules molécules de dioxygène, de dioxyde de carbone et d'eau.

Les mitochondries possèdent leur propre ADN, l'ADN mitochondrial, dont le fonctionnement est différent de l'ADN contenu dans le noyau cellulaire. Par exemple, une même séquence de bases code pour des protéines différentes dans le noyau et dans la

mitochondrie : UGA est un codon "stop" dans l'ADN du noyau mais code pour du tryptophane dans l'ADN mitochondrial des mammifères [Barell et al., 1979]. D'autre part, les mitochondries se divisent par scissiparité, indépendamment de la division de la cellule [Kuroiwa et al., 1998]. L'ADN mitochondrial et la reproduction par scissiparité sont les arguments forts de l'hypothèse endosymbiotique, selon laquelle les mitochondries proviennent de l'incorporation, au cours de l'évolution, de certaines bactéries ou archées dans des cellules eucaryotes [Margulis, 1975 ; Margulis et Bermudes, 1985]. Un eucaryote, l'amibe *Paloxyma Palustris*, semble confirmer cette hypothèse car, dépourvue de mitochondrie, elle utilise cependant le métabolisme oxydatif des bactéries avec lesquelles elle est en symbiose [Van Bruggen et al., 1983]. Un autre organisme eucaryote, *Monocercomonoides sp.*, produit son énergie par un mécanisme similaire à celui des bactéries et semble montrer une perte des mitochondries au cours de son évolution [Karnkowska et al., 2016].

c) Production d'ATP et mort cellulaire

Les mitochondries ont un rôle important à la fois dans la vie et dans la mort de la cellule : elles génèrent l'ATP nécessaire au fonctionnement de la plupart des protéines de la cellule, et, sous certaines conditions, initient l'apoptose de la cellule.

Production d'ATP

La production d'énergie sous forme d'ATP dans la cellule est possible par deux voies. La première voie est celle de la glycolyse, c'est-à-dire l'utilisation et la dégradation de molécules de glucose, qui aboutit à la formation de pyruvate (étape 2 de la fig. 11). Mais les produits finaux peuvent encore libérer une grande quantité d'énergie par une oxydation plus poussée : la respiration, qui constitue la seconde voie de production d'ATP. Cette oxydation débute avec le cycle de Krebs et termine par la phosphorylation oxydative (étape 3 de la fig. 11). Le cycle de Krebs est constitué d'une série de réactions chimiques, catalysées par des enzymes présentes dans la matrice mitochondriale, démarrant avec l'acétyl CoA produit notamment à partir du pyruvate issu de la glycolyse. Ces réactions chimiques produisent, pour la plupart, du *NADH*, forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide (*NAD*), ou du *FADH₂*, forme réduite de la flavine adénine dinucléotide (*FAD*). Le transfert des électrons acquis par ces molécules lors du cycle de Krebs constitue la première étape de la phosphorylation oxydative.

Figure 11 : Schéma simplifié des réactions impliquées dans la production d'ATP, de la glycolyse à la chaîne respiratoire [Alberts et al., 1990]

Le principe de cette phosphorylation oxydative est de convertir l'énergie chimique contenue dans des molécules de *NADH* et de *FADH₂* en l'énergie de liaison entre un groupement phosphate et une molécule d'Adénosine Di-Phosphate (ADP). Cette conversion est notamment possible grâce à une chaîne de transport d'électrons. Cette chaîne est constituée d'une série de complexes protéiques incluse dans la membrane

mitochondriale interne. Ces complexes, nommés I, II, III et IV, transfèrent des électrons depuis des espèces donneuses (comme le *NADH*) vers des espèces acceptrices. Chaque complexe ayant plus d'affinité pour les électrons que le complexe précédent, les électrons passent en cascade d'un complexe à l'autre, jusqu'à l'accepteur final : l'oxygène (fig. 12). Chacune de ces réactions oxydatives « pompe » des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, en traversant la membrane interne mitochondriale.

Figure 12 : La phosphorylation oxydative. Sont ici présentés les éléments intervenant dans la chaîne de transport d'électrons ainsi que l'ATP synthétase en bout de chaîne. Les électrons provenant des *NADH* sont transportés de complexe en complexe jusqu'à l'oxygène. A chaque étape de ce transport, des protons sont pompés de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Le gradient ainsi établi fournit l'énergie nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthétase, qui produit alors l'ATP. [Krauss 2001]

Le gradient électrochimique de protons établi par ce pompage est consommé lors du fonctionnement de l'ATP-synthétase [Mitchell et Moyle, 1967]. Cet important complexe protéique enzymatique (environ 15% en masse des protéines de la membrane interne) assemble une molécule d'ADP (adénosine diphosphate) et un phosphate pour former l'ATP (fig.12). L'ATP-synthétase fonctionne à la manière d'un moteur moléculaire constitué d'un stator (les sous-unités α et β) et d'un rotor (les sous-unités c et γ) dont les 10 sous-unités sont disposées en couronnes (fig. 13). L'entrée d'un proton au niveau du rotor modifie deux des sous-unités qui le compose : l'une est protonée alors que la suivante est déprotonnée. La modification des charges de ces sous-unités entraîne une rotation de la couronne du rotor par interaction électrostatique avec le stator [Allison, 1998]. Cette rotation entraîne des changements cycliques de conformation des sous-unités constituant le stator et donc des changements cycliques d'affinité de ces protéines envers l'ADP et l'ATP. L'enchaînement cyclique des trois conformations possibles des sous-unités du stator catalyse la formation de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate en [Nakamoto et al., 1999] :

- i) se liant à un ADP et un phosphate
- ii) formant l'ATP à partir des deux réactifs
- iii) libérant l'ATP produit

Il y a ainsi un couplage entre le transport des protons et la synthèse de l'ATP par l'ATP synthétase.

Figure 13 : A) ATP synthétase. Les sous-unités α et β constituent le stator, les sous-unités c sont transmembranaires et constituent le rotor. Les protons, pompés de la matrice mitochondriale au niveau de la sous-unité a modifient les charges des sous-unités c . Les interactions électrostatiques entre ces dernières et le stator entraînent alors la rotation du rotor. [Nakamoto and al., 1999] **B) Cycle de l'ATP synthétase.** Des changements successifs de conformation des sous-unités de l'ATP synthétase, couplés à la rotation du rotor, conduisent à la formation d'ATP. Ces changements sont cycliques, le complexe retrouve sa conformation initiale après une rotation complète du rotor. [Lodish et al., 2007]

La phosphorylation oxydative est un processus chimique efficace. Chaque molécule de *NADH* fournit l'énergie nécessaire pour la production de 3 molécules d'ATP, chaque molécule de *FADH₂* pour celle de 2 molécules d'ATP en moyenne. Si on prend en compte toutes les réactions qui produisent de l'énergie à partir d'une molécule de glucose jusqu'à son oxydation complète, ce sont environ 130 molécules d'ATP qui sont créées [Alberts et al., 1990]. Cette quantité d'ATP pourra ensuite être consommée par la cellule, pour le fonctionnement de ses protéines. La réaction de décomposition de l'ATP en ADP et phosphate libère une énergie de l'ordre de $5 \cdot 10^{-23} J$ par molécule d'ATP [Rosing et Slater, 1972].

Mort cellulaire par apoptose

La mitochondrie est l'un des sites de contrôle du déclenchement de l'apoptose, la mort cellulaire programmée des cellules [Susin et al., 1998]. L'apoptose est une fonction physiologique, une auto-destruction cellulaire contrôlée et nécessaire à l'organisme. Contrairement à la nécrose, durant laquelle la membrane plasmique éclate, l'apoptose conserve l'intégrité de la membrane plasmique de la cellule. A la fin du processus, la cellule est ensuite proprement éliminée par l'organisme : elle expose des lipides (la phosphatidylsérine) constitutifs du feuillet interne de la membrane plasmique et est alors phagocytée par les macrophages évitant ainsi l'inflammation [White, 1999].

La voie mitochondriale de l'apoptose peut avoir pour origine une surexposition à des radiations ou à des toxines, une hyperthermie, une hypoxie, des infections virales ou

encore une forte concentration en radicaux libres [Elmore, 2007]. Quand l'intégrité de la membrane mitochondriale ne peut plus être préservée, son oxydation et sa perméabilisation sont les premiers signaux menant à la mort de la cellule (fig. 14). Le gradient de protons établi par le fonctionnement de la chaîne respiratoire, du fait de la perméabilité de la membrane, disparaît, ce qui participe à faire chuter le potentiel membranaire. Parallèlement, la chaîne respiratoire interrompt son fonctionnement. Le cytochrome c, une fois relâché dans le cytosol, s'associe à différentes protéines pour former un complexe nommé apoptosome. La caspase 9, enzyme cytosolique clivant les protéines, est activée par l'apoptosome et peut à son tour activer les autres protéines de la même famille, conduisant ainsi à la dégradation contrôlée des composants cellulaires [Susin et al., 1998 ; Desagher et Martinou, 2000].

Figure 14 : Premières étapes de l'apoptose. La peroxydation du cardiolipide (en jaune) provoque le relargage du cytochrome c (en violet) vers le cytosol. [Kagan and al., 2005] Cette peroxydation peut avoir pour origine une réaction avec une espèce réactive de l'oxygène, comme le peroxyde d'hydrogène.

d) Liens entre fonctions, structure et cardiolipide

En premier lieu, il faut souligner que la composition riche en cardiolipide de la membrane interne mitochondriale augmente l'imperméabilité de cette dernière aux protons [Chen et Li, 2001 ; Caprette, 2016]. La perméabilité des membranes lipidiques aux protons est, de manière générale, bien plus grande que celle aux autres ions (de l'ordre de 10^{-6} cm/s pour les protons et de 10^{-12} cm/s pour des ions potassium [Deamer et Akeson, 1994 ; Messerli et al., 2005]), et ce pour deux raisons : les protons sont petits et il semble qu'ils ne suivent pas le même mécanisme de traversée des membranes que les autres ions. La diffusion des ions à travers une membrane est décrite en trois étapes : passage de la phase aqueuse au feuillet qui y est exposé, passage dans l'autre feuillet, et enfin passage du second feuillet à la phase aqueuse de l'autre côté de la membrane. Cependant, un autre modèle est proposé pour le cas du proton, modèle dans lequel les protons sont transloqués le long d'une chaîne transitoire de molécules d'eau à travers la membrane

[Deamer et Akeson, 1994]. Les groupes phosphates du cardiolipide, cependant, captent des protons augmentant *de facto* l'imperméabilité de la membrane [Haines et Dencher, 2002].

Le cardiolipide est également connu pour être nécessaire à l'établissement et au maintien de la structure en crêtes dans des systèmes reconstitués mimant la membrane interne mitochondriale (fig. 16a) [Khalifat et al., 2008 ; Unsay et al., 2013]. Sur ces systèmes constitués de phospholipides (dont le cardiolipide), un gradient local de protons sur un des feuillet de la membrane protone les têtes lipidiques en surface, neutralisant ainsi leurs charges. La répulsion électrostatique entre tête polaire diminuant, l'aire par lipide sur le feuillet exposé au flux de protons diminue également. L'aire du feuillet exposé ne correspond alors plus à l'aire de l'autre feuillet, ce qui engendre une contrainte mécanique et induit une déformation. L'excès d'aire forme ainsi des repliements cylindriques, les crêtes mitochondriales. De multiples invaginations sphériques ou bien une plus grande invagination tubulaire sont énergétiquement favorables [Khalifat et al., 2008], mais le cardiolipide, de par sa structure chimique particulière orientée selon un plan, pourrait être à l'origine d'une stabilisation des structures cylindriques [Fournier et Galatola, 1998], telles les crêtes mitochondriales.

On sait également que l'ATP synthétase, sous forme de dimères, est nécessaire à l'établissement des crêtes mitochondriales (fig. 16b) [Giraud et al., 2002 ; Paumard et al., 2002 ; Davies et al., 2012] : des levures mutantes dont les ATP synthétases ne dimérisent pas présentent des membranes mitochondriales internes sans structure tubulaire et moins efficaces dans la production d'ATP. Les dimères d'ATP synthétases, ancrés dans la membrane, forment un cône tronqué et maintiennent localement la membrane en un arc rigide (fig. 15, A) [Allen et al., 1989 ; Allen, 1995]. Les ATP synthétases sont nombreuses et, pour la plupart (environ 95%), situées dans les crêtes [Gilkerson et al., 2013], il en résulte donc que l'action mécanique locale d'un dimère engendre par l'ensemble des dimères une stabilisation des structures tubulaires (fig. 15, B et C).

Figure 15 : Courbure membranaire induite par les dimères d'ATP synthétases (en jaune). A) Dimère d'ATP synthétases imposant une courbure locale à une membrane. B) Courbure imposée par 4 dimères. A) et B) sont des représentations obtenues par simulation « coarse-grained ». [Davies et al., 2012] C) Partie d'une tomographie d'une mitochondrie de foie de rat. Les dimères d'ATP synthétases sont alignés le long de la courbure de la crête. [Strauss et al., 2008]

Les dimères d'ATP synthétase sont donc favorables à la structure en crêtes des mitochondries et la réciproque est vraie également : la structure en crêtes optimise le fonctionnement de l'ATP synthétase (fig. 16b). En effet, les crêtes mitochondriales forment une nano-compartmentation qui pourrait éviter ou retarder la dissipation d'un gradient local de protons nécessaire à la production d'ATP [Frey et Mannella, 2000 ; Hahn et al., 2016]. Cette hypothèse est d'ailleurs appuyée par le fait que la densité de crêtes mitochondriales est plus élevée au sein de cellules demandant plus d'énergie (fig. 9) [Pollak et Sutton, 1980]. Par exemple on compte en moyenne trois fois plus de crêtes dans une mitochondrie de cellule cardiaque que dans celle d'une cellule hépatique.

La composition riche en cardiolipide de la membrane interne mitochondriale assure également la stabilité des complexes I, III, IV, du cytochrome c (fig. 16c) [Petereit et al., 2017 ; Robinson, 1982 ; Arnarez et al., 2013a ; Arnarez et al., 2013b; Eble et al., 1989]. Des zones particulières de la membrane, riches en cardiolipide, assurent une forte affinité avec ces complexes transmembranaires, lesquels adoptent dans ces zones une conformation optimale pour leur fonctionnement. D'autre part, comme pour l'ATP synthétase, la structure en crêtes participe à l'assemblage du supercomplexe de la chaîne respiratoire (c'est-à-dire des complexes de la chaîne respiratoire entre eux), et ainsi, à l'efficacité de cette dernière (fig. 16d) [Cogliati et al., 2013 ; Cogliati, 2016 ; Habersetzer et al., 2013].

Le cardiolipide établit des liens en deux sites différents avec le cytochrome c, une protéine de la chaîne respiratoire assurant le transfert des électrons entre les complexes III et IV. L'un des sites de liaison facilite les interactions électrostatiques entre les charges négatives du cardiolipide et les charges positives du cytochrome c, l'autre implique des interactions entre les parties hydrophobes des deux espèces [Rytömaa et al., 1992]. Ces interactions réduisent le potentiel d'oxydo-réduction du cytochrome c, le protégeant ainsi d'une réduction par le complexe III ou par un ion superoxyde [Bayir et al., 2007].

En plus de son implication dans la production d'ATP, le cardiolipide intervient à plusieurs étapes du processus d'apoptose (fig. 16e). Notamment, l'une des premières étapes de l'apoptose : la libération du cytochrome c et d'autres facteurs pro-apoptotiques, dépend de l'oxydation du cardiolipide [Kagan et al., 2005]. En effet, l'affinité du cytochrome c pour le cardiolipide diminue d'autant plus que ce dernier est oxydé [Ott et al., 2001]. De plus, le cardiolipide est nécessaire à l'activation de plusieurs protéines intervenant durant l'apoptose telles la caspase-8 [Gonzalvez et al., 2008], ainsi que tBid, Bax et Bak [Gonzalvez et al., 2005]. Le relargage du cytochrome c s'accompagne en outre de changement profond dans la structure de la membrane mitochondriale interne appelé remodelage des crêtes, et qui se caractérise par la fusion des crêtes [Wasilewski et Scorrano, 2009]. Durant l'apoptose, on observe également que la quantité de cardiolipides produite dans la mitochondrie diminue (fig. 16e) [Ostrander et al., 2001].

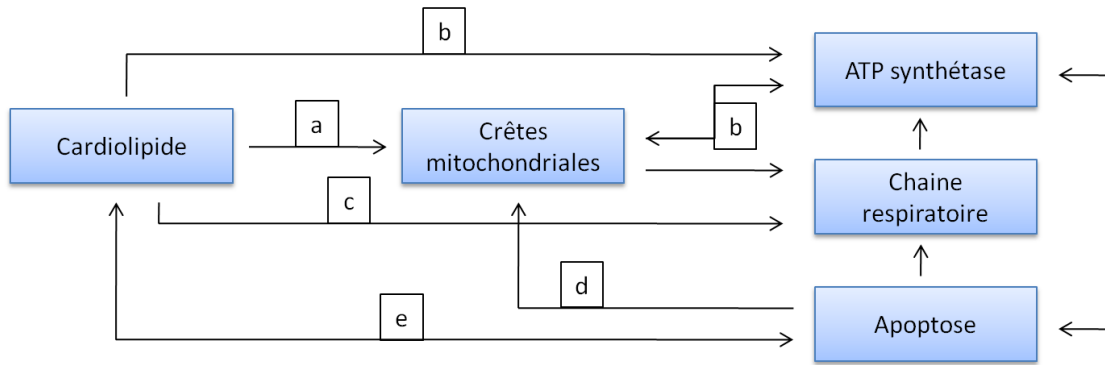


Figure 16 : Récapitulatif des liens établis entre la composition riche en cardiolipide, la structure en crêtes et les fonctions de production d'énergie et de mort cellulaire au sein de la membrane interne mitochondriale. Les lettres a, b, c, d et e se réfèrent ici au paragraphe précédent qui décrit ces liens plus précisément.

Ces mécanismes montrent les liens étroits entre composition spécifique, structure et fonction de la membrane mitochondriale interne et font apparaître, à de nombreuses reprises, l'importance de l'oxydation dans ces processus.

1.3 Oxydation du vivant

1.3.1 Initiateurs de l'oxydation

○ Oxygène moléculaire

L'oxydation des biomolécules peut être initiée par la molécule de dioxygène et fait intervenir un mécanisme radicalaire. Cependant, cette réaction est thermodynamiquement difficile. L'énergie d'activation de la réaction entre l'oxygène moléculaire et des acides gras insaturés est par exemple de l'ordre de 150 kJ/mol. La formation d'un radical reste possible en cas de fortes concentrations en oxygène et est favorisée par les élévations de température. L'oxygène moléculaire peut en revanche atteindre un état énergétique singulet, bien plus efficace à l'oxydation.

○ Oxygène singulet

La molécule de dioxygène, dans son niveau d'énergie le plus bas, est dans une configuration électronique d'état triplet : les deux électrons de valence se répartissent suivant deux orbitales π , leurs spins étant parallèles. Mais il existe un niveau de plus haute énergie dans lequel les électrons sont distribués différemment : une même orbitale et des spins opposés. Il s'agit de l'état singulet $^1\Delta_g$ de l'oxygène. L'oxygène singulet a une durée

de vie moyenne relativement longue (45 minutes en phase gaz, entre 10^{-6} et 10^{-3} secondes en phase liquide [Merkel and Kearns, 1971]). La transition de cet état vers l'état triplet de plus basse énergie est interdite, cela explique la longévité de cet état pourtant métastable. En spectroscopie d'émission, il est possible d'observer cette transition à 1275 nm, longueur d'onde ainsi utilisée pour mesurer le taux d'oxygène singulet produit.

Figure 17 : Représentation des états singulets et triplet de l'oxygène moléculaire [DeRosa et Crutchley, 2002]

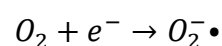
Il existe un autre état excité singulet de l'oxygène, $^1\Sigma_g^+$, dont l'énergie est plus haute que l'état singulet (fig. 17). Cet état a une durée de vie plus courte (quelques micro-secondes en phase liquide [Adams et Wilkinson, 1971]). La transition vers cet état peut également être utilisée pour suivre la concentration en oxygène singulet d'un échantillon, en observant l'absorption à 1920 nm [Snyder et al., 2006]. En phase aqueuse cependant, l'état $^1\Sigma_g^+$ est vite désexcité vers l'état singulet $^1\Delta_g$ [Schweitzer et Schmidt, 2003].

○ Autres espèces réactives de l'oxygène

Il existe d'autres espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour Reactive Oxygen Species), dérivées de l'oxygène moléculaire, dont les électrons de valence sont non appariés et qui les rendent ainsi très réactives. Ces ROS incluent ainsi les radicaux libres de l'oxygène, des peroxydes, des ions oxygénés, l'ozone, ou encore l'oxygène singulet.

Les ROS sont produites soit de manière exogène, auquel cas l'énergie nécessaire à une réaction sur l'oxygène moléculaire est apportée par une source extérieure (UV, tabac, fumée, xénobiotique...), soit de manière endogène, et la réaction est alors catalysée par des enzymes dans la cellule (comme la *NADPH* oxydase).

La réduction de l'oxygène moléculaire conduit à la formation de l'ion superoxyde $O_2^- \bullet$ [Hayyan et al., 2016] :



Cette espèce radicalaire est un oxydant peu puissant, mais il s'agit du précurseur d'espèces bien plus réactives. Sa dismutation produit du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (a), qui à son tour peut être réduit totalement en eau (b), ou partiellement en radical hydroxyle $OH \bullet$ (c),

un des plus puissants oxydants naturels. $O_2^- \bullet$ peut également réagir avec l'oxyde nitrique $NO \bullet$ et ainsi former un autre oxydant puissant, le peroxydinitrite $ONOO^-$ (d) [Turrens, 2003 ; Gardès-Albert et al., 2003].

- (a) $2 H^+ + O_2^- \bullet \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- (b) $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$
- (c) $H_2O_2 + e^- \rightarrow HO^- + OH \bullet$
- (d) $O_2^- \bullet + NO \bullet \rightarrow ONOO^-$

L'ion superoxyde est produit en plusieurs compartiments de la cellule : dans les mitochondries, dans le reticulum endoplasmique ainsi que dans le cytosol. L'enzyme NADPH oxydase en produit en effet via la réaction [Babior, 1999] :



$O_2^- \bullet$ est alors converti rapidement en H_2O_2 par les superoxyde dismutases, une famille d'enzymes existant sous deux formes : l'une cytosolique et l'autre mitochondriale. Le peroxyde d'hydrogène, en oxydant les groupes thiol de certaines protéines (ou leur forme anionique thiolate), participe à certaines voies de signalisation cellulaire [Reczek et Chandel, 2015] : par exemple, il accélère l'ouverture des canaux de calcium tension-dépendant dans les neurones [Li et al., 1998] et intervient dans la prolifération de certains types cellulaires [Griendling et al., 1994 ; Pueyo et al., 1999]. $O_2^- \bullet$ et H_2O_2 ont également une implication dans la maturation des spermatozoïdes [De Lamirande et Gagnon, 1995 ; Agarwal et al., 2006].

Les espèces réactives de l'oxygène sont également importante pour la régulation de l'expression génétique [Dalton et al., 1999]. Certains facteurs de transcriptions ne s'activent qu'en présence de ROS. Citons par exemple OxyR, facteur de transcription de gènes codant pour des enzymes telles que les catalases ou les alkylperoxyde reductases [Pahl et Baeuerle, 1994].

1.3.2 Stress oxydant

1.3.2.1 Lésions des molécules biologiques

En concentration trop élevée, les ROS entraînent des dommages sur les molécules biologiques : ADN, sucres, protéines et lipides. Ces dommages entraînent à leur tour des conséquences sur le fonctionnement cellulaire.

Il existe cinq classes principales de dommages dus à l'oxydation sur l'ADN : des bases oxydées, des sites abasiques (une base manquante dans une séquence), des adduits intra-caténaux (un pont entre deux chaînes ADN), des cassures de brins, et des pontages entre ADN et protéines [Favier, 2003]. La cellule possède cependant des mécanismes de

réparation, tels l'excision de bases ou de nucléotides, qui assurent, la plupart du temps, la fidélité à la séquence initiale.

Les sucres peuvent également subir une oxydation dans des conditions physiologiques. L'oxydation du glucose, par exemple, est catalysée par des traces d'ions métalliques, et libère peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyde, qui endommagent à leur tour des protéines proches. Ce phénomène est important en particulier chez les patients diabétiques, chez qui ces réactions sont plus intenses [Gillery, 2006].

Les protéines peuvent également être oxydées. Cependant, les conséquences qui découlent de cette oxydation sont aussi variables que la nature des protéines. On peut tout de même noter que les protéines les plus sensibles à l'oxydation sont celles qui ont un groupement sulfhydryle $-SH$, comme beaucoup de protéines de transport par exemple [Favier, 2003]. De manière générale, la modification de la structure chimique d'une protéine altère sa conformation et donc sa fonction. Ainsi, une protéine oxydée est, dans la majorité des cas, inactivée.

1.3.2.2 Peroxydation des lipides

Si les mécanismes précis de réactions chimiques diffèrent selon l'origine et la cible de l'oxydation, il est cependant possible d'en décrire le schéma général.

L'oxydation des lipides insaturés fait intervenir soit des espèces réactives de l'oxygène (la réaction est alors dite de type I) [Porter, 1987] soit de l'oxygène singulet (la réaction est alors dite de type II) [Girotti, 2001]. Il existe également des voies d'oxydation enzymatique. Les lipoxygénases, notamment, catalysent les réactions entre le dioxygène et les lipides à chaînes poly-insaturées [Porter, 1987].

L'oxydation de type I des lipides se déroule en 3 étapes : initiation, propagation et terminaison [Porter et al., 1995]. L'initiation correspond à l'attaque d'une ROS sur la chaîne aliphatique d'un lipide. Un atome d'hydrogène peut alors être extrait d'un groupe méthylène $-CH_2-$, formant ainsi un radical libre. Ceci est d'autant plus probable si le groupe méthylène est située entre 2 doubles liaisons $C=C$, l'énergie de liaison $C-H$ étant alors plus faible (de l'ordre de 65 kcal/mol contre 85 kcal/mol s'il n'y a qu'une seule double liaison contiguë et 100 kcal/mol pour une chaîne saturée) [Sanderson, 1983 ; Sanderson, 1976 ; Yu-Ran et Jin-Pei, 2015-2016]. Des ré-arrangements au sein de la chaîne aliphatique stabilisent le radical en formant un diène conjugué, alors apte à réagir avec le dioxygène environnant pour former un radical peroxy, $ROO\cdot$. Ce radical est suffisamment réactif pour extraire à son tour un hydrogène d'une chaîne aliphatique proche, d'autant plus si des traces de métal sont présents (ce qui cause une catalyse de la réaction). $ROO\cdot$ se combine alors avec un hydrogène pour donner un hydroperoxyde, c'est la phase de propagation (fig. 18). La réaction en chaîne se termine lorsque le lipide radical ne réagit pas avec un lipide intact, mais avec une autre espèce n'initiant pas de nouvelle réaction.

L'oxydation de type II est une réaction entre les lipides et l'oxygène singulet, produit en particulier par des molécules photo-sensibilisatrices excitées par la lumière. La réaction se produit au niveau d'une double liaison C=C de la chaîne aliphatique du lipide et, en y ajoutant un oxygène, forme ainsi un hydroperoxyde. De la même façon que pour l'auto-oxydation, la formation d'un lipide radicalaire conduit à une réaction en chaîne (fig. 18).

Figure 18 : Diagramme du processus de photo-oxydation des lipides d'une vésicule lipidique. La réaction est initiée par un oxygène singulet attaquant un lipide. Une réaction en chaîne entre lipide intact et lipide radicalaire est alors amorcée. [Heuvingh et Bonneau, 2009]

De ces deux types d'oxydation, le type II est bien plus rapide. Il a été démontré que l'oxydation des acides oléiques est de l'ordre de 30000 fois plus rapide que leur auto-oxydation (dont le mécanisme chimique ne diffère de l'oxydation de type I que par son initiation). Ce rapport est de l'ordre de 1000 pour les polyènes [Leray, 2010].

1.3.2.3 Produits d'oxydation des lipides

Les hydroperoxydes, produits primaires de l'oxydation des lipides, peuvent conduire, par ré-arrangements moléculaires ou réduction, à des produits secondaires : des espèces céto-acides, des espèces avec un oxygène ponté sur une liaison C-C (époxyde), ou encore des

hydroxydes. L'ensemble de ces espèces constitue la classe des produits d'oxydation non fragmentés : le nombre de carbones des chaînes aliphatiques des produits est identique à celui des lipides originaux.

Il existe d'autres produits secondaires de l'oxydation, fragmentés, pour lesquels une liaison carbone est clivée. A partir d'un lipide non oxydé, on peut alors former par oxydation un lipide dont l'une des chaînes aliphatiques est raccourcie, ainsi qu'un fragment de chaîne carbonnée (un acyle). La nature précise des produits d'oxydation dépend de la nature du lipide oxydé ainsi que du système oxydant. Avec le niveau d'oxydation, l'abondance relative de produits fragmentés augmente, tandis que celle de lipides dont la longueur de la chaîne est préservée diminue [Reis et Spickett, 2015].

1.3.2.4 Mécanismes de régulation cellulaire de l'oxydation

Trois stratégies sont mises en place au sein de la cellule afin de contrôler le niveau d'espèces oxydantes.

- En premier lieu, il existe certaines molécules qui neutralisent l'action des radicaux libres, ou qui interrompent la chaîne de propagation de l'oxydation des lipides. Parmi ces antioxydants, on trouve la vitamine E (tocophérol) [Tappel, 1962 ; Brigelius-Flohé et Traber, 1999], les caroténoïdes [Edge et al., 1997] ou la vitamine C (ascorbate) [Padayatti et al., 2003]. Ces trois exemples sont exogènes, apportés par notre alimentation, mais il existe aussi des antioxydants endogènes, produits par la cellule, tel le glutathion, qui réagit avec les ROS, mais aussi avec l'oxyde nitrique [Wang et Ballatori, 1998].
- Certaines enzymes sont également capables de neutraliser les ROS. Les superoxyde dismutases catalysent une réaction qui transforment 2 anions superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène, bien moins réactifs [Maier et Chan, 2002]. Il existe de même des enzymes aptes à détruire les peroxydes, notamment les catalases à cofacteur fer [Dunford, 2002].
- Si les dégâts occasionés par les ROS sur la cellule sont trop importants pour être réparés, la cellule peut entrer en apoptose. La cellule endommagée est alors marquée en surface par des sucres et des lipides spécifiques. Reconnue par des macrophages ainsi que d'autres phagocytes, la cellule est alors éliminée de manière à préserver l'organisme [Savill, 1997].

1.4 Objectifs du travail présenté

Plusieurs mécanismes métaboliques régulent le niveau d'oxydation des mitochondries, d'une part pour préserver la fonctionnalité des protéines de l'organite [Turrens, 2003] et, d'autre part, pour préserver l'intégrité de ses membranes. Plusieurs études, notamment au laboratoire, ont également montré que, en plus de ces mécanismes biologiques, la composition lipidique a une influence, non seulement sur le niveau d'oxydation [Hammer et Wills, 1978], mais également sur la résistance des membranes à cette oxydation. Par exemple, augmenter la proportion de cholestérol dans une membrane phospholipidique retarde sa perte d'intégrité face à un stress oxydant [Kerdous et al., 2011].

La membrane mitochondriale interne, pour laquelle l'oxydation est d'une importance particulière, est constituée de lipides de natures différentes qui sont, de plus, impliqués dans ses principales fonctions. Le but de nos travaux est de comprendre le rôle de ces lipides dans la résistance au stress oxydant. L'expérience du laboratoire en matière de membranes lipidiques artificielles ainsi qu'en molécules photo-sensibilisatrices, nous donne les bases nécessaires à l'observation quantitative des effets de l'oxydation photo-induite sur les membranes.

L'étude se construit en trois temps : d'abord seront établis des résultats nécessaires au contrôle de l'oxydation de membranes de différentes compositions. Ensuite, l'effet de ces compositions dans la résistance au stress oxydant sera comparé afin de comprendre l'influence des différentes natures de lipides (c'est-à-dire des différentes tête polaires et/ou des différentes structures), puis de comprendre l'influence des différentes chaînes carbonées (c'est-à-dire du nombre et de la position des insaturations le long des chaînes). Ces études seront menées sur les lipides constituant la membrane mitochondriale interne, en particulier sur le cardiolipide, qui lui est spécifique.

1.5 Organisation du manuscrit

Après ce chapitre introductif, nous présenterons, au chapitre 2, les modèles membranaires utilisés dans nos travaux et leurs principales propriétés physiques, ainsi que les moyens utilisés pour photo-contrôler l'oxydation des membranes formées et pour en quantifier les effets observés.

Le troisième chapitre sera consacré à la description du matériel et des techniques expérimentales utilisés.

Le chapitre 4 s'attachera à décrire les interactions entre le photo-sensibilisateur, la molécule utilisée pour contrôler l'oxydation des lipides, et les différents types de membranes étudiées. En particulier, la répartition de cette molécule entre le milieu aqueux et les membranes sera mesurée et quantifiée.

Les deux chapitres suivants contiendront les principaux résultats de nos études. Le chapitre 5 expliquera l'influence des différents types de lipides présents dans la membrane mitochondriale interne. Seront en outre exposés les mécanismes qui conduisent à la perméabilisation d'une membrane oxydée. Le chapitre 6 expliquera l'influence des chaînes aliphatiques des lipides. Les lipides utilisés auront ainsi tous la même tête polaire mais des chaînes carbonées différentes en position et en nombre d'insaturations. De plus, le scénario chimique des réactions d'oxydation dans une membrane sera étudié puis lié avec le phénomène de perméabilisation des membranes. Ces 2 chapitres seront clos par des discussions sur la physique des phénomènes décrits et des modèles utilisés.

Le dernier chapitre sera un chapitre de discussion, notamment à propos des implications biologiques des phénomènes étudiés. Des possibles pistes de recherche y seront également envisagées.

Chapitre 2

Systemes étudiés

Table des matières

2.1 Vésicules lipidiques	36
2.1.1 Membranes biomimétiques	36
2.1.2 Formation de vésicules lipidiques	37
2.1.3 Propriétés mécaniques d'une membranes	38
2.1.4 Tension de membrane et tension de lyse d'une vésicule	40
2.1.5 Perméabilité d'une membrane	41
2.1.6 Autres propriétés	42
2.2 Photo-oxydation de vésicules lipidiques	44
2.2.1 Photo-sensibilisateur	44
2.2.2 Chlorine-e6	45
2.2.3 Production d'oxygène singulet	48
2.2.4 Le choix du photosensibilisateur	49
2.2.5 Effets de l'oxydation des lipides sur la morphologie d'une vésicule	50
2.2.6 Perméabilisation d'une vésicule géante par oxydation	53
Conclusion du chapitre	55

2 Systèmes étudiés

Pour comprendre le fonctionnement physique d'un composant biologique, il est utile d'en étudier un modèle dont le nombre de paramètres est moindre. La mitochondrie est composée de deux membranes distinctes aux propriétés différentes, de plus de 600 protéines actives ainsi que de molécules réactives présentes dans le milieu inter-membranaire et dans la matrice mitochondriale. Dans l'étude de l'oxydation des membranes mitochondriales, les lipides sont une cible privilégiée. Notre système minimal sera ainsi constitué d'une membrane lipidique fermée, de composition analogue à celle d'une membrane interne de mitochondrie. L'oxydation des lipides se déroule au fil du fonctionnement de la mitochondrie. Dans notre modèle exempt de protéines, l'oxydation est contrôlée par l'irradiation lumineuse d'une molécule photo-sensibilisatrice, autorisant ainsi un contrôle sur le déclenchement de la réaction en chaîne et sur la quantité d'espèces oxydantes produite.

2.1 Vésicules lipidiques

2.1.1 Membranes bio-mimétiques

Les liposomes, ou vésicules lipidiques, sont un arrangement de lipides sous forme de bicouche sphérique qui constituent en cela un modèle simple de membrane cellulaire. Ne contenant pas de protéines, seules les modifications physico-chimiques sur les lipides ou sur les milieux intérieur et extérieur modifient la membrane.

Les vésicules lipidiques sont généralement classées par tailles : SUV, LUV ou GUV pour, respectivement, Small (diamètre inférieur à 100 nm), Large (de 100 nm à 1 μm) et Giant (diamètre supérieur à 1 μm), Unilamellar Vesicles. Ces trois acronymes précisent que ces trois types de vésicules sont unilamellaires, c'est-à-dire formées d'une seule bicouche. Quoique plus rarement, des vésicules multilamellaires (MLV) sont également étudiées [Lentz et al., 1980 ; Moon et al., 2011].

Les GUV sont observables en microscopie optique et sont donc largement utilisées, notamment, dans les études concernant les phases (ordonnée l_o ou désordonnée l_d) d'une membrane lipidique [Feigenson, 2007], les radeaux lipidiques [Dietrich et al., 2001], ou encore, l'organisation et la structure de certaines membranes [Khalifat et al., 2008]. La simplicité de ce modèle ne permet cependant pas toujours d'établir un lien clair entre le comportement des lipides d'une vésicule et celui de lipides d'une membrane biologique. Pour pallier ce problème, il est possible d'inclure certaines protéines dans la bicouche d'un

liposome, notamment l'albumine, la myoglobine ou le lysozyme [Whitehart et Hess, 1976] ou, plus récemment, une glycoprotéine [Horger et al., 2015] et même le complexe de protéines qui forme l'ATP-synthétase [Almendro-Vedia et al., 2017]. On peut ainsi étudier les interactions entre protéines et lipides, ou obtenir un modèle simple de fonctionnement d'une protéine particulière. Il est également possible de former des vésicules à partir de lipides naturels extraits de membranes cellulaires, approchant ainsi la composition lipidique du modèle de celui d'une cellule, au détriment d'un certain contrôle sur cette composition. D'autres études portent sur la diffusion de réactifs à travers des réseaux compartimentés : des vésicules géantes reliées par microtubules [Karlsson et al., 2005].

Les SUV et LUV, de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres, sont trop petites pour être observées au microscope. En revanche, le procédé d'extrusion [Mayer et al., 1986], par lequel elles sont formées, autorise à la fois un très bon contrôle du diamètre et la production d'échantillons à concentration élevée. Une suspension de vésicules concentrée est intéressante, en fluorescence notamment, pour mesurer l'affinité entre vésicules lipidiques et protéines ou autres molécules [Schubert et al., 1986]. D'autre part, il est aisé de produire des vésicules sur plusieurs ordres de grandeurs de rayons, de 50 nm à plus de 400 nm, et ainsi d'étudier des effets de rayons de courbure sur la stabilité, l'activité osmotique ou encore le comportement thermodynamique des membranes [Lichtenberg et al., 1981].

2.1.2 Formation de vésicules lipidiques

Plusieurs techniques de formation de liposomes existent depuis de nombreuses années et sont relativement simples à mettre en œuvre [Mayer et al., 1986; Angelova et Dimitrov 1988]. Les moyens de formation utilisés varient, cependant, les principes restent les mêmes : sécher les lipides de leur solvant organique, les disperser dans un milieu aqueux, puis purifier la suspension de liposomes obtenue [Akbarzadeh et al., 2013].

Les vésicules multilamellaires sont des plus simples à produire. Des lipides, dissous dans un solvant organique, sont séchés par évaporation à l'air ou à un gaz inerte. Une agitation mécanique en présence d'un tampon aqueux forme de nombreuses MLV de taille micrométrique [Kirby et Gregoriadis, 1984]. Il est ensuite possible d'obtenir, à partir de ces MLV, des vésicules uni-lamellaires, notamment par sonication ou par extrusion. La sonication consiste à exposer une dispersion de lipides dans l'eau à des vibrations ultrasonores [Woodbury et al., 2006]. L'extrusion consiste à faire passer, sous pression mécanique, les MLV à travers des membranes-filtres dont les pores sont calibrés, rompant ainsi les vésicules de taille supérieure aux pores. Les membranes lipidiques rompues se referment ensuite, en ayant libéré les vésicules éventuelles qu'elles contenaient [Mayer et al., 1986]. Plusieurs passages à travers le filtre assurent l'uni-lamellarité de la majorité des vésicules, ainsi qu'une distribution en taille resserrée autour du diamètre des pores [Berger et al., 2001]. Cette méthode est utilisée pour la production de vésicules unilamellaires de quelques dizaines de nanomètres de diamètre jusqu'à plusieurs centaines de nanomètres.

Les GUV s'obtiennent par d'autres méthodes. L'électroformation est la plus ancienne, et est efficace pour produire de nombreuses GUV. Sur le principe, l'électroformation consiste à mettre en présence un film lipidique et un milieu aqueux, puis à appliquer un champ électrique alternatif. Le champ oscillant soulève des lamelles de lipides du film, permettant ainsi leur hydratation. Une « lamelle » hydratée adopte ensuite une forme plus stable : la vésicule [Angelova et Dimitrov, 1986, 1988]. Cette méthode, utilisée dans les recherches décrites dans ce manuscrit, est réservée à des milieux aqueux de faible force ionique. En effet, une forte concentration en ions écrante le champ, le rendant inefficace à la formation de GUV. L'épaisseur du film lipidique, la tension utilisée pour générer le champ, la durée d'électroformation ainsi que la fréquence du champ alternatif sont autant de paramètres influençant le nombre et la taille des vésicules produites. Il est nécessaire d'ajuster ces paramètres à la nature chimique des lipides entrant dans la composition des membranes souhaitées. La distribution des diamètres des vésicules électroformées est très large, du micromètre à plus d'une centaine de micromètres, mais cet écart peut être réduit en combinant l'électroformation au spin-coating, méthode qui, par rotation rapide, permet d'obtenir un film lipidique uniforme et d'épaisseur idéale à l'électroformation (de l'ordre de 30 μm) [Estes et Mayer, 2004].

Figure 19 : Méthodes communes de préparation des différents types de liposomes, classés par lamellarité et par taille. Les vésicules multilamellaires peuvent, par action mécanique, être utilisées pour produire des vésicules unilamellaires. Traduction de [Jesorka and Orwar, 2008]

D'autres méthodes de préparation de vésicules uni-lamellaires existent, avec en particulier d'autres moyens mécaniques pour disperser les lipides après séchage de leur solvant organique : des cycles de congélation/décongélation [Castile et Taylor, 1999], des cycles de mouillage/séchage partiel [Lasic, 1993], émulsion inverse [Pautot et al., 2003]... La figure 19 regroupe les méthodes de formation les plus courantes en les classant par lamellarité et par taille de vésicules lipidiques majoritairement obtenues.

2.1.3 Propriétés mécaniques d'une membrane

D'un point de vue macroscopique, pour des échelles de taille très supérieures à la molécule, la réponse d'une membrane à la déformation correspond à un comportement

élastique. Elle est donc déformable par extension (ou compression), par cisaillement ainsi que par courbure (fig. 20).

Figure 20 : Représentation schématique des modes de déformations indépendants d'une membrane. (a) Extension-compression. (b) Cisaillement. (c) Courbure. [Evans et Needham, 1987]

Chacune de ces déformations a un certain coût énergétique [Sackmann, 1990], décrit par les équations suivantes. L'énergie d'extension ou de compression par unité de surface de la membrane dépend essentiellement de la variation relative de surface :

$$H_{ext} = \frac{1}{2} K_a \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2 \quad (2.1)$$

L'énergie de cisaillement, généralement négligeable pour une membrane en phase fluide, est dépendante du taux d'extension latérale de la membrane $\lambda = (L_0 + \Delta L)/L_0$:

$$H_{cis} = \frac{1}{2} \mu (\lambda^2 + \lambda^{-2} - 2) \quad (2.2)$$

L'énergie de courbure dépend quant à elle des rayons de courbure de la membrane :

$$H_{courb} = \frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2 - c_0)^2 \quad (2.3)$$

où $c_1 = 1/R_1$ et $c_2 = 1/R_2$ sont les courbures principales de la membrane et où c_0 est sa courbure spontanée.

Cette expression de l'énergie de courbure est en fait incomplète et peut-être raffinée par l'intervention d'un second coefficient : le module de courbure gaussienne $\bar{\kappa}$, on a alors :

$$H_{courb} = \frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \bar{\kappa} c_1 c_2 \quad (2.4)$$

Cependant, c'est généralement le coefficient κ qui joue le rôle le plus significatif.

Ces trois énergies se calculent à partir de trois modules K_a , μ et κ , respectivement modules de compressibilité (en J/m^2), de cisaillement (en J/m^2) et de courbure (en J). Ces modules sont des propriétés intrinsèques de la membrane, ne dépendant pour l'essentiel que de la composition de la membrane.

2.1.4 Tension de membrane et tension de lyse d'une vésicule

La tension de surface d'un liquide est définie comme la variation d'énergie libre de ce liquide (en équilibre avec sa vapeur) avec l'aire de l'interface liquide-vapeur, il s'agit d'une caractéristique intrinsèque de cette interface. Par exemple, l'eau étant polaire, les molécules d'eau au contact avec l'air ne peuvent engendrer de liaisons H : cette interface a un certain coût en énergie. Pour minimiser cette énergie, l'interface air-eau doit être minimale.

Pour une membrane lipidique, le cas est différent. Chaque lipide de la membrane a une certaine aire d'équilibre, de l'ordre de 50 \AA^2 [Nagle, 1993], et la membrane a donc une aire d'équilibre qui vaut le nombre de lipides multiplié par l'aire par lipides. Au contraire des molécules d'eau à une interface eau-air, des lipides à l'interface membrane-eau sont dans les configurations de plus basse énergie. Autrement dit, la tension de la membrane, dans le sens d'une tension de surface, est nulle.

Figure 21 : Expérience typique d'aspiration de vésicule par micropipette. (a) et (b) : Micrographie d'une vésicule aspirée. La pression de suction est plus élevée en (b) qu'en (a), augmentant ainsi la tension de membrane ici nommée τ . (c) : Graphe représentant la tension τ en fonction de l'aire apparente de la membrane. Les deux courbes représentent chacune une vésicules constituée par un type de lipide différent (C18:0/1 et diC 18:3). Deux phases distinctes peuvent être observées pour chaque courbe. [Rawicz et al., 2000]

On peut cependant mesurer une tension effective de membrane. En effet, l'aire projetée d'une vésicule est moindre que l'aire disponible selon le nombre de lipides. Cela est dû aux fluctuations locales de la membrane. Une énergie par unité de surface nécessaire à l'extension de la surface peut alors être calculée par :

$$H_{tens} = \sigma \frac{\Delta A}{A} \quad (2.5)$$

où σ , est la tension de la membrane.

L'énergie de dépliement de la membrane correspond physiquement à l'énergie nécessaire pour augmenter l'aire occupée par un lipide, c'est-à-dire à défroisser la membrane, là où l'énergie de tension correspond à l'augmentation de l'aire de la vésicule en laissant inchangée l'aire par lipide. Cette différence est bien illustrée par les expériences d'aspiration de vésicule par micropipette, où les courbes obtenues montrent ces 2 régimes (fig. 21).

La tension de membrane variant avec les modifications chimiques de la membrane, l'évolution de la différence d'osmolarité entre les milieux intérieur et extérieur, ou même le contact avec le verre d'une lame de microscope, il n'est pas aisé de la mesurer au cours du temps dans toutes les expériences. On peut en revanche repérer un point critique : la tension atteinte par la membrane au moment de sa rupture. La tension de rupture peut ainsi être utile pour caractériser la résistance de la membrane à un stress particulier.

2.1.5 Perméabilité d'une membrane

La perméabilité à l'eau d'une membrane varie avec la composition lipidique de la membrane. La présence de cholestérol notamment, rend la membrane plus imperméable (fig. 22) [Mathai et al., 2008]. Mais la perméabilité à l'eau (de l'ordre de $100 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ [Huster et al., 1997]) reste de plusieurs ordres de grandeurs supérieures à celles des ions (de l'ordre de $10^{-9} \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les cations et $10^{-4} \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les anions [Nozaki et Tanford, 1981]). Pour des expériences d'une durée supérieure à la seconde, on peut donc considérer la membrane lipidique comme semi-perméable, c'est-à-dire une membrane ne laissant passer que l'eau, sans ses solutés.

Cette propriété particulière induit le phénomène d'osmose. Considérons une membrane séparant deux milieux aqueux. Chaque milieu contient un soluté de concentration différente de part et d'autre de la membrane. Le mélange de l'eau et du soluté augmente l'entropie du système, réduisant ainsi le potentiel chimique de la solution. Or, l'équilibre du système total est atteint pour des potentiels chimiques égaux de part et d'autre de la membrane. Pour un même soluté, l'égalité des potentiels chimiques implique l'égalité des concentrations. L'eau traversera donc la membrane de façon à rétablir cette égalité : du milieu initialement le moins concentré vers le plus concentré. Si cet équilibre ne peut être atteint, la membrane se tend sous l'effet de la différence de pression osmotique entre les 2

compartiments, définie comme la pression minimale nécessaire à empêcher le passage de l'eau. Lorsque cette différence est trop importante, la membrane peut se rompre.

Figure 22 : Perméabilité à l'eau de vésicules de 18:1 PC en présence de différentes proportions de cholestérol (0, 10, 20 et 40 % mol). La diminution de perméabilité corrèle avec la diminution de l'aire moyenne par lipide (A), avec la diminution de l'épaisseur de la membrane (B), avec le module de courbure de la membrane (C) et avec son module d'extension (D). [Mathai et al., 2008]

2.1.6 Autres propriétés

- Courbure spontanée

Si on imagine une membrane dont les deux feuillets sont identiques, c'est-à-dire constituée d'un même nombre de même lipides, alors cette membrane est plane en l'absence de forces extérieures. La courbure spontanée d'une membrane vient du fait que les deux feuillets ne sont pas identiques [Deuling et Helfrich, 1976]. Dans le cas d'une vésicule constituée d'un seul type de lipide, une courbure spontanée vers l'intérieur peut indiquer que le feuillet interne est moins peuplé que le feuillet externe.

Notons que la courbure spontanée d'une membrane n'est pas rigoureusement égale à l'inverse de son rayon de courbure, à cause du terme de courbure gaussienne. Cependant, on peut montrer que la courbure adoptée par la membrane et sa courbure spontanée sont

proportionnelles, ce qui légitime que les deux soient souvent confondues dans la littérature.

- Ordre et transition de phase

La formation et la stabilité de la membrane constituant une vésicule géante est conditionnée par le paramètre d'empilement des lipides la constituant. En revanche, l'agencement des lipides au sein de la membrane dépend de la température. Si la température diminue, une transition de phase du premier ordre se produit d'une phase fluide L_α vers une phase gel L_β (fig. 23).

Figure 23 : Représentation schématique de lipides en phase gel et en phase liquide. Illustration tirée de la thèse de [Milioni, 2012]

La diffusion latérale des lipides dans une phase L_α diminue de plusieurs ordres de grandeurs, de $D = 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ en phase désordonnée [Almeida et al., 1992] à $D = 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$ en phase gel [Filippov et al., 2003]. La température de transition entre ces deux phases dépend elle aussi du type de lipide : des lipides à chaînes aliphatiques courtes, ou présentant des insaturations augmentent le désordre et donc diminuent cette température. Il a également été montré que, pour des membranes de même composition et dans les mêmes conditions expérimentales, les lipides diffusent deux fois plus dans une vésicule géante que dans une bicouche plane [Przybylo et al., 2006].

- Tension de ligne d'un pore

Figure 24 : Représentation d'un pore instable dans une membrane. Les chaînes hydrophobes des lipides sont exposées directement au milieu aqueux, d'où un coût énergétique dépendant de la taille du pore : la tension de ligne

La tension de ligne γ correspond à l'énergie par unité de longueur nécessaire à l'ouverture d'un pore dans une membrane. Une telle ouverture est en effet coûteuse en énergie si elle génère une nouvelle interface exposant les parties hydrophobes des lipides au milieu aqueux environnant (fig. 24). L'énergie liée à cette tension de ligne vaut alors :

$$E_{\text{ligne}} = \gamma L \quad (2.6)$$

où L est le périmètre du pore ouvert.

On notera que l'ouverture d'un pore demande une énergie liée à la tension de ligne mais diminue la surface de la membrane. L'énergie d'ouverture d'un pore peut donc s'exprimer ainsi :

$$E_{pore}(r) = \gamma 2\pi r - \sigma \pi r^2 \quad (2.7)$$

où r est le rayon du pore, et σ la tension de la membrane.

La tension de ligne peut néanmoins être diminuée par des réarrangements des lipides membranaires. Des lipides dont le paramètre d'empilement est inférieur à 0,5 (correspondant à une forme de cône ou de cône tronqué (fig. 5) peuvent par exemple stabiliser un tel pore.

2.2 Photo-oxydation de vésicules lipidiques

2.2.1 Photo-sensibilisateur

Une molécule photo-sensibilisatrice est une molécule qui peut produire une modification chimique sur une autre molécule, sous l'effet d'une excitation lumineuse. Il existe plusieurs types de photo-sensibilisateur, mais tous agissent selon le même principe : ils absorbent la lumière puis convertissent cette énergie dans la production d'espèces réactives, qui dérivent en particulier de l'oxygène. Ces espèces, fortement oxydantes, réagissent rapidement avec les molécules environnantes.

Les photo-sensibilisateurs sont utiles dans des domaines variés, en particulier car il est aisé de contrôler le déclenchement des réactions qu'elles provoquent, en contrôlant l'irradiation lumineuse. Ces molécules peuvent être naturelles, comme la chlorophylle, l'hématoporphyrine ou la protoporphyrine IX (fig. 25 C, D et E), et peuvent provoquer des dommages à l'ADN [Fiel et al., 1981] ou aux lipides membranaires [Heuvingh et Bonneau, 2009]. D'autres sont synthétiques et sont utilisés en médecine, dans des traitements contre les maladies prolifératives comme le cancer avec le Photofrin® (la thérapie photo-dynamique [Gold, 2016]) ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge avec la Visudyne® [Martin et al., 2012] (fig. 25 A et B). Toujours en médecine, les photo-sensibilisateurs sont très étudiés *in vitro* [Berg et al., 1999] et *in vivo* [Selbo et al., 2012] pour la vectorisation de médicaments.

Dans un cadre industriel, les photo-sensibilisateurs sont aussi utilisés pour la décontamination de produits sanguins [Ben-Hur et al., 1996], au cours de synthèses

chimiques nécessitant une oxydation forte, ou même pour le retraitement des eaux usées [Esser et al., 1994 ; Jiménez-Hernandez et al., 2005].

Figure 25 : Exemples de photo-sensibilisateurs constitués à partir des noyaux précédemment décrits. Le Photofrin® (A) et la Visudyne® (B) sont des photo-sensibilisateurs synthétiques à visée médicale. La chlorophylle (C), l'hématoporphyrine (D), la protoporphyrine IX (E) et l'hème B (F) sont des photo-sensibilisateurs naturels.

2.2.2 Chlorine-e6

La grande majorité des photo-sensibilisateurs est constituée d'un macrocycle tétrapyrrolique aux électrons fortement délocalisés : noyau porphyrine, chlorine ou bactériochlorine (fig. 26).

Figure 26 : Structure chimique d'un noyau de porphyrine (à gauche), de chlorine (au centre) et de bactérochlorine (à droite). On dénombre 22 électrons π délocalisés pour la porphyrine, 20 pour la chlorine et 18 pour la bactérochlorine.

La variété de ces structures chimiques offre une certaine adaptabilité : différents ligands sur les carbones périphériques permettent de jouer sur l'hydrophobie ou sur l'hydrophilie du photo-sensibilisateur, un ion métallique central permet de jouer sur le spectre d'absorption. Certains sont facilement dégradables (ce qui est utile dans un système biologique) ou au contraire stables (ce qui est utile en chimie industrielle). Quelques exemples de photo-sensibilisateurs sont exposés en figure 25.

Dans nos études, nous avons utilisé la chlorine-e6 (Ce6), dont nous décrivons les propriétés dans les paragraphes suivants.

○ Structure

Figure 27: Structure de la forme protonée de la chlorine-e6. On reconnaît le macrocycle chlorine présenté à la figure 26. Des groupements carboxyliques, hydrophiles, sont présents sur les carbones

Dans la nomenclature, la Ce6 (masse molaire : 596,7 g/mol) est nommée : (7S,8S)- 3-carboxy- 5-(carboxyméthyle)- 13-éthényle- 18-éthyle- 7,8-dihydro- 2,8,12,17-tétraméthyle- 21H,23H-porphine- 7-propanoïque acid. Elle est ainsi constituée d'un noyau chlorine sur lequel sont greffés en positions 2, 8, 12 et 17 des groupements méthyle, en position 18 un groupement éthyle, en 13 un groupement vinyle. Trois chaînes latérales de longueur différentes mais toutes terminées par une fonction carboxylique (COOH ou COO⁻ selon l'état de protonation de la molécule) sont situées en position 3, 5 et 7, c'est-à-dire d'un même côté du macrocycle (fig. 27).

Cette répartition asymétrique entre une partie hydrophobe et les groupements hydrophiles donne un caractère amphiphile à la Ce6, ce qui lui confère une affinité élevée pour les membranes lipidiques.

○ Propriétés optiques

Le macrocycle constituant la Ce6 est responsable d'une forte absorption lumineuse dans l'ultraviolet proche ou dans le bleu. Ce pic est appelé bande de Soret, du nom du chercheur Jacques-Louis Soret, qui l'a découvert lors d'analyses de l'hémoglobine, dont le constituant principal est une porphyrine (Les notes originales de J.-L. Soret sont d'ailleurs consultables sur le site internet de la Bibliothèque Nationale de France [Soret, 1878]). La bande de Soret correspond à la transition de l'état fondamental S_0 vers le second état singulet S_2 et est situé pour la Ce6, à 400 nm.

La transition de S_0 vers le premier état excité S_1 donne une série de bandes (les bandes Q) dans le domaine du rouge, entre 500 et 700 nm selon les photo-sensibilisateurs. Il s'agit de transition d'une orbitale liante vers une orbitale anti-liante $\pi \rightarrow \pi^*$, avec une contribution des transitions $n \rightarrow \pi^*$. Ce type de transition, sur des doubles liaisons isolées, correspond normalement à des longueurs d'onde de l'ordre de 180 nm. C'est ici la conjugaison des électrons mis en jeu sur un large macrocycle qui contribue à un rapprochement important des niveaux d'énergie et donc à de plus grandes longueurs d'onde.

Les propriétés spectrales de la Ce6 sont sensibles à l'environnement. Dans un milieu hydrophobe, la bande de Soret est décalée vers le bleu et les bandes Q vers le rouge. Le spectre d'émission de fluorescence est également décalé vers les grandes longueurs d'onde. Dans l'éthanol, le pic de fluorescence de la Ce6 est ainsi à 668 nm. Dans l'eau, il est plus proche de 660 nm. Cet effet bathochrome sur le spectre d'émission de fluorescence sera utilisé pour caractériser l'équilibre de partition de la Ce6 entre le milieu aqueux et les membranes lipidiques (voir chapitre 4).

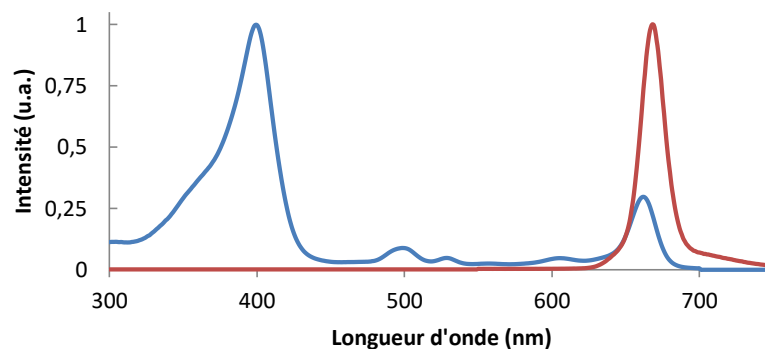


Figure 28: Spectres d'absorption (en bleu) et de fluorescence (en rouge) de la chlorine-e6 dans l'éthanol.

L'état de protonation a une forte influence sur les propriétés spectrales de la Ce6 : entre pH 3,2 et 9,0, on constate un décalage du maximum de fluorescence de 650 nm vers 660 nm, avec également une augmentation de l'intensité du pic [Cunderlikova et al., 1999]. A pH acide, les azotes centraux sont protonés, donnant à la Ce6 une forme mono- ou dicationique. Cette même étude suivant la fluorescence de la Ce6 en fonction du pH montre que deux de ses pK_a sont de 5,9 et 6,5. Nos expériences se déroulant à un pH de 7,8, on peut supposer que la majorité de la Ce6 est présente sous formes neutre et anionique (azotes centraux déprotonés et 2 ou 3 groupements COOH protonés).

2.2.3 Production d'oxygène singulet

Les photo-sensibilisateurs sont un moyen simple et contrôlable de produire de l'oxygène singulet. Le photo-sensibilisateur est excité dans l'état singulet S_1 par la lumière, puis passe dans un état triplet T_1 par conversion inter-système. L'état triplet d'un photo-sensibilisateur a une longue durée de vie, et peut, par collision, transférer l'énergie à une molécule de dioxygène, qui passe alors dans un état singulet (fig. 29) [Ogilby, 2010]. L'état T_1 du photo-sensibilisateur peut aussi revenir à l'état fondamental S_0 par phosphorescence.

Figure 29 : Diagramme d'énergie de Jablonski illustrant la production d'oxygène singulet ainsi que la désexcitation par fluorescence et par phosphorescence d'un photo-sensibilisateur. Les lettres S et T insiquent respectivement les états singulets et triplets. IC et ISC indiquent des conversions internes (Internal Conversion) ou des conversions inter-système (Inter-System Crossing), c'est-à-dire en échange d'énergie entre le photo-sensibilisateur et l'oxygène [Ogilby, 2010].

L'efficacité d'un photo-sensibilisateur est caractérisée essentiellement par 2 paramètres : le rendement de production d'état triplet, qui représente la probabilité de passage à l'état T_1 du photo-sensibilisateur, et le rendement quantique de production d'oxygène singulet, c'est-à-dire la probabilité que le photo-sensibilisateur passe à l'état triplet T_1 puis transfère son énergie à l'oxygène moléculaire.

2.2.4 Le choix du photo-sensibilisateur

Mener une étude sur la photo-oxydation de vésicules lipidiques implique de choisir un photo-sensibilisateur adapté. Dans notre cas, le photo-sensibilisateur idéal devait avoir les propriétés suivantes :

- une certaine stabilité photo-physique et chimique dans une gamme de *pH* entre 6 et 8.
- garder une forme monomérique dans les gammes de concentrations utilisées. Les photo-sensibilisateurs, du fait de leur structure chimique, dimèrisent voire oligomèrisent à forte concentration [Ricchelli, 1995]. Si les dimères ou oligomères sont en général toujours une source de production d'oxygène singulet, leur quantification devient impossible : l'affinité du dimère avec les membranes diffère de l'affinité du monomère, le rendement quantique change également, tout comme la position du dimère dans la membrane ou encore son spectre d'absorption, autant de propriétés qui influent sur la quantité d'oxygène singulet produit et donc sur l'efficacité d'oxydation de ce dernier.
- avoir l'affinité pour les membranes et l'efficacité oxydative suffisantes pour avoir un effet notable sur les vésicules lipidiques dans un temps raisonnable (entre quelques minutes et quelques heures).

Notre premier choix a été la protoporphyrine IX (fig. 25, E) en raison de sa pertinence biologique : elle est présente dans les organismes vivant en tant que précurseur chimique de l'hème b ou de la chlorophylle notamment. Cependant, il s'est avéré impossible de déterminer des conditions pour lesquelles la PPIX soit à la fois suffisamment efficace à perméabiliser les membranes et suffisamment peu concentrée pour ne pas altérer la physique de ces dernières. En outre, pour des concentrations membranaires ayant un effet notable lors de l'oxydation de vésicules géantes (de l'ordre de 5 molécules pour 100 lipides d'après nos expériences préliminaires), la PPIX est connue pour se dimériser [Margalit et al., 1983], voire s'agrèger [Scolaro et al., 2002] et ses propriétés photo-physiques sont alors, dans les deux cas, modifiées. Nos expériences ont également montré que son association aux membranes lipidiques n'est équilibrée qu'après plus de cinquante minutes (fig. 30). Or, une faible exposition à la lumière suffit à initier la réaction en chaîne d'oxydation, le délai nécessaire à l'établissement de l'équilibre de partition PPIX-membrane nécessite donc des précautions expérimentales supplémentaires pour contrôler l'oxydation.

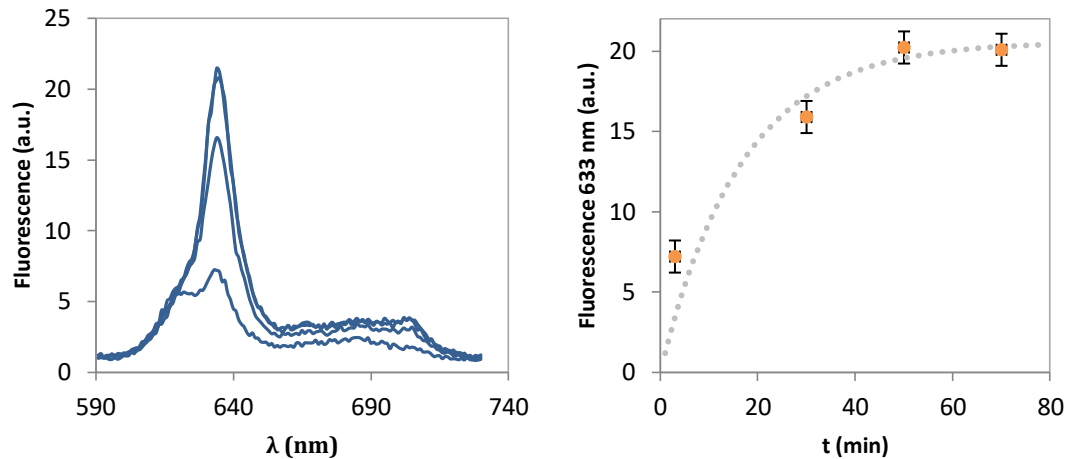


Figure 30 : Fluorescence de la protoporphyrine IX en présence de vésicules lipidiques de 18:1 PC en fonction du temps. Les points jaunes (à gauche) correspondent aux maxima des spectres de fluorescence (à droite).

Ces problèmes expérimentaux ont été réglés par le choix de la chlorine e6. Son rendement quantique de production d'oxygène singulet élevé (0,65 dans l'éthanol [Redmond et Gamlin, 1999]) engendre un effet rapide sur les membranes sous irradiation lumineuse, pour des concentrations moindres que la PPIX (typiquement 1 molécule de Ce6 pour 100 lipides). Le fort rendement quantique de production d'oxygène singulet de la Ce6 nous assure par ailleurs que l'oxydation des membranes est due plutôt à l'oxygène singulet qu'à d'autres espèces radicalaires de l'oxygène [Vysniauskas et al., 2016]. D'autre part, la Ce6 était déjà utilisée dans le laboratoire et donc son comportement photo-physique était déjà connu et caractérisé dans les milieux aqueux, dans l'éthanol et dans les membranes de 18 :1 PC (ainsi que dans les membranes de 18:1 PC avec certains pourcentages de cholestérol).

2.2.5 Effets de l'oxydation des lipides sur la morphologie d'une vésicule lipidique

La peroxydation d'un lipide, ainsi que le clivage d'une ou plusieurs de ses chaînes aliphatiques, modifient sa structure chimique et donc son paramètre d'empilement.

Les lipides peroxydés comportent un groupe hydroperoxyde au niveau d'une de leur double liaison, rendant ainsi leur paramètre d'empilement supérieur à 1. La polarité du groupe hydroperoxyde et donc son affinité pour la phase aqueuse pourrait même modifier la structure tri-dimensionnelle du lipide : la chaîne carbonnée se courberait afin d'exposer le groupement à l'eau [Guo et al., 2016; Khandelia et Mouritsen, 2009].

Les lipides clivés, quant à eux, ont un paramètre d'empilement moindre que les lipides intacts [Megli et Russo, 2008], ils tendent ainsi à augmenter la courbure spontanée locale du feuillet dans lequel le lipide clivé est situé. Ils favorisent en outre l'apparition de pores

dans la membrane, en diminuant la tension de ligne liée à leur ouverture (fig. 31) [Karatekin et al., 2003].

Figure 31 : Vue schématique transverse d'un pore membranaire. L'ouverture du pore est gouvernée par la tension de membrane σ à laquelle s'oppose un terme de tension de ligne T/r , où r est le rayon du pore ouvert. [Karatekin et al., 2003]

Ces modifications à l'échelle moléculaire ont, lorsqu'un certain nombre de lipides les subissent, des conséquences visibles à l'échelle de la membrane. En particulier, on observe des changements morphologiques. Quelques secondes après le déclenchement de la réaction en chaîne d'oxydation, la membrane fluctue fortement. Peu après, on observe l'apparition de bourgeonnements : des invaginations de la membrane. On observe également des transitions de forme d'un ellipsoïde aplati à un ellipsoïde allongé (fig. 32).

Figure 32 : A) Ellipsoïde aplati (à droite) et ellipsoïde allongé (à gauche). B) Vésicule de 18 :1 PC présentant une transition ellipsoïde allongée vers ellipsoïde oblong sous photo-oxydation de son feuillet interne. La projection fait apparaître l'ellipsoïde allongée comme un cercle [Heuvingh et Bonneau, 2009].

On constate également des modifications des propriétés physiques des vésicules. La tension de lyse est fortement diminuée : une force moindre suffit rompt les membranes oxydées [Heuvingh et Bonneau, 2009]. Des simulations numériques ont également montré une diminution du coefficient de diffusion latérale des lipides lorsqu'ils sont peroxydés [Guo et al., 2016]. De même, le module d'extension K_a diminue proportionnellement avec la fraction de lipides oxydés [Weber et al., 2014]. On peut également noter une diminution de l'épaisseur de la membrane ainsi que des changements de l'aire moyenne par lipide : l'aire d'un lipide peroxydé est plus importante que celle du même lipide avant peroxydation [Wong-Ekkabut et al., 2007], l'aire moyenne d'un lipide clivé, en revanche, peut être plus grande ou plus faible que celle du lipide d'origine, selon la tension de la membrane [Sabatini et al., 2006].

Figure 33 : Diagramme de phase des morphologies accessibles d'une vésicule lipidique. L'axe horizontal représente le ratio entre volume et aire de la vésicule. L'axe vertical indique la différence d'aire effective entre les 2 feuillets, et donne ainsi une indication de la courbure spontanée de la vésicule. [Dobereiner, 2000]

L'ensemble des morphologies observées lors de l'oxydation d'une vésicule, qu'elles soient provoquées par une diminution de l'aire du feuillet interne ou du feuillet externe, est prédite par le modèle ADE (pour *Area-Difference Elasticity*) [Miao et al., 1994 ; Dobereiner, 2000]. Dans ce modèle, l'énergie d'une vésicule peut s'exprimer à partir des propriétés physiques de la membrane (l'épaisseur d des feuillets, le module de courbure κ , ses modules élastiques contenus dans un terme α), de la courbure effective locale G de la vésicule, et des différences d'aires effective ΔA et optimale ΔA_0 des feuillets de cette dernière [Seifert, 1997] :

$$W \equiv \kappa \left[G + \frac{\alpha\pi}{8Ad^2} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \right] \quad (2.7)$$

L'utilisation de ce modèle théorique conduit à la figure 33, qui lie le rapport aire-volume d'une vésicule et la différence d'aire effective entre ses feuillets à la forme adoptée par celle-ci [Dobereiner, 2000].

2.2.6 Perméabilisation d'une vésicule géante par oxydation

En plus de ces changements morphologiques, on constate une perméabilisation de la membrane, définie comme l'augmentation de la perméabilité de cette dernière aux grosses molécules.

Figure 34: Décroissance du contraste entre intérieur et extérieur d'une vésicule de 18:1 PC photo-perméabilisée par la chlorure-e6. [Heuvingh et Bonneau, 2009]

En microscopie à contraste de phase, un contraste est obtenu pour des vésicules dont le milieu interne est différent du milieu externe. Dans la plupart des études, on choisit une solution aqueuse de saccharose à l'intérieur de la vésicule et une solution de glucose à l'extérieur. La perméabilisation de la membrane permet la diffusion des sucres, ce qui induit une homogénéisation des indices de réfraction des milieux interne et externe. Le contraste décroît donc, et suit une loi exponentielle (fig. 34) du type :

$$C = A \exp\left(-\frac{t - t_0}{\tau}\right) + B \quad (2.8)$$

Cette loi est donc entièrement caractérisée par ses quatre coefficients : A , B , t_0 et τ .

Nous pouvons admettre que le contraste maximum est atteint avant le début de l'irradiation de la Ce6 : aucun lipide n'est encore oxydé, la vésicule est aussi imperméable aux saccharose et glucose que possible. Ainsi, le coefficient A donne le contraste initial, que nous choisissons de normaliser à 1. De la même façon, après plusieurs minutes d'irradiation, milieux intérieur et extérieur à la vésicule sont identiques puisque la membrane a été perméabilisée. Le contraste associé est donc nul et le terme B est pris égal à zéro.

La quantité t_0 représente, mathématiquement, le décalage entre le temps $t = 0$ et le début de la décroissance du contraste. Il s'agit donc, physiquement, du temps de début de la

perméabilisation. La quantification de ce temps permet d'évaluer le seuil d'oxydation minimal de la membrane nécessaire à sa perméabilisation.

Remarquons que cette quantité est statistiquement indépendante du rayon de la vésicule considérée, et ce quelque soit la composition lipidique de la membrane. L'exemple des vésicules constituées de 18:1 PC et de cholestérol est donné dans la figure 35.

Le temps τ représente quant à lui le temps caractéristique de l'exponentielle décroissante. C'est donc une mesure indicative de la durée entre le début de la perméabilisation et une vésicule totalement perméabilisée. Contrairement à t_0 , on peut voir que, dans nos expériences, τ a tendance à être d'autant plus grand que le rayon de la vésicule est grand.

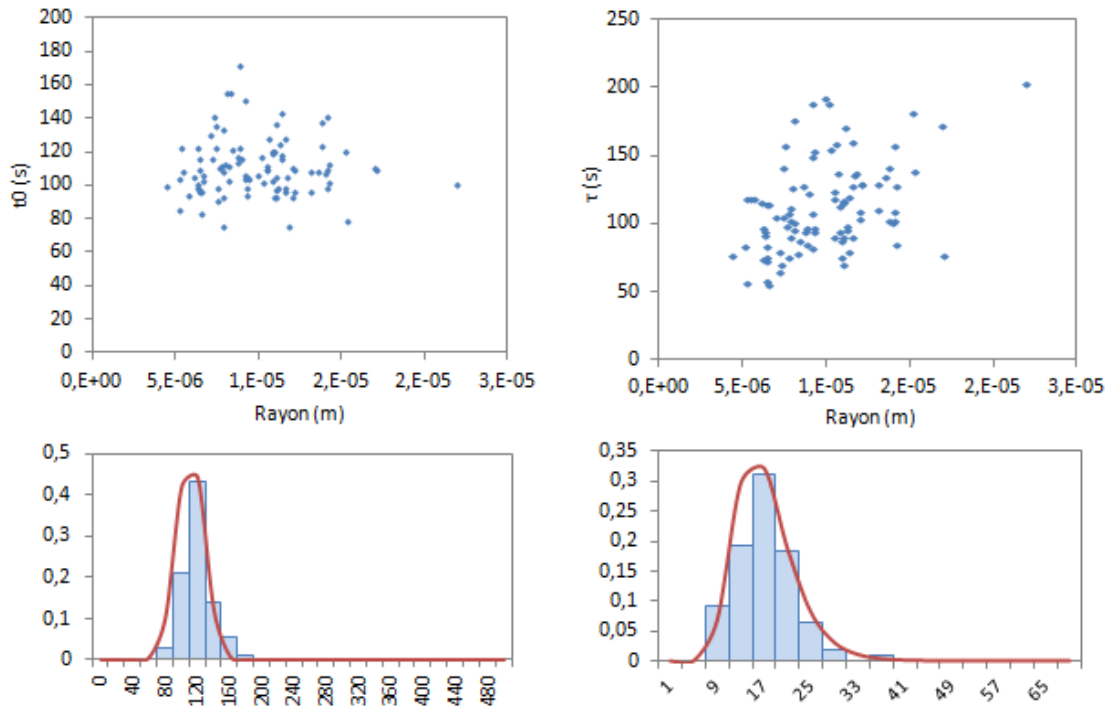


Figure 35 : Temps de début de perméabilisation (à gauche) et temps caractéristique de perméabilisation (à droite) en fonction du temps pour des vésicules de 18:1 PC et cholestérol (90/10) ainsi que les distributions statistiques associées. On constate l'indépendance statistique de t_0 au rayon. τ , en revanche, croît avec le rayon, comme le montre la distribution de la perméabilité $P = V/A\tau$ (où V et A sont le volume et l'aire apparente de la vésicule).

On peut approximer la perméabilisation en estimant le flux Φ de saccharose à travers une ouverture circulaire de rayon s dans la membrane. On a alors [Idiart et Levin, 2004] :

$$\Phi = 2Dsc \quad (2.9)$$

où D est le coefficient de diffusion du saccharose dans l'eau. On a d'autre part,

$$\frac{dc}{dt} = \frac{\Phi}{V} \quad (2.10)$$

avec V le volume de la vésicule. La combinaison de ces deux équations permet de montrer que la concentration en saccharose dans le milieu interne de la vésicule considérée suit une

décroissance exponentielle de temps caractéristique $\tau' = V/2Ds$, montrant ainsi la dépendance entre le temps caractéristique de perméabilisation et le rayon des vésicules.

Conclusion du chapitre

Des vésicules de composition lipidique proche de celle d'une membrane mitochondriale interne en constitue un bon modèle dans l'étude de la perméabilisation membranaire. Cette perméabilisation est une conséquence de l'oxydation des lipides. Une molécule photo-sensibilisatrice ayant une forte affinité pour les membranes lipidiques et produisant de l'oxygène singulet sous irradiation lumineuse permet le contrôle expérimental de l'oxydation des lipides membranaires. La microscopie à contraste de phase est un outil adapté au suivi de la perméabilisation des vésicules, les échanges entre milieux intérieur et extérieur provoquant une uniformisation des indices de réfraction des milieux. On constate par ce moyen que deux grandeurs - le temps de début de perméabilisation et le temps caractéristique de perméabilisation - suffisent à caractériser la décroissance du contraste, exponentielle, due à la perméabilisation.

Chapitre 3

Matériel et méthodes

Table des matières :

3.1 Produits	58
3.1.1 Solutions tampons et solvants	58
3.1.2 Lipides et membranes	58
3.1.2.1 Lipides	58
3.1.2.2 Mitoplastes	60
3.1.3 Photo-sensibilisateurs	60
3.1.4 Autres produits	60
3.2 Préparation des vésicules	62
3.2.1 Préparation des LUV	62
3.2.2 Préparation des GUV	63
3.3 Appareils	65
3.3.1 Spectroscopie d'absorbance et de fluorescence	65
3.3.2 Microscopie	66
3.3.2.1 Matériel	66
3.3.2.2 Acquisition et traitement des images	66
3.3.2.3 Analyse	67
3.3.2.4 Microscopie de fluorescence	68
3.3.3 Microspectroscopie Raman / Pincés optiques	69
3.3.3.1 Principe	69
3.3.3.2 Caractéristiques du montage	69
3.3.3.3 Traitement des spectres obtenus	70
3.3.4 Autres appareils	71

3 Matériel & Méthodes

3.1 Produits

3.1.1 Solutions tampons et solvants

Les solutions de saccharose et de glucose (fig. 36) utilisées pour l'électroformation et l'observation des vésicules géantes ont été réalisées avec pour base un tampon HEPES à 0,5 mM (Sigma) dont le pH est ajusté par une solution d'hydroxyde de potassium. Saccharose et glucose proviennent de chez Sigma. L'osmolarité de ces solutions est mesurée et ajustée si nécessaire à chaque préparation. Elles sont ensuite conservées à 4°C et filtrées (0,20µm) avant utilisation.

Figure 36 : Structure des molécules de saccharose (à gauche) et de glucose (à droite)

Pour la préparation des mélanges lipidiques, un mélange de chloroforme et de méthanol 5:3 vol/vol est utilisé. Les 2 produits sont de qualité HPLC et proviennent de chez VWR Chemicals. Ce mélange permet une bonne dissolution des lipides ainsi qu'un séchage rapide.

3.1.2 Lipides et membranes

3.1.2.1 Lipides

Différents lipides ont été utilisés lors de ces travaux. Ils sont récapitulés dans le tableau suivant :

Dénomination	Représentation chimique	Masse molaire (g/mol)	Température de transition (°C)
14:0 PC		677.933	24
18:1 PC		786.113	-17
18:1 PC Δ9 Trans		786.113	12
18:1 PC Δ6 Cis		786.113	1
18:2 PC		782.082	-57
18:3 PC		778.05	-60
18:2 PE		740.002	-40
Cardiolipide		1494.319	-

Tableau 1 : Structure chimique, masse molaire et température de transition entre phase gel et liquide des différents lipides utilisées dans l'étude. La formation de membranes pures de cardiolipide étant impossible en raison du paramètre d'empilement de ce dernier, il est impossible d'en mesurer la température de transition de phase.

Hormis le cardiolipide, tous les lipides sont synthétiques et purs à plus de 99%. Le cardiolipide est extrait de cœur de bœuf et l'espèce majoritaire à 95% est celle représentée dans le tableau : deux insaturations sur chaque chaîne aliphatique.

Tous les lipides utilisés proviennent de chez Avanti Polar Lipids et sont commandés en poudre. Dès l'arrivée au laboratoire, les lipides sont aliquotés, séchés à l'argon puis stockés à -18°C afin de minimiser les potentielles réactions avec l'air ambiant. Une fois dissous dans le mélange chloroforme/méthanol, les lipides sont utilisés dans la semaine.

Tous les lipides ici utilisés ont 18 carbones par chaînes, d'où une longueur typique de l'ordre de 10 Å.

3.1.2.2 Mitoplastes

Les mitoplastes sont des mitochondries dont on a ôté la membrane externe. Il s'agit donc d'un bon modèle de membrane interne mitochondriale, contenant à la fois lipides et protéines. Il est même possible dans certains cas de garder ces protéines fonctionnelles.

Deux types de mitoplastes ont été utilisés ici : des mitoplastes extraits de cellules de tissu adipeux brun de souris fournis par Bruno Miroux de l'Institut de Biologie Physico-Chimique, et des mitoplastes de cœur de souris fournis par l'équipe de Laurent Turet de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort.

3.1.3 Photo-sensibilisateurs

- Chlorine-e6

La chlorine-e6 provient de Frontier Scientific. Livrée en poudre, la Ce6 a été pesée puis diluée dans l'éthanol selon plusieurs concentrations, chacune correspondant à l'étude d'un mélange lipidique particulier (voir chapitre 4). À chaque préparation, spectres d'absorbance et de fluorescence ont été pris afin de préciser la concentration de la solution.

- Protoporphyrine IX

La protoporphyrine IX provient également de Frontier Scientific et a été stockée et utilisée selon les mêmes modalités que la chlorine-e6.

3.1.4 Autres produits

- Azoture de sodium

L'azoture de sodium (Sigma-Aldrich) (fig. 37) est utilisé dans nos expériences-contrôle en tant que quencher d'oxygène singulet [Hall et Chignell, 1986].

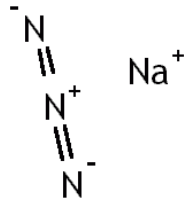


Figure 37 : Structure de l'azoture de sodium

L'azoture de sodium a été ajouté à des solutions de saccharose et de glucose, à une concentration de 50 mM. Ces solutions ont ensuite été utilisées pour la pousse et l'observation de vésicules géantes selon les mêmes protocoles que les solutions sans azoture de sodium.

- Triton X100

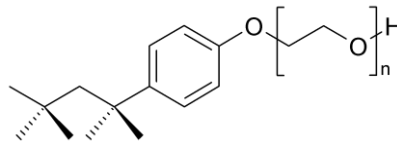


Figure 38 : Structure chimique du Triton. Dans notre cas, n est égal à 100.

Le triton X100 (fig. 38) est un détergent non ionique couramment utilisé pour la dissolution dans l'eau des amphiphiles. Il est en particulier très utilisé pour perméabiliser des cellules afin d'en extraire protéines ou organelles [Koley et Bard, 2010]. Nous l'utiliserons ici pour solubiliser vésicules et chlorure e6 lors de mesures d'affinité (voir chapitre 4).

- Laurdan

Figure 39 : Emission de fluorescence du Laurdan incorporé à des LUV de PC-PE-CL à 60:30:10 mol/mol. Le ratio Laurdan/lipide est de 1/200. Les lignes en différents pointillés représentent des pH différents. Ce type de spectre permet le calcul de la GP, un paramètre d'ordre de la membrane, en utilisant les intensités obtenues à 440 et 500 nm. Le Laurdan est ainsi une sonde ratiométrique [Khalifat et al., 2011]

Le Laurdan (6-dodecanoyl-2-diméthylaminonaphthalène, Molecular Probes) est une molécule avec une forte affinité pour les membranes lipidiques et dont le spectre de fluorescence varie avec l'exposition des lipides à l'eau. Le Laurdan permet ainsi de détecter des modifications de propriétés physiques de la membrane, notamment l'hydratation de la bicouche et son accessibilité à l'eau. De fait, le Laurdan donne ainsi une estimation de l'ordre au sein de la membrane. [Khalifat et al., 2011; Zhang et al., 2006].

Excité à 355 nm, le spectre d'émission du Laurdan (fig. 39) permet le calcul de la GP (Generalized Polarization), défini par :

$$GP = \frac{I_{440} - I_{500}}{I_{440} + I_{500}} \quad (3.1)$$

Cette GP, ratio d'intensité entre deux points d'intérêt du spectre d'émission, prend des valeurs comprises entre +1 (pour une membrane parfaitement ordonnée), et -1 (pour une membrane fortement désordonnée). Notons que ces valeurs sont en pratique inaccessibles. Afin que le Laurdan donne un signal fort, sans pour autant perturber le système, on l'utilise à la concentration d'une molécule de Laurdan pour 200 lipides.

3.2 Préparations des vésicules

3.2.1 Préparation des LUVs



Figure 40 : Montage d'extrusion. Un filtre avec des pores calibrés est inséré au centre, entre les deux cylindres de téflon. Par pression sur les seringues, la suspension de lipides traverse plusieurs fois le filtre, contraignant les vésicules formées à adopter une taille proche de celle des pores.

Des LUV sont utilisées pour les mesures d'affinité entre la Ce6 et les différentes compositions lipidiques des membranes et également pour les expériences Raman. Ces vésicules sont préparées par extrusion.

L'extrusion permet d'obtenir rapidement des vésicules lipidiques dont la distribution des tailles est monodisperse. Le principe est simple : les lipides sont placés en milieu aqueux,

ils forment alors spontanément des vésicules de diamètres variés et multilamellaire. Cette suspension est aspirée dans une seringue puis poussée à travers des pores de taille contrôlée à plusieurs reprises (fig. 40). Après quelques passages (typiquement 10 [Hope et al., 1984], les vésicules obtenues sont essentiellement unilamellaires et d'un diamètre proche de celui des pores utilisés [Frisken et al., 1999].

Selon les expériences, les vésicules étaient produites avec des filtres de 100 ou de 400 nm. L'extrudeur ainsi que les supports et les filtres nécessaires proviennent d'Avanti Polar Lipids.

3.2.2 Préparation des GUVs

L'électroformation est une méthode permettant d'obtenir un grand nombre de vésicules de diamètre supérieur à 1 μm , et jusqu'à 100 μm au moins, de composition lipidique choisie.

Cinquante μL d'une solution à 0,25 mg/mL de lipides dissous dans un mélange chloroforme et méthanol (5 :3) sont déposés sur deux plaques de verre revêtues d'oxyde d'indium-étain (ITO). Ce revêtement rend les plaques conductrices tout en préservant leur transparence optique. Immédiatement après le dépôt, les plaques sont placées sous vide pendant une heure afin d'évaporer le solvant utilisé pour la manipulation des lipides. Deux plaques sont alors accolées de manière à former une chambre, délimitée par des espaceurs en teflon, que l'on emplit d'une solution de saccharose. La chambre d'électroformation est alors reliée à un générateur basse fréquence (fig. 41), délivrant une tension pic-à-pic de l'ordre de 1 V, sous un signal sinusoïdal de l'ordre de 10 Hz (les valeurs précises varient en fonction des lipides déposés). Un champ électrique alternatif est donc généré entre les deux plaques. Les lipides étant polarisés, ils vont "suivre" ce champ électrique. Des films de lipides vont donc se soulever au rythme du champ électrique, permettant une hydratation de ceux-ci, et, à terme, la formation de vésicules géantes et unilamellaires.

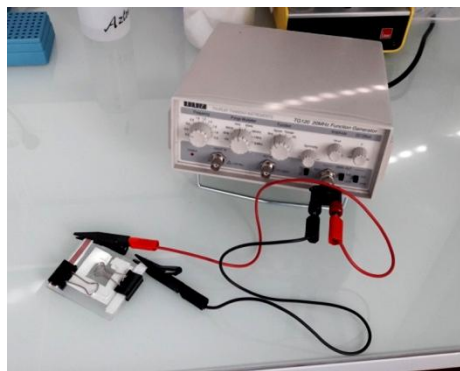


Figure 41 : Chambre d'électroformation reliée à un générateur. Le générateur impose une tension alternative entre les 2 plaques de verre conducteur de la chambre. Un champ électrique alternatif apparaît alors entre les plaques et les lipides sont partiellement entraîné par ce champ.

Après cette phase sous champ électrique, les vésicules sont laissées quelques heures au repos, durant lesquelles elles se stabilisent et se décrochent des plaques. Cela facilite la préparation des lames d'observations.

L'expérience a montré que la taille, le nombre et la stabilité des vésicules produites varient selon le type de lipides utilisé. Un ajustement des valeurs de tension et de fréquence durant l'électroformation est nécessaire. On trouvera dans le tableau suivant les conditions optimales d'électroformation pour chaque mélange.

Mélange lipidique	Fréquence (Hz)	Tension pic-à-pic (V)	Durée
18:1 PC	8	1	10h
18:2 PC	8	1	10h
18:2 PC / 18:2 PE	8	1	10 min
	500	1,2	30 min
	10	1	10h
18:2 PC / CL	10	1	10h
18:1 PC / 18:3 PC	8	0,6	10 min
	500	1	30 min
	8	1	10 h
18:2 PC / 18:2 PE / CL	8	1	10 min
	500	1	30 min
	8	1	10 h
14:0 PC	8	1	10 h
18:1 PC ($\Delta 6$)	8	1	10 min
	500	1	30 min
	8	1	10 h
18:1 PC (trans)	8	1	10h

Tableau 2 : Récapitulatif des conditions d'électroformation optimales pour chaque mélange lipidique utilisé. Pour certains mélanges, plus de GUV sont formées si l'électroformation est débutée à basse fréquence (8 Hz), passe à haute fréquence (500 Hz), puis est descendue à 8 ou 10 Hz.

○ Observations des GUVs

Après l'électroformation, la suspension de vésicules est ajoutée à une solution de glucose de même osmolarité que la solution de saccharose ayant servi à la pousse. Cette différence de milieu a essentiellement deux avantages :

- D'abord, les solutions de saccharose et glucose sont des milieux d'indices de réfraction différent (solution de glucose à 300 mOsm/L : 1,3398 [Malinin et al, 2012] ; solution de saccharose à 300 mOsm/L : 1,3478 [<http://www.refractometer.pl/refraction-datasheet-sucrose>]). Sous un microscope à contraste de phase, les vésicules seront donc plus visibles grâce à un net contraste entre intérieur et extérieur. En outre, la perte de ce contraste sera liée à des échanges entre les deux milieux.

- Ensuite, la masse volumique du saccharose ($1,59 \text{ g/cm}^3$) est plus grande que la masse volumique du glucose ($1,54 \text{ g/cm}^3$). Le saccharose, plus dense, sédimente, emportant avec lui la vésicule qui le contient. Cela facilite l'observation puisqu'en quelques minutes, les vésicules se retrouvent dans un même plan, au fond de la chambre d'observation.

Le milieu extérieur aux vésicules est changé par 3 étapes de lavages par centrifugation (centrifugation de 10 secondes sur une centrifugeuse de paillasse). Les vésicules sont ensuite déposées entre lame et lamelle de verre, puis placées sous le microscope. Le contraste visualisé confirme le changement du milieu extérieur.

○ Vésicules lipidiques en milieu aqueux sucré

Les milieux aqueux sucrés utilisés modifient les propriétés des membranes. Il a notamment été montré que la présence de saccharose réduit les modules de courbure et d'étirement des mono- et bicouches lipidiques [Vitkova et al., 2006]. Il reste pourtant pertinent de les utiliser dans les études menées car, d'une part, les modifications physiques engendrées sont connues et quantifiées et, d'autre part, de nombreuses études ont déjà été menées sur ce modèle par plusieurs équipes de recherche différentes, autorisant une confrontation des résultats.

Par ailleurs, il semble également que les sucres stabilisent les vésicules. Notamment, les sucres limitent la déshydratation des vésicules et permettent ainsi leur conservation, même en milieu sec [Crowe et al., 1988].

3.3 Appareils

3.3.1 Spectroscopie d'absorbance et de fluorescence

Les mesures d'absorbance ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre UVIKON 923 (Biotek, Kontron Instruments). Ce spectrophotomètre permet de travailler sur une large gamme spectrale de 220 à 900 nanomètres, la lumière étant émise par une lampe au deutérium (pour l'UV) et une lampe au tungstène (pour le visible).

Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence ont été enregistrés sur un spectrofluorimètre AMINCO-Bowman série 2 (Bioritech). La lumière d'excitation provient d'une lampe au xénon et deux monochromateurs permettent la sélection des longueurs d'onde d'émission et d'excitation. Pour toutes les mesures, le signal détecté est corrigé en fonction de celui mesuré à la sortie du monochromateur d'excitation, et ce afin de s'affranchir des fluctuations éventuelles de la lampe.

Pour toutes les mesures d'absorbance ou de fluorescence, les solutions ont été placées dans des cuves en quartz, les photo-sensibilisateurs ayant une forte affinité pour les plastiques.

3.3.2 Microscopie

3.3.2.1 Matériel

Les vésicules ont été observées sous un microscope inversé à contraste de phase (Nikon Eclipse Ti). Sauf exception, les images ont été prises avec un objectif x60 d'ouverture numérique 1,4 et enregistrées par une caméra sCMOS (ANDOR Neo). Une lampe de fluorescence à mercure (Osram, 100W) raccordée au microscope a été utilisée, non pas comme moyen d'observation, mais comme lumière d'activation de la réaction d'oxydation des vésicules. Afin d'utiliser les longueurs d'onde nécessaires à l'excitation et à la visualisation de la chlorure-e6, des filtres passe-bande ont été placés sur le chemin optique : un filtre à 405 nm en excitation et un filtre à 630 nm en émission. La puissance lumineuse sur l'échantillon a été mesurée et vaut $200 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ dans toutes les expériences présentées, sauf mention contraire.

3.3.2.2 Acquisition et traitement des images

L'acquisition des images a été pilotée par deux logiciels successivement : NIS (Nikon) puis Micro-Manager (Open Imaging). Les images ont ensuite été traitées et analysées sur ImageJ (NIH). En particulier, des macros développées spécifiquement ont été utilisées

afin de repérer le contour des vésicules, puis de mesurer leur contraste au cours de la réaction d'oxydation (voir Annexe).

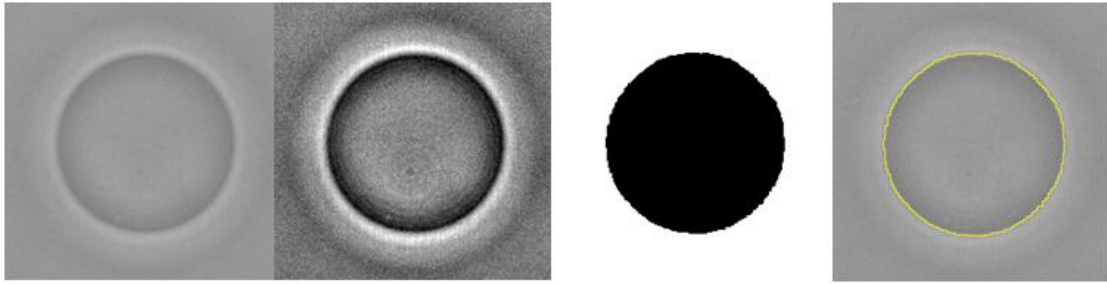


Figure 42 : Traitement de l'image dans l'objectif d'obtenir le contour d'une vésicule. A gauche, l'image obtenue par la caméra. L'optimisation du contraste mène à la seconde image, puis la binarisation à la troisième. On obtient enfin le contour superposé à la vésicule sur la quatrième image.

Le traitement des séquences d'images se fait en plusieurs étapes (fig. 42) :

- Le contraste de l'image est optimisé, puis l'image, en niveaux de gris, est binarisée en noir et blanc. Ceci permet de repérer simplement le contour de la vésicule.
- L'outil "Analyse particles" d'ImageJ est utilisé pour repérer les contours de l'image binaire obtenue. Sur le principe, cet outil repère les bords des objets de surface et de circularité choisies par l'utilisateur. La circularité est définie ici par :

$$Circ = 4\pi \times \frac{[Aire]}{[Périmètre]^2} \quad (3.2)$$

Elle vaut donc 1 pour un cercle parfait, et tend vers 0 si on s'en éloigne.

- Une fois le contour repéré, il est appliqué sur l'image originelle en niveaux de gris. On définit alors une zone de même centre que ce contour, et de rayon triple. On notera que, le contour détecté n'étant jamais un cercle idéal, c'est en réalité le petit axe et le grand axe d'une ellipse dont les tailles sont triplées. On continuera à parler de cercle par commodité.
- A l'intérieur de la zone ainsi définie sont alors évalués le niveau de gris moyen ainsi que l'écart-type standard de cette moyenne. D'autres propriétés sont également relevées telles l'aire apparent de la vésicule ou son périmètre.

3.3.2.3 Analyse

Le contraste est une grandeur qui peut adopter, selon les cas, plusieurs définitions. Dans nos études, la définition pertinente est celle d'un contraste local, exprimant la différence de niveaux de gris entre l'intérieur de la vésicule et l'extérieur de celle-ci. On définira donc le contraste C comme suit :

$$(3.3)$$

$$C = \frac{Ng_{GUV} - Ng_{fond}}{Ng_{fond}}$$

où Ng_{fond} et Ng_{GUV} représentent respectivement les niveaux de gris moyens du fond et de l'intérieur de la vésicule. Ce contraste vaut 0 lorsque les milieux intérieur et extérieur sont équivalents. On peut relier ce contraste à l'écart-type standard σ et au niveau de gris moyen Ng tirés du traitement des images.

$$\sigma^2 = \frac{1}{n} \sum_n (Ng_i - Ng)^2 \quad (3.4)$$

On peut scinder cette somme en 2 parties, l'une impliquant les pixels du fond, l'autre les pixels de la vésicule.

$$\sigma^2 = \frac{1}{n_{fond}} \sum_{n_{fond}} (Ng_i - Ng)^2 + \frac{1}{n_{GUV}} \sum_{n_{GUV}} (Ng_i - Ng)^2 \quad (3.5)$$

Les pixels du fond, malgré les fluctuations, ont une valeur de niveau de gris proche du fond moyen. La valeur de cette première somme est donc négligeable devant la seconde somme. D'autre part, on peut constater que la seconde somme quantifie l'écart entre les niveaux de gris des pixels de la vésicule et le niveau de gris moyen de l'image.

On a alors :

$$C = \frac{\sigma}{Ng} \quad (3.6)$$

Les vésicules observées étant plus sombres que le fond, le contraste est généralement négatif. On ajoutera donc un signe "-" par commodité d'usage. D'autre part, contraste et concentration en sucre étant intimement lié, on sait que, avant toute oxydation, nos vésicules ont un contraste maximum, c'est-à-dire 1, et que, une fois totalement perméabilisée, les milieux internes et externes sont les mêmes et que le contraste doit valoir 0. Ces conditions, imposées par la physique de l'expérience, sont utilisées pour normaliser le contraste issu des analyses d'image.

Ce contraste étant obtenu pour chaque image d'une séquence temporelle, on obtient une courbe fonction du temps, à laquelle on peut ajuster une exponentielle (paragraphe 2.2.6, fig. 34). Cette opération est également réalisée via une macro ImageJ (voir Annexe).

3.3.2.4 Microscopie de fluorescence

La Chlorine-e6 étant fluorescente, des images en fluorescence ont également été prises afin de vérifier la présence du photo-sensibilisateur dans les membranes. Le fait de mesurer, dans les mêmes conditions d'observation, une même intensité moyenne de fluorescence de la Ce6 d'un mélange lipidique à l'autre assure que le ratio Ce6/lipides reste

constant avec la membrane. Nous verrons au chapitre 4 que ces mesures viennent en complément de mesures plus précises d'affinité de la Ce6 avec les différents types de membranes étudiées.

3.3.3 Micro-spectroscopie Raman / Pincés optiques

3.3.3.1 Principe

La spectroscopie Raman consiste à illuminer par un laser un échantillon et à analyser la lumière diffusée. Des échanges d'énergie ont lieu entre la lumière monochromatique et le milieu, et on peut donc détecter un décalage en fréquence dans la lumière diffusée. Ce décalage est caractéristique des liaisons chimiques au sein de l'échantillon et de leur environnement. Ce type de spectroscopie peut donc être utilisé pour suivre la dynamique d'une réaction chimique mais il est peu adapté à l'analyse de vésicules larges ou géantes. En effet, un signal Raman a une intensité faible et demande donc soit un temps d'acquisition long (mais on perd l'accès à la dynamique), soit une grande quantité de matière (mais concentrer un grand nombre de vésicules modifie leur physique individuelle).

Pour pallier ce problème, on peut utiliser le laser d'excitation Raman pour créer un piège optique [Tatischeff et al., 2012]. Quelques vésicules sont alors immobilisées au sein du piège (d'un volume typique de $3\mu\text{m}^3$) et il est possible d'obtenir un spectre Raman pertinent en moins de 3 secondes d'acquisition.

Lors de nos expériences, nous avons utilisé des vésicules larges de 200 nm, préparées par extrusion dans le même tampon HEPES que celui utilisé pour la préparation des vésicules géantes dans les expériences de microscopie à contraste de phase. Dans chaque préparation, la chlorine e6 a été ajoutée dans la proportion de une molécule de chlorine pour 1000 lipides, c'est-à-dire dix fois moins que lors des expériences de contraste de phase. En effet, une partie de la Ce6 ne s'inclue pas dans la membrane et reste dans le milieu aqueux. La lumière diffuse alors sensiblement dans l'échantillon et génère un bruit très important et très fluctuant lors des analyses Raman. La concentration de la solution de Ce6 ajoutée à la suspension de LUVs a été calculée à partir des affinités mesurées au chapitre 4.

3.3.3.2 Caractéristiques du montage

L'excitation Raman est produite par un laser titane-saphir 780 nm (Spectra Physics, 3900S) pompée par un laser argon-ion (Spectra Physics, Stabilité 2017). Le laser est focalisé à travers un objectif à immersion dans l'eau (Olympus LuMFL 60x, ouverture numérique 1.1). Une goutte (environ 100 μL) de la suspension de vésicules à analyser est déposée sur

l'objectif. Le piège optique est localisé environ 2 mm au-dessus de l'objectif, au cœur de la goutte d'échantillon. A travers ce même objectif, le signal Raman est recueilli et conduit au spectrographe (Acton SpectraPro 2500i) couplé à un capteur CCD pour le proche infra-rouge (Princeton Instruments SPEC-10 400BR/LN). Les spectres sont acquis dans le logiciel WinSpec Software puis traités à l'aide d'Igor Pro.

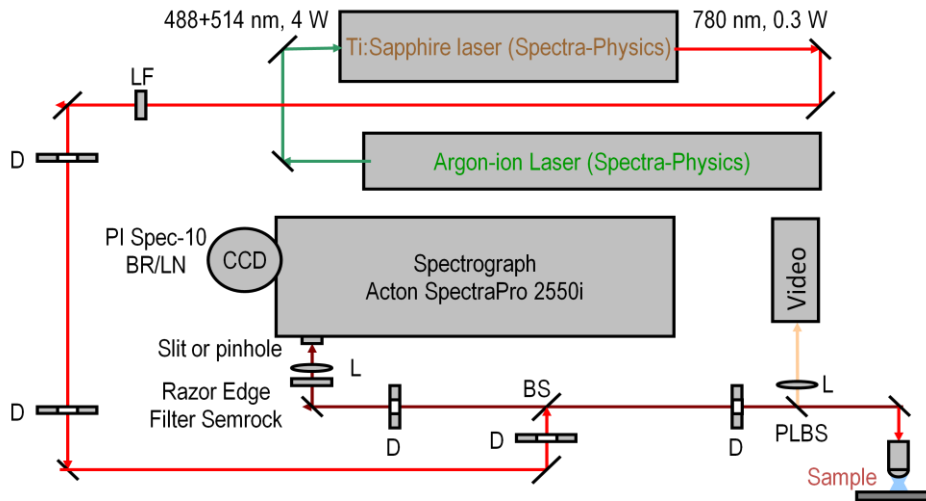


Figure 43 : Schéma optique du montage Raman-pinces optiques utilisé. *Illustration* : S.Krüglik.

3.3.3.3 Traitement des spectres obtenus

L'acquisition des données avec le montage Raman - pinces optiques se déroule en trois temps. Les premiers signaux observés sont ceux du tampon, puis quelques pics faibles apparaissent au fur et à mesure de la capture par le piège optique des vésicules lipidiques. Une fois ces pics suffisamment hauts et stables, on acquiert une série de spectres pendant la durée de l'oxydation. Enfin, on agite doucement l'échantillon afin de libérer les vésicules du piège et de pouvoir acquérir plusieurs spectres du tampon seul.

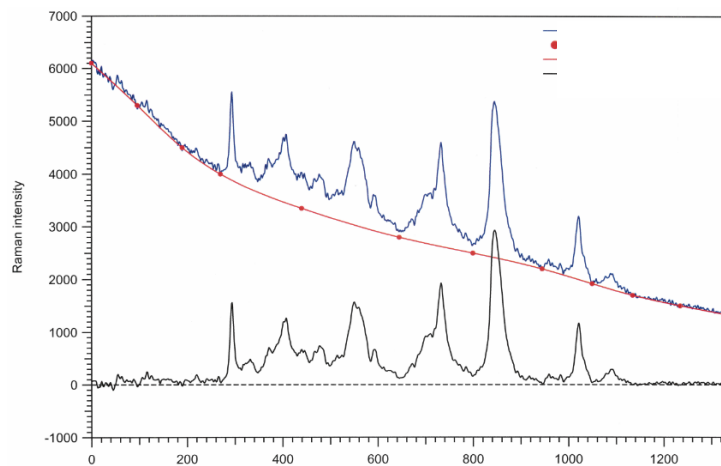


Figure 44 : Spectre Raman du 18:1 PC. La courbe bleue correspond au spectre avant traitement. En rouge est représentée la moyenne des spectres du tampon aqueux seul. La soustraction de ces deux spectres donne la courbe noire : le spectre final de vésicules de 18:1 PC.

On peut ainsi moyenner les spectres du tampon obtenus dans les mêmes conditions que l'expérience et soustraire la courbe obtenue aux spectres d'intérêt (fig. 44). On obtient alors un spectre constitué purement d'une série de pics correspondant aux liaisons des molécules.

3.3.4 Autres appareils

○ Osmomètre

Un osmomètre (Löser) mesure l'osmolarité d'une solution aqueuse, c'est-à-dire la quantité réelle de molécules solvatées. En effet, les solutions n'étant jamais idéales, les molécules dissoutes se dissocient, induisant une concentration osmotique plus importante que la concentration prévue. Cent microlitres de la solution à mesurer sont refroidis par effet Peltier puis un choc contrôlé nucléé la congélation. Le point de congélation étant directement lié à la concentration osmotique de la solution, il est alors possible de déterminer avec précision cette osmolarité.

La calibration de l'appareil a été régulièrement vérifiée à l'aide de solutions standards de 0, 300 et 900 mOsm/L d'eau, fournies par le fabricant.

On notera que, sauf exception, les solutions de saccharose et de glucose utilisées étaient mesurées à environ 300 mOsm/L d'eau. Un soin particulier a été apporté à la différence d'osmolarité entre ces deux solutions sucrées.

○ pHmètre

Un pHmètre (MeterLab PHM240, Radiometer Analytical) a été employé pour ajuster le pH du tampon HEPES utilisé dans la préparation des solutions de saccharose et de glucose. Des solutions d'hydroxyde de sodium ont servi à l'ajustement du pH.

Chapitre 4

Interactions entre la chlorure-e6 et les membranes lipidiques

Table des matières :

4.1 Mesure d'affinité entre la chlorure-e6 et les membranes lipidiques	75
4.2 Résultats et discussions	77
4.2.1 Spectres d'émission de fluorescence obtenus	77
4.2.2 Constantes d'affinité	78
Conclusion du chapitre	80

4 Interactions entre la Chlorine-e6 et les membranes lipidiques

Lors des processus photo-oxydatifs, les espèces réactives sont formées par collision avec les molécules photo-sensibilisatrices. Les ROS réagissent très rapidement et oxydent les espèces à proximité immédiate. On peut par exemple estimer la distance de diffusion de l'oxygène singulet dans les membranes à 10 nm, soit l'ordre de grandeur de l'épaisseur de la bicouche lipidique ou la largeur de 2 phospholipides (calcul à partir de [Hatz et al., 2008]). Le contrôle du niveau d'oxydation des lipides membranaires passe donc par une connaissance fine d'une part de la répartition des photo-sensibilisateurs entre la membrane et le milieu aqueux, et d'autre part de la localisation des photo-sensibilisateurs dans la membrane.

La profondeur des photo-sensibilisateurs dans la membrane peut être évaluée par des expériences de quenching de fluorescence. On utilise des lipides auxquels sont liés des quenchers à une position connue sur une chaîne aliphatique. La comparaison entre la fluorescence du photo-sensibilisateur dans une membrane sans quencher et sa fluorescence dans une membrane avec quencher renseigne finement sur la profondeur du macrocycle dans la membrane [Ben Dror et al., 2008].

La constante d'association entre membranes et photo-sensibilisateur est essentiellement mesurée par 2 méthodes expérimentales : la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et la spectroscopie de fluorescence. La RMN du proton appliquée aux photo-sensibilisateurs est en effet particulièrement sensible grâce au noyau aromatique de ces derniers. Le champ magnétique appliqué entraîne les électrons délocalisés du macrocycle, qui génèrent alors un courant annulaire ayant une forte influence sur le déplacement chimique des protons environnants [Falk, 1975]. La polarité du milieu modifie ainsi les spectres RMN de manière importante et finement quantifiable. La figure 45 donne l'exemple de spectres RMN de la TPPS₄, une porphyrine, en présence de micelles de CTAC, une molécule amphiphile. Le décalage des pics permet d'évaluer la constante d'association entre ces espèces à $10^4 M^{-1}$.

Figure 45 : Spectres RMN de la porphyrine TPPS4 en solution aqueuse (a) et en présence d'un amphiphile, le CTAC. Les pics « Pyr » et « Ph » sont respectivement associés aux résonnances des groupes pyrroles et phényles. Les déplacements chimiques de ces pics sont altérés par le milieu environnant la TPPS4, polaire (a) ou hydrophobe (b) [Gandini et al., 1999].

L'effet bathochrome visible sur les spectres d'absorption et de fluorescence des photosensibilisateurs lorsqu'ils sont en présence de vésicules lipidiques, témoigne du changement d'environnement de ces molécules. Cet effet permet également de quantifier l'affinité entre photo-sensibilisateur et membranes. Par exemple, la constante d'affinité entre l'hématoporphyrine (sous sa forme protonée) et des vésicules constituées de PC est de l'ordre de $10^5 M^{-1}$ [Brault et al., 1986]. L'utilisation de l'effet bathochrome pour les mesures d'affinité sera l'objet de la première partie de ce chapitre.

Nous décrivons ensuite l'association entre la chlorure e6 et les vésicules lipidiques, et ainsi comment il est possible de calibrer notre système expérimental afin que le taux d'espèces réactives de l'oxygène produites dans une bicouche lipidique soit constant d'une composition de membrane à l'autre.

4.1 Mesure d'affinité entre la Chlorure-e6 et les membranes lipidiques

Comme nous l'avons vu précédemment, la Ce6 est amphiphile et cette propriété lui confère une affinité élevée pour les bicouches lipidiques. Afin d'obtenir des résultats de perméabilisation comparables entre eux, il est nécessaire que la même proportion de Ce6 et de lipides soit maintenue entre chaque composition de membrane étudiée. Il est donc nécessaire de quantifier l'association de la Ce6 aux membranes lipidiques, c'est-à-dire de quantifier la répartition de la molécule entre la phase aqueuse et la phase membranaire.

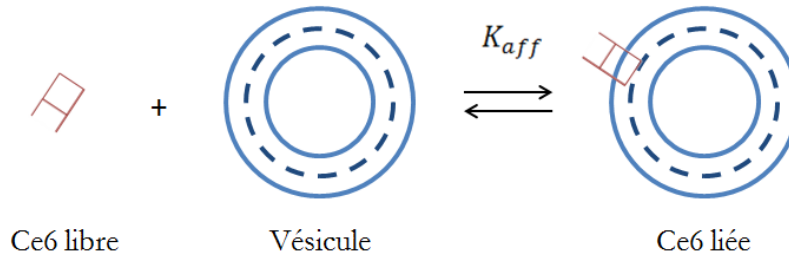


Figure 46 : Association entre la Chlorine e6 en solution et les membranes lipidiques

La constante d'affinité K_{aff} correspondant à la réaction d'association, décrite en figure 46, est définie par l'équation :

$$K_{aff} = \frac{[Ce6]_{liée}}{[Ce6]_{libre}[lip]} \quad (4.1)$$

Par ailleurs :

$$[Ce6]_{TOT} = [Ce6]_{liée} + [Ce6]_{libre} \quad (4.2)$$

La combinaison des équations 4.1 et 4.2 amène à :

$$[Ce6]_{liée} = \frac{K_{aff} [lip]}{1 + [lip]K_{aff}} [Ce6]_{TOT} \quad (4.3)$$

Cette relation, fonction de la concentration totale de chlorure (c'est-à-dire la quantité de chlorure disponible dans le milieu), de la concentration en lipides (sous forme de vésicules) et de l'affinité entre la Ce6 et les lipides considérés, nous permet d'ajuster la quantité de Ce6 qu'il faut ajouter à nos suspensions de vésicules géantes pour obtenir un ratio entre Ce6 liée et lipides constant entre chaque type de membrane.

Le contrôle de ce ratio dépend donc de la connaissance de la constante d'affinité. En milieu hydrophobe ou apolaire, le pic d'émission de fluorescence de la Ce6 est déplacé vers le rouge de quelques nanomètres (de 660 nm vers 668 nm) et son intensité augmente.

La fluorescence de la Ce6 à une longueur d'onde donnée est donc la somme de deux contributions : la fluorescence de la Ce6 en milieu aqueux et celle de la Ce6 incorporée à la membrane.

$$F = [Ce6]_{libre} \times f_{libre} + [Ce6]_{liée} \times f_{liée} \quad (4.4)$$

$$F_0 = [Ce6]_{libre} \times f_{libre} \quad (4.5)$$

$$F_{\infty} = [Ce6]_{liée} \times f_{liée} \quad (4.6)$$

où f_{libre} et $f_{liée}$ sont les facteurs de proportionnalité entre la concentration en Ce6 (respectivement libre – en milieu aqueux - et liée à la membrane) et la fluorescence émise mesurée. F_0 , F_{∞} et F représentent la fluorescence émise par l'échantillon à une longueur d'onde donnée respectivement lorsque la Ce6 est entièrement libre, entièrement dans la membrane, ou dans une situation intermédiaire.

Des équations 4.4, 4.5 et 4.6, on peut déduire :

$$F - F_0 = \frac{K_{aff}[lip]}{1 + [lip]K_{aff}}(F_{\infty} - F_0) \quad (4.7)$$

Expérimentalement, un ajustement des maxima des spectres de fluorescence de la Ce6 pris pour différentes concentrations en lipides par cette équation donne ainsi une valeur de la constante d'affinité K_{aff} . Concrètement, on commence par mesurer le spectre d'une solution de Ce6 dans un tampon aqueux excitée à 405 nm, puis on ajoute des vésicules larges (400 nm de diamètre), dispersées préalablement dans ce même tampon, au fur et à mesure. On a ainsi plusieurs spectres d'émissions de la Ce6 correspondant à plusieurs concentrations de lipides mais à concentration de Ce6 fixée.

Afin de corriger les erreurs expérimentales liées aux imprécisions sur la concentration en Ce6, à 300 μ L de chaque échantillon, dont le spectre est mesuré, est ajouté 50 μ L de Triton à 3%. Ce détergent permet de solubiliser entièrement lipides et chlorure. Le maximum d'émission de fluorescence mesuré pour chacun des échantillons avec détergent est utilisé pour normaliser les spectres des échantillons sans détergent. Chaque expérience est réalisée trois fois pour éprouver la reproductibilité des résultats.

4.2 Résultats et discussion

4.2.1 Spectres d'émission de fluorescence obtenus

Le spectre de la Ce6 en solution présente un pic d'émission à 654 nm. Au fur et à mesure de l'ajout de vésicules lipidiques, ce pic diminue tandis qu'un autre pic apparaît et augmente à 668 nm (ou à 672 nm si la membrane contient du cardiolipide), indiquant un changement de localisation de la Ce6 vers un milieu plus hydrophobe. La différence de longueur d'onde du maximum d'émission montre que la Ce6 se localise dans un environnement plus hydrophobe dans les membranes contenant du cardiolipide [Mojzisova and al., 2007 (2)] que dans les membranes n'en contenant pas.

Les spectres des échantillons avec Triton présentent quant à eux un pic à 667 nm et ont, à 2,5% près pour une même composition de membrane, la même intensité de fluorescence. Ce pourcentage est cohérent avec l'erreur expérimentale sur la concentration en Ce6.

La superposition des spectres normalisés (fig. 47) met en évidence la présence d'un point isobestique à 660 nm. Ce point montre que deux états sont possibles pour la Ce6. Ainsi elle se situe soit en milieu polaire, soit en milieu hydrophobe.

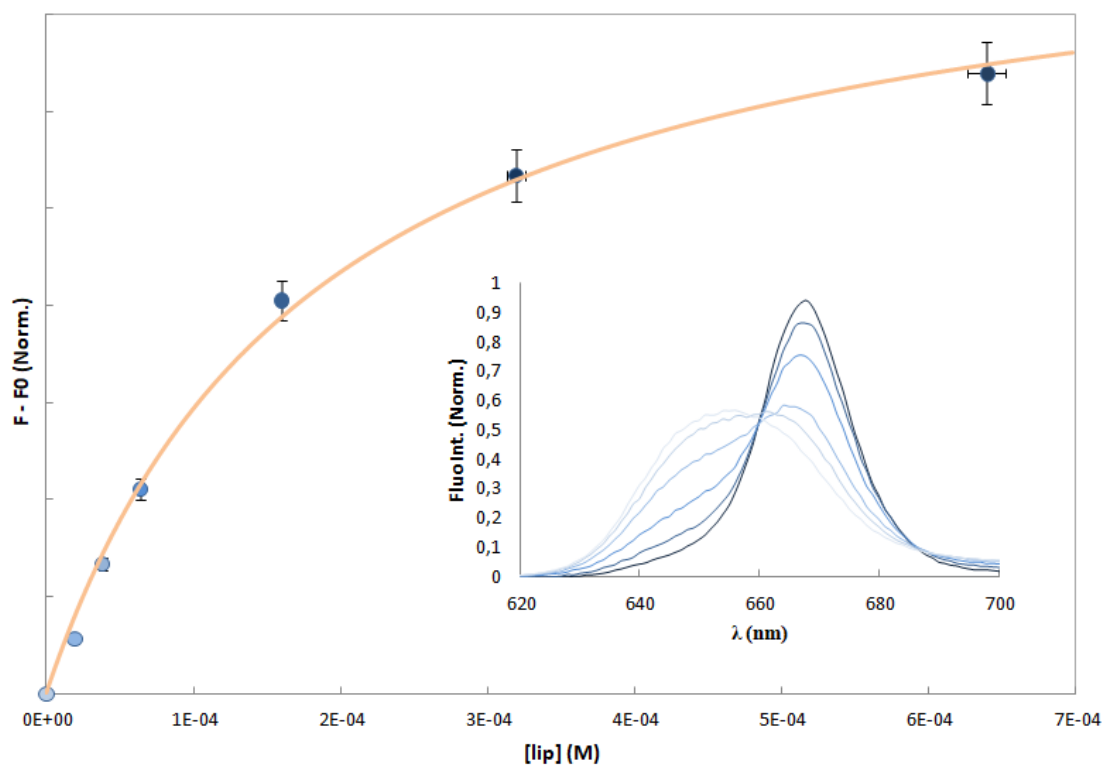


Figure 47 : Mesure d'affinité entre la chlorure-e6 et des vésicules de 18:2 PC. Dans l'encart, on trouvera les spectres d'émission de fluorescence de la chlorure-e6 en présence d'une concentration croissante de 18:2 PC sous forme de LUV de 100 nm. La ligne pointillée à 668 nm indique les points ajustés par la courbe orange selon l'équation calculée dans le paragraphe 4.1.1. De cet ajustement est déduite la valeur de la constante d'affinité recherchée.

Les valeurs de fluorescence pour chaque échantillon à 668 nm peuvent être ajustées suivant l'équation 4.7.

4.2.2 Constantes d'affinité

Pour chacun des mélanges lipidiques étudiés, la constante d'affinité avec la chlorure e6 a été ainsi mesurée, dans un tampon aqueux d'HEPES dont le *pH* est ajusté à 7,8. Le *pH* est ici une variable importante car l'affinité entre chlorure et vésicule peut en dépendre, passant par exemple de $(9,1 \pm 0,6) \times 10^3 M^{-1}$ à *pH* 6,5 à $(2,3 \pm 0,4) \times 10^3 M^{-1}$ à *pH* 8 pour des membranes de 18 :1 PC [Mojzisova et al., 2007b].

Pour des membranes constituées de 18:1 PC, l'affinité que nous avons mesurée est de $(5,00 \pm 1,41) \times 10^3 M^{-1}$, valeur cohérente avec celles de la littérature [Kerdous et al., 2011 ; Mojzisova et al., 2007b].

Pour des membranes de 18:2 PC, c'est-à-dire un lipide identique au 18:1 PC à ceci près que ses chaînes aliphatiques présentent chacune deux insaturations au lieu d'une seule, on mesure, pour la constante d'affinité, une valeur de $(6,83 \pm 2,01) \times 10^3 M^{-1}$. Elle est donc du même ordre que pour les membranes de 18:1 PC. On peut le comprendre en remarquant que les propriétés d'empilement et d'ordre du

18:1 PC et du 18:2 PC sont proches. Il est ainsi peu étonnant que l'intégration de la chlorure à la membrane se fasse avec la même affinité, à la même vitesse et à la même profondeur dans les deux cas. Le même commentaire pourra être fait pour des membranes pures de 18:1 $\Delta 6$ PC, lipide dont la double liaison C=C se situe en position 6 et non 9 comme sur le 18:1 PC.

L'affinité mesurée pour des membranes de 18 :1 PC en conformation *trans* est de l'ordre de deux fois plus faible que pour la conformation *cis*, $(3,25 \pm 0,5) \times 10^3 M^{-1}$. Le changement de conformation de la double liaison sur chacune des deux chaînes, s'il ne modifie pas l'aire par lipide dans la membrane, modifie la structure tridimensionnelle des lipides [Gudheti et al., 2007]. L'encombrement différent dans la membrane pourrait ainsi expliquer une affinité légèrement plus faible.

Pour des membranes pures de 18:3 PC, lipides ayant trois double liaisons sur chacune de ses deux chaînes aliphatiques, l'affinité avec la chlorure e6 mesurée est de $(1,62 \pm 0,11) \times 10^3 M^{-1}$, soit 4,2 fois plus faible que pour le 18:2 PC. Ceci peut s'expliquer par le fort désordre qui règne dans la partie hydrophobe d'une bicouche ainsi constituée. L'encombrement y est tel que la chlorure s'y intègre plus difficilement.

Il est également intéressant de constater que l'affinité pour un mélange de 50% de 18 :1 PC et de 50% de 18 :3 PC : $(4,61 \pm 0,46) \times 10^3 M^{-1}$, est légèrement différente de la moyenne des affinités de ces 2 types de membrane, ainsi que de celle des membranes de 18 :2 PC. Là encore, des interactions entre les chaînes hydrophobes des différents lipides plus fortes qu'entre les chaînes de ces lipides pris isolément peuvent expliquer ce résultat.

Comparons maintenant l'affinité avec la chlorure-e6 de membranes de 18:2 PC avec des membranes constituées de 18:2 PC et de 18:2 PE. L'affinité de ces dernières est mesurée à $(1,03 \pm 0,13) \times 10^4 M^{-1}$, soit 1,5 fois plus grande que pour les vésicules de 18:2 PC. Le 18:2 PE est un lipide dont la tête polaire (terminée par un $-NH_3$) est de même charge mais de taille moins importante que celle du 18:2 PC (terminée par un $-N(CH)_3$). Cette différence peut permettre à la chlorure e6 de s'intégrer plus profondément dans une membrane contenant du PE. Si, a priori, cela ne change pas significativement la cinétique d'association, la partie hydrophobe de la chlorure s'en trouve stabilisée, ralentissant la cinétique de dissociation, expliquant ainsi une affinité plus élevée pour les membranes contenant du 18:2 PE.

Le cardiolipide est constitué d'une tête polaire présentant deux charges négatives (fig. 10). Il constitue donc une matrice moins accueillante pour la chlorure-e6, elle-même constituée, dans sa partie polaire, de groupements carboxyle, fortement électronégatifs. Pour des membranes constituées de 85 %mol de 18:2 PC et de 15 %mol de cardiolipide, on mesure d'ailleurs une constante d'affinité 3,2 fois plus faible que pour des membranes de 18:2 PC : $(2,14 \pm 0,33) \times 10^3 M^{-1}$. La différence d'affinité va dans le même sens lorsqu'on compare une membrane de 18:2 PC et 18:2 PE avec une membrane de 18:2 PC, 18:2 PE et cardiolipide $((6,84 \pm 0,37) \times 10^3 M^{-1})$.

On récapitule les valeurs de constantes d'affinité mesurées dans le tableau suivant :

	18:1 PC	18:2 PC	18:2 PC / 18:2 PE
$K_{aff} (M^{-1})$	$(5,00 \pm 1,41) \times 10^3$	$(6,83 \pm 0,21) \times 10^3$	$(1,03 \pm 0,13) \times 10^4$

	18:2 PC / CL	18:2 PC / 18:2 PE / CL	18:3 PC
$K_{aff} (M^{-1})$	$(2,14 \pm 0,33) \times 10^3$	$(6,84 \pm 0,37) \times 10^3$	$(1,62 \pm 0,11) \times 10^3$

	18:1 PC $\Delta 6$	18 :1 PC (trans)	14 :0 PC	18 :1-18 :3 PC 50/50
$K_{aff} (M^{-1})$	$(5,36) \times 10^3$	$(3,25 \pm 0,5) \times 10^3$	$(6,07 \pm 0,57) \times 10^3$	$(4,61 \pm 0,46) \times 10^3$

Conclusion du chapitre

Par des mesures d'émission de fluorescence de la chlorine e6 en présence de membranes lipidiques, les constantes d'affinité entre ce photo-sensibilisateur et des bicouches constituées de différents types de lipides en différentes proportions ont été évaluées. Ces constantes seront utilisées afin de garder un rapport entre la concentration en Ce6 dans les membranes et la concentration en lipides constant d'une composition membranaire à l'autre.

La concentration effective en lipides dans une lame d'observation diffère de la concentration en lipides dans la plaque d'électroformation. En effet, le passage des vésicules de la plaque à la lame, ainsi que les lavages induisent des pertes de lipides. Cependant, on peut estimer cette concentration effective par observation de la lame au microscope. Connaissant le nombre et le rayon des vésicules ainsi que l'aire moyenne par lipide (de l'ordre de 50 \AA^2 [Petrache et al., 2000]), on estime que $[lip]_{eff} \sim 10^{-8} M$. Les constantes d'affinité mesurées étant de l'ordre de 10^3 à $10^4 M^{-1}$, le terme en $[lip]K_{aff}$ est très inférieur à 1 et l'équation 4.3 peut être linéarisée :

$$\frac{[Ce6]_{liée}}{[lip]} = K_{aff}[Ce6]_{TOT} \quad (4.8)$$

L'équation 4.8 sera ainsi utilisée pour calculer, pour chaque mélange, la concentration de Ce6 à ajouter à la suspension de vésicule. Puisque les conditions d'observation sont identiques d'un type de membrane à l'autre, l'intensité moyenne de la fluorescence de la

Interactions entre la chlorine-e6 et les membranes lipidiques

membrane ne dépend alors que de la quantité de Ce6 dans la membrane. Avant chaque expérience, il a ainsi été vérifié, par microscopie, que cette intensité a la même valeur pour chaque mélange, nous garantissant un ratio de 1 chlorine pour 100 lipides.

Chapitre 5

Effets du cardiolipide dans la résistance des membranes lipidiques à un stress oxydant

Table des matières :

5.1 Conception des membranes	86
5.2 Transitions de forme et perméabilisation de vésicules subissant un stress oxydant	87
5.2.1 Effets du cardiolipide sur la dynamique des changements morphologiques	87
5.2.2 Variations de l'aire membranaire et ouverture de pores durant la phase II	89
5.2.2.1 Délai entre deux ouvertures de pores	90
5.2.2.2 Evolution du module élastique et de la tension de membrane lors de la perméabilisation	91
5.3 Oxydation de membranes composées de PC, PE et cardiolipide	94
5.3.1 Effets du PE	85
5.3.2 Comportement d'une IM-GUV oxydée	95
5.4 Discussions	98
5.4.1 Origine de l'augmentation de la pression osmotique responsable des cycles de gonflement	98
5.4.2 Défauts membranaires et perméabilisation	98
Conclusion du chapitre	99

5 Effets du cardiolipide dans la résistance des membranes lipidiques à un stress oxydant

La présence de cardiolipide dans une membrane phospholipidique modifie ses propriétés physico-chimiques. Pur, dispersé en milieu aqueux à température et force ionique physiologiques, le cardiolipide s'organise en structures inverses, telle la phase nommée H-II (fig. 5), *a contrario* des phospholipides les plus présents dans les membranes biologiques [Dahlberg, 2007]. Lorsque le cardiolipide est présent à fort pourcentage dans une membrane phospholipidique, des vésicules se forment, mais elles ne sont pas sphériques [Tomsie et al., 2005]; à plus faible pourcentage en revanche, (typiquement inférieur à 30%, comme dans le cas des membranes mitochondriales internes), des vésicules semblables à celles formées par des phospholipides sans cardiolipide, essentiellement sphériques, se forment. Cependant, la distribution des tailles de vésicules est alors majoritairement répartie vers les rayons plus petits [Tomsie et al., 2005]. En effet, le cardiolipide tend à réduire l'aire moyenne par lipide [Lewis et McElhaney, 2009], propriété également observée sur des monocouches [Phan et Shin, 2015], et compacte ainsi l'ensemble de la membrane [Khalifat et al., 2011].

Ces effets sont directement liés à la structure chimique particulière du cardiolipide : deux phosphatidylglycérols liés à un même glycérol central. Ainsi, la tête polaire est bien moins volumineuse que les quatre chaînes aliphatiques constituant la partie hydrophobe de la molécule. Cette structure induit un paramètre d'empilement supérieur à 1, en cône inversé, générant, au sein d'une membrane, une courbure locale négative. La tête polaire du cardiolipide est ainsi peu accessible latéralement. Ceci a essentiellement 2 conséquences : peu d'interaction avec les têtes polaires des lipides proches, mais également une meilleure disponibilité pour des interactions en surface de membranes (avec par exemple des ions métalliques, des peptides ou des protéines de surface) [Lewis et McElhaney, 2009].

La structure stéréochimique du cardiolipide implique également une faible flexibilité conformationnelle : la petite tête polaire partagée entre 4 chaînes augmente la cohésion entre ces chaînes (ce qui augmente d'ailleurs la température de transition de phase gel/liquide de la membrane). C'est pourquoi, dans une membrane phospholipidique contenant du cardiolipide, les chaînes carbonées des cardiolipides sont orientées préférentiellement selon la normale à la surface de la membrane, tandis que les glycérols de tête sont essentiellement parallèles à la bicouche [Allegrini et al., 1984]. Cet alignement particulier du cardiolipide au sein de la membrane ainsi que sa structure chimique plane et rigide pourraient conférer à la membrane des propriétés pseudo-nématiques : une courbure de la membrane faciliterait l'alignement des cardiolipides entre eux, et réciproquement (fig. 48) [Fournier et Galatola, 1998].

Figure 48 : Bicouche lipidique dont la structure chimique des constituants engendre un couplage courbure-nématicité [Fournier and Galatola, 1998].

A l'instar de sa physique, la chimie du cardiolipide diffère de celle des autres phospholipides, notamment vis-à-vis de l'oxydation. Dans le cas d'une oxydation par l'oxygène singulet, les produits des autres phospholipides (insaturés) sont des hydroperoxydes, des lipides dont les chaînes aliphatiques sont raccourcies, ainsi que des acyles (voir paragraphe 1.3.2.2). Dans le cas du cardiolipide, il n'a pas été détecté d'espèces clivées. Plusieurs types de peroxydes sont en revanche formés : monohydroperoxydes, bis monohydroperoxydes et dihydroperoxydes (fig. 49) [Kim and al., 2010]. Ces derniers seraient majoritaires lors d'une oxydation par l'oxygène singulet. La raison en est que l'oxygène singulet, après une première peroxydation, réagit plus rapidement avec un diène conjugué, qu'avec un méthyl linoléate. Le produit majoritaire contient donc une chaîne aliphatique doublement hydroperoxydée.

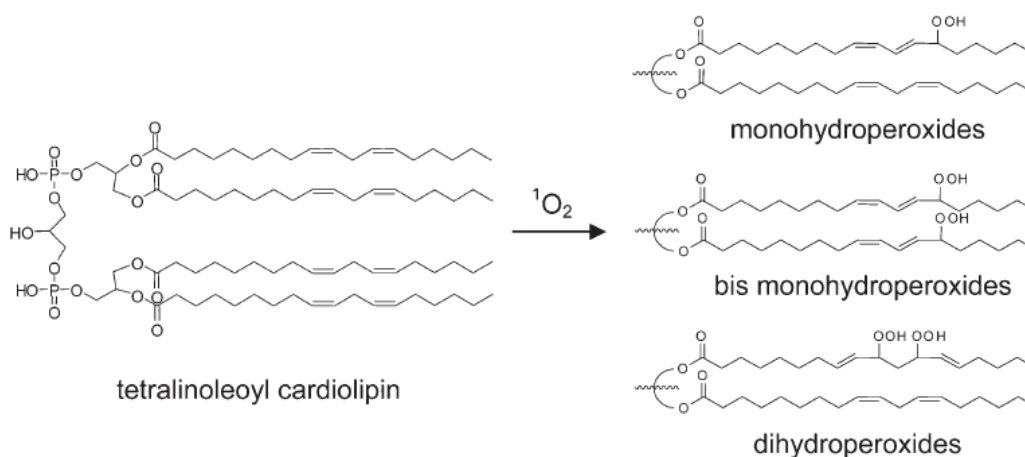


Figure 49: Structures des produits d'oxydation du cardiolipide. La forme dihydroperoxyde est caractéristique d'une réaction avec l'oxygène singulet. [Kim and al., 2011]

Dans ce chapitre, nous nous proposons d'étudier l'influence du cardiolipide, présent à faible pourcentage dans une membrane phospholipidique, sur la résistance au stress oxydant photo-induit de cette dernière. Ainsi, nous commencerons par donner des arguments sur la pertinence de ce modèle membranaire dans la compréhension de la physico-chimie des membranes mitochondriales internes, puis nous décrirons les résultats obtenus lors de nos expériences d'oxydation de vésicules géantes contenant du

cardiolipide. Seront ensuite discutées les mécanismes de perméabilisation des vésicules ainsi que les possibles conséquences biologiques des résultats obtenus.

5.1 Conception des membranes

La membrane interne mitochondriale est composée de plusieurs types de lipides : 10 à 20 mol% de cardiolipide, 40 mol% de PC, 30 mol% de PE, 5 mol% de phosphatidylinositol, de 3 mol% de phosphatidylserine et de moins de 1 mol% de stérols [Daum and Vance, 1997]. Ces pourcentages varient légèrement d'un type cellulaire et d'un organisme à l'autre. La distribution de ces lipides diffère en revanche grandement d'un feuillet à l'autre (fig. 50), caractéristique qui sera absente de nos modèles.

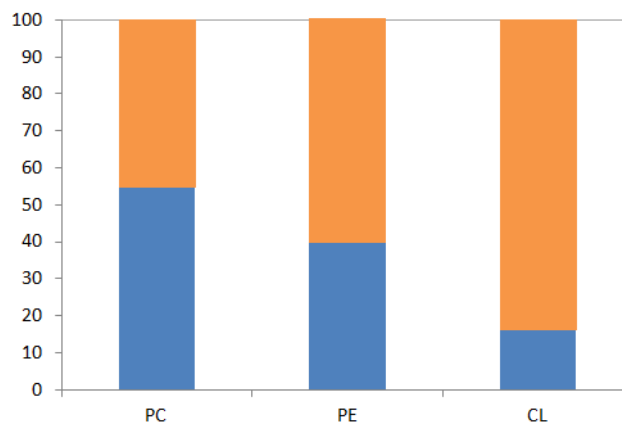


Figure 50 : Répartition des phospholipides dans la membrane interne mitochondriale du foie de rat entre le feuillet exposé à l'espace inter-membranaire (en bleu) et le feuillet du côté de la matrice (en orange). Adapté à partir de [Daum et Vance, 1997]

Les lipides les plus représentés sont les PC, PE et le cardiolipide, puisqu'ils constituent, à eux trois, entre 80 et 90 % des lipides de la membrane. Il s'avère que des membranes composées de ces trois lipides, dans des proportions voisines de celles de la membrane interne mitochondriale, sont un bon modèle minimal de cette membrane, dans le cadre d'une étude biophysique de leur mécanique [Nichols-Smith et al., 2004 ; Khalifat et al., 2008 ; Kawai et al., 2014].

Le modèle que nous avons choisi est ainsi constitué de trois types de lipides. Afin de comprendre l'influence de chacun, il conviendra d'avancer par comparaison. L'effet du cardiolipide sera déduit d'une comparaison entre le comportement d'une membrane pure de PC et d'une membrane constituée de 85 mol% de PC et de 15 mol% de cardiolipide.

Pour comprendre ensuite notre modèle à 3 lipides, plus proche de la composition d'une membrane interne mitochondriale, on comparera les comportements de membranes constituées de 50 mol% de PC, 35 mol% de PE et 15 mol% de cardiolipide, à des

membranes de 59 mol% de PC et 41 mol% de PE. Ces dernières correspondent en effet à la matrice lipidique du cardiolipide dans le mélange précédent.

Afin d'éviter les effets liés aux différences entre les chaînes aliphatiques des lipides, elles seront toutes choisies ici avec une longueur de 18 carbones et 2 insaturations par chaînes, en position 9 et 12.

Pour chacune de ces membranes, l'oxydation sera déclenchée par l'irradiation de la chlorure e6, présente au ratio de 1 molécule de Ce6 pour 100 lipides (voir chapitre 4).

5.2 Transitions de forme et perméabilisation de vésicules subissant un stress oxydant photo-induit

Les réactions entre l'oxygène singulet et les lipides d'une vésicule phospholipidique engendrent des transitions de forme de cette dernière, ainsi que des modifications de ces propriétés physico-chimiques.

Avant le début de l'irradiation, les vésicules fluctuent légèrement, ce qui est attendu puisque les milieux intérieur et extérieur à la vésicule sont choisis pour avoir une légère différence d'osmolarité (typiquement de 5 mOsm/L). Les membranes sont alors détendues. Les premières secondes d'irradiation déclenchent une courte phase de fortes fluctuations sur les vésicules ainsi que des bourgeonnements externes, puis internes (fig. 50). Cependant, si une vésicule contient du cardiolipide, les grandeurs caractéristiques de ces changements morphologiques varient.

5.2.1 Effets du cardiolipide sur la dynamique des changements morphologiques

Phase A :

Les changements morphologiques d'une vésicule lipidique subissant un stress photo-induit impliquent à la fois l'aire de la membrane et le volume de la vésicule. Cependant, ces deux quantités ne varient pas selon la même dynamique : les changements d'aire rapides car dépendant directement de réactions chimiques, interviennent avant les changements de volume, qui eux dépendent essentiellement de l'effet osmotique.

On peut observer que les fluctuations de la Phase A sont plus importantes pour les membranes de 18:2 PC et cardiolipide (CL-GUVs) que pour les membranes de 18:2 PC pur (PC-GUVs) (fig. 51). Cette observation concorde avec le fait que la présence de cardiolipide dans une membrane de 18:2 PC diminue son module de courbure [Shoemaker et al., 2002 ; Nichols-Smith et al., 2004]. En revanche, le nombre moyen de bourgeonnements visibles par vésicule est constant entre ces deux types de membranes.

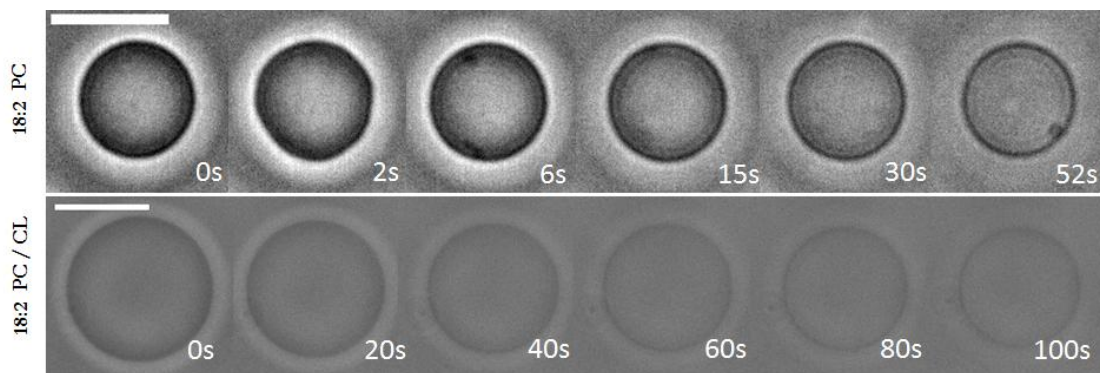


Figure 51 : Oxydation photo-induite de GUVs de 18 :2 PC (en haut) et de GUVs de 18 :2 PC et cardiolipide (85 :15) (en bas). Les vésicules ont été préalablement mises en présence de Chlorine-e6 puis irradiées à partir de $t = 0$. Les transitions de forme observées découlent d'une augmentation puis d'une diminution de l'aire de la membrane. Barre d'échelle : 10 μm .

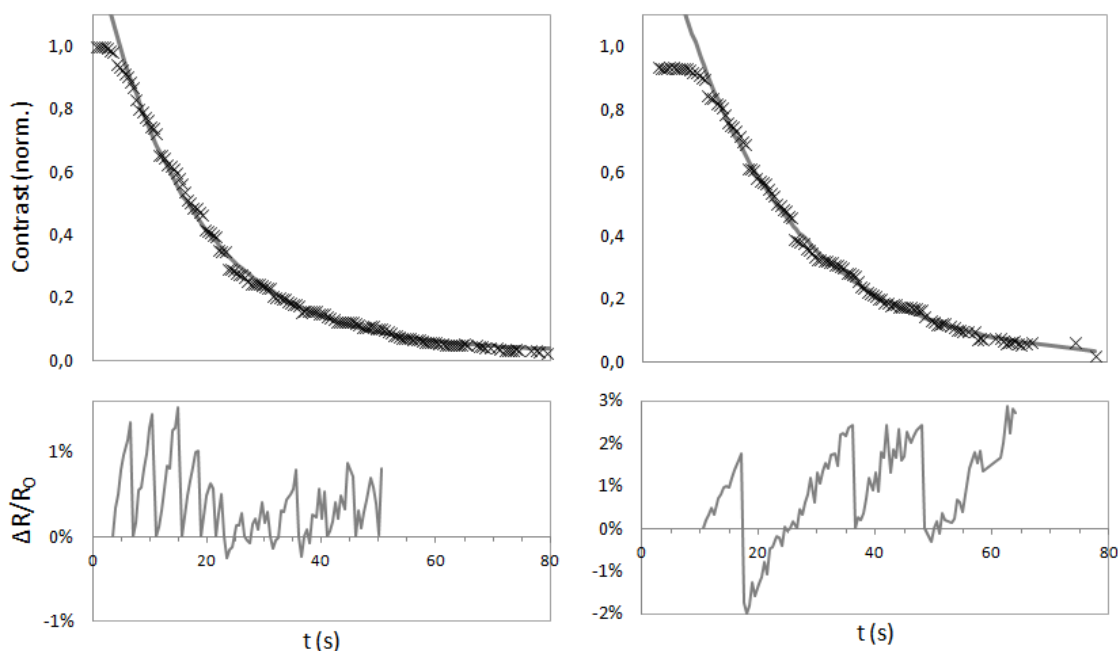


Figure 52 : Perméabilisation de PC-GUVs et de CL-GUVs. (En haut) Evolution typique du contraste entre l'intérieur et l'extérieur d'une vésicule géante subissant un stress oxydant (PC-GUVs à gauche et CL-GUVs à droite). La décroissance du contraste montre l'établissement d'un équilibre entre le soluté contenu dans la vésicule (saccharose) et le soluté du milieu extérieur (glucose). Aux points expérimentaux est ajustée une exponentielle décroissante, de laquelle est extraite le temps de début de perméabilisation t_0 et un temps caractéristique de perméabilisation. La perméabilité photo-induite est calculée à partir de ce temps caractéristique. (En bas) Variation relative du rayon des PC-GUVs et CL-GUVs durant leur perméabilisation.

Phase B :

La perméabilisation de la membrane due à la photo-oxydation est estimée à partir de la perte de contraste entre les milieux délimités par la vésicule, perte découlant de l'échange entre ces deux milieux du saccharose de l'intérieur de la vésicule et du glucose de l'extérieur.

Comme décrit au chapitre 2, le contraste d'une PC-GUV ou d'une CL-GUV décroît selon une exponentielle (fig. 52), solution de l'équation suivante :

$$\frac{dc_{in}}{dt} = -\frac{PA}{V}c_{in} \quad (5.1)$$

où c_{in} est la concentration en saccharose à l'intérieur de la vésicule, P est la perméabilité photo-induite de la membrane, A est l'aire de la membrane et V le volume de la vésicule [Heuvingh et Bonneau, 2009]. Cette équation, valable à partir du temps t_0 appelé temps de début de perméabilisation, décrit ainsi la diffusion du soluté à travers la membrane au cours de sa perméabilisation. Le volume externe à la vésicule (de l'ordre de 100 μL) étant bien plus grand que le volume défini par la membrane de la vésicule (de l'ordre de 10^{-10} μL), on peut considérer la concentration externe en saccharose comme étant constante.

L'ajustement d'une exponentielle aux courbes d'évolution du contraste en fonction du temps donne ainsi les grandeurs t_0 et P , qui seront moyennées sur plusieurs vésicules (typiquement 30).

	t_0 (s)	P (10^{-7} m/s)
18:2 PC	$10,0 \pm 0,85$	$4,2 \pm 0,33$
18:2 PC / Cardiolipide	$16,8 \pm 1,79$	$2,26 \pm 0,25$

Tableau 3 : Valeurs des temps de début de perméabilisation et des perméabilités photo-induites pour les PC-GUVs et les CL-GUVs

Les résultats obtenus amènent les premières conclusions suivantes. Malgré le nombre de cibles à l'oxydation que présente le cardiolipide, sa présence au sein de la membrane accroît la résistance de cette dernière à l'oxydation d'une part et la retarde d'autre part ; la perméabilisation débute plus tard (t_0 est augmenté d'un facteur 1,7) et la perméabilité photo-induite est diminuée d'un facteur 1,9).

5.2.2 Variations de l'aire membranaire et ouverture de pores durant la Phase B

Un suivi de l'aire des vésicules durant leur perméabilisation (Phase B) met en évidence des cycles : l'aire augmente (de 0,25 à 2 % selon les compositions) pendant quelques secondes puis chute plus drastiquement (de 2,5 à 5 %) (fig. 52). Ce comportement peut

correspondre à des cycles de gonflement-éclatement, chaque éclatement étant lié à l'ouverture d'un pore dans la membrane.

5.2.2.1 Délai entre deux ouvertures de pores

Des pores micrométriques, de très faible durée de vie (typiquement 30 à 50 ms), apparaissent au moment de la baisse brutale de l'aire membranaire, sans incidence significative sur la diminution du contraste (fig. 53). En effet, la contribution de la diffusion du soluté à travers ces ouvertures est négligeable au vu de sa faible durée de vie.

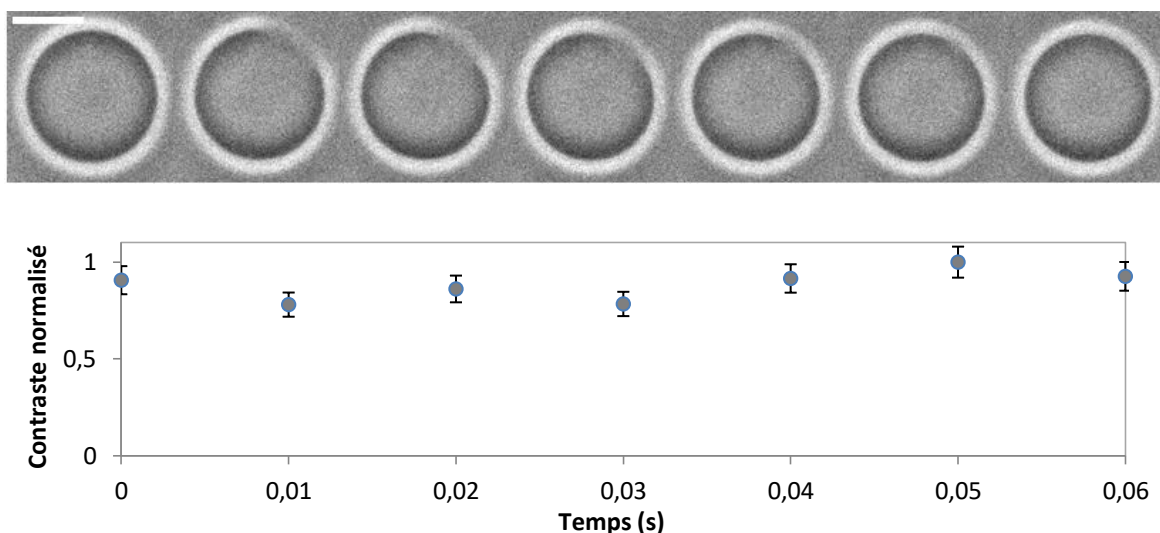


Figure 53 : En haut : Séquence d'images à 100 Hz montrant l'ouverture d'un pore à travers une vésicule de 18:2 PC pendant sa perméabilisation. Barre d'échelle : 10 μm . En bas : Evolution du contraste au cours de l'ouverture du pore. Le temps $t=0$ est choisi à la date d'ouverture du pore. On observe que le contraste reste constant durant le temps d'ouverture du pore, indiquant qu'aucun échange significatif entre les milieux intérieur et extérieur n'a lieu.

La possibilité d'ouverture d'un pore dans la membrane est le résultat de la compétition entre deux termes : l'énergie de tension superficielle et l'énergie d'ouverture du pore. La première dépend de la tension de membrane σ et favorise l'ouverture et l'élargissement du pore. La seconde en revanche, dépend de la tension de ligne γ et favorise la fermeture du pore. Cette tension de ligne apparaît à cause des lipides en bordure du pore : les chaînes aliphatiques de ces derniers sont plus exposées à l'eau et moins stabilisées par le milieu hydrophobe plus distant constitué par la bicouche.

La compétition entre tension de membrane et tension de ligne est exprimée par le ratio $r_c = \gamma/\sigma$, qui donne ainsi le rayon critique associé au franchissement de cette barrière énergétique. Si un pore dans une membrane tendue a un rayon $r_p < r_c$, le pore se ferme. Dans le cas contraire $r_p > r_c$, le pore grandit et, à terme, la vésicule perd son intégrité [Karatekin et al., 2003].

Au cours de nos expériences, il nous était impossible d'obtenir des mesures de r_c et $r_p(t)$ suffisamment précises et avec suffisamment de statistiques. En effet, la visualisation des

pores ne peut se faire qu'en microscopie rapide (> 100 images par seconde), et même ainsi, le nombre d'images avec le pore ouvert est faible (entre 3 à 5 images maximum). De plus, l'ouverture d'un pore dans le plan focal est un événement assez rare. Cependant, le délai entre deux ouvertures de pores successives Δt sur une même vésicule peut être déduit des courbes de suivi du rayon (fig. 52). On peut alors voir que ce délai augmente au fur et à mesure de l'oxydation de la membrane, ce qui indique une influence du degré d'oxydation sur le rayon critique r_c .

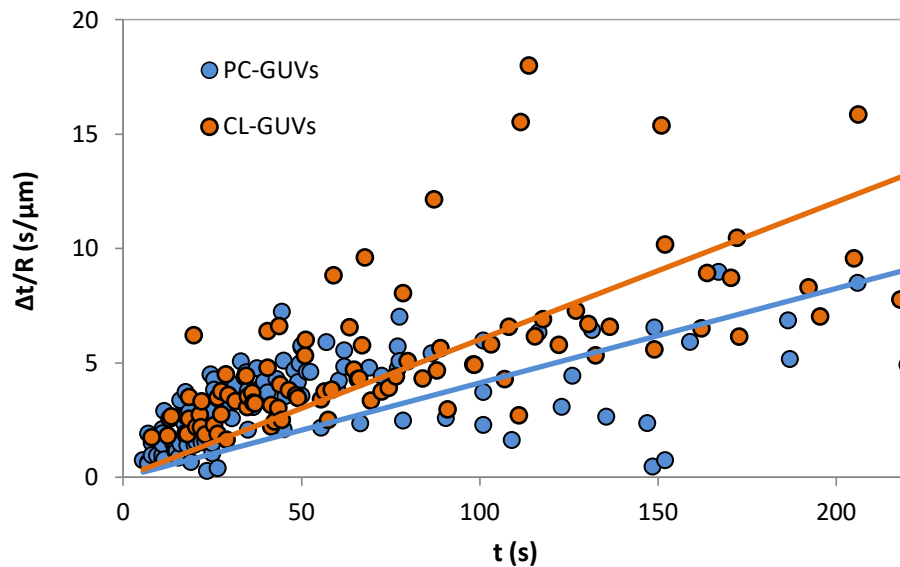


Figure 54 : Ouverture de pores pendant l'oxydation des vésicules lipidiques. Le délai entre deux pores, normalisé par le rayon de la vésicule, est ici tracé en fonction du temps d'irradiation. Les points bleus correspondent aux vésicules de 18:2 PC, les orange aux vésicules de 18:2 PC et Cardiopolipide. Les droites de tendance correspondantes montrent un délai entre deux pores plus grands pour des vésicules contenant du cardiopolipide.

Afin de comparer plusieurs vésicules, le délai entre deux ouvertures de pores a été normalisé par leurs rayons (fig. 54). On constate alors que l'intervalle de temps entre l'apparition de 2 pores est plus grand pour les CL-GUVs que pour les PC-GUVs. Cette observation va dans le sens d'une meilleure résistance à l'oxydation des CL-GUVs.

5.2.2.2 Evolution du module élastique et de la tension de membrane lors de la perméabilisation

Outre ces observations, ces cycles de gonflement-éclatement permettent d'estimer l'évolution de certains paramètres physiques de la membrane, notamment celle de son module élastique d'extension.

Le gonflement augmente le rayon de la vésicule de 0,5 à 2 % pour une PC-GUV, et de 1,5 à 3% pour une CL-GUV. L'augmentation relative de volume est alors donnée par :

$$\frac{\Delta V}{V_0} = \left(\frac{R}{R_0}\right)^3 - 1 \quad (5.2)$$

On obtient entre 1 et 6% d'augmentation de volume pour les PC-GUVs, et 5 à 9% pour les CL-GUVs. La tension de membrane augmentant avec le temps, tout comme son aire, il est possible d'estimer la différence d'osmolarité Δc , entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule, responsable du gonflement.

La perméabilité à l'eau de la membrane peut être définie par un coefficient P_f . Ici nous ferons l'hypothèse que la perméabilité à l'eau de la membrane varie avec la composition en lipides de la même manière que sa perméabilité au saccharose. Cette perméabilité est reliée à la variation de volume de la vésicule par :

$$\frac{1}{A} \frac{dV}{dt} = P_f V_w \Delta c \quad (5.3)$$

Pendant le gonflement, les solutés sont de plus en plus dilués et la cinétique conduisant au nouvel équilibre est décrite par :

$$\frac{dR}{dt} = P_f V_w \left\{ c_0 \left[\left(\frac{R}{R_0}\right)^3 - 1 \right] + \Delta c \left(\frac{R}{R_0}\right)^3 \right\} \quad (5.4)$$

Pour obtenir la dérivée de $R(t)$, trois hypothèses doivent être faites. En premier lieu, nous considérerons que l'osmolarité à l'intérieur de la vésicule passe instantanément d'une valeur initiale c_0 à une valeur $c_0 + \Delta c$, point qui sera abordé dans les discussions sur l'origine de cette augmentation d'osmolarité (paragraphe 5.4.1). De plus, la durée d'un cycle Δt est faible devant la durée nécessaire à la perméabilisation totale de la vésicule. Nous ferons donc l'hypothèse d'une perméabilité constante sur un cycle. Enfin, on peut voir dans la dernière équation présentée que le terme en c_0 est négligeable devant le terme en Δc . Ces hypothèses prises en compte, il vient que :

$$\frac{R(t)}{R_0} = \left(1 + 4 \frac{P_f V_w}{R_0} \cdot \Delta c \cdot \Delta t \right)^{1/4} \quad (5.5)$$

Ajoutons à ceci que le rayon augmente au maximum de 3% durant un cycle. Dans la limite de faibles variations, l'équation devient alors linéaire, en accord avec les observations expérimentales :

$$\frac{\Delta R}{R_0} = \frac{P_f V_w}{R_0} \cdot \Delta c \cdot \Delta t \quad (5.6)$$

De cette équation et de nos données expérimentales, on obtient $\Delta c_{exp} \approx 5.10^{-4} - 5.10^{-3} \text{ mol/L}$.

La phase de gonflement s'arrête brutalement avec l'ouverture d'un pore microscopique. A partir d'une loi de Laplace donnant $\Delta\pi$, la pression osmotique, en fonction de Δc : $\Delta\pi = N_A k_b \Delta c$ (N_A est le nombre d'Avogadro et k_b la constante de Boltzmann), on peut estimer la tension de membrane σ au moment de l'ouverture d'un pore :

$$\sigma = \frac{\Delta\pi \cdot R(t)}{2} \quad (5.7)$$

Que ce soit pour les PC-GUVs ou les CL-GUVs, on obtient une tension de membrane critique de l'ordre de $\sigma = 1 - 5 \text{ mN/m}$, valeurs en accord avec la tension de lyse reportée dans la littérature pour ces types de membranes [Heuvingh et Bonneau, 2009 ; Jalmar et al., 2013].

D'autre part, le module élastique d'extension K_a des membranes oxydées peut être calculé à partir de l'accroissement d'aire dû aux flux osmotiques, $\Delta A = 8\pi R^2 \cdot [\Delta R/R_0]$:

$$\sigma = K_a \frac{\Delta A}{A_0} \approx 2K_a \frac{\Delta R}{R_0} \quad (5.8)$$

Les valeurs de K_a et σ , estimées en utilisant ces deux dernières équations pour les PC-GUVs et CL-GUVs en cours d'oxydation, sont résumées dans le tableau suivant.

	K_a (mN/m)	σ (mN/m)
18:2 PC	~250 (~130)	~5 (~1)
18:2 PC / Cardiolipide	~80 (~20)	~4 (~1)

Tableau 4 : Estimation des valeurs des modules d'extension et de la tension critique d'ouverture de pores pour des vésicules de 18:2 PC et de 18:2 PC et Cardiolipide (85:15 mol%)

On peut également suivre l'évolution de ces valeurs au cours de l'oxydation d'une même vésicule. Une évolution typique pour les PC-GUVs et les CL-GUVs est donnée dans la figure 55 suivante :

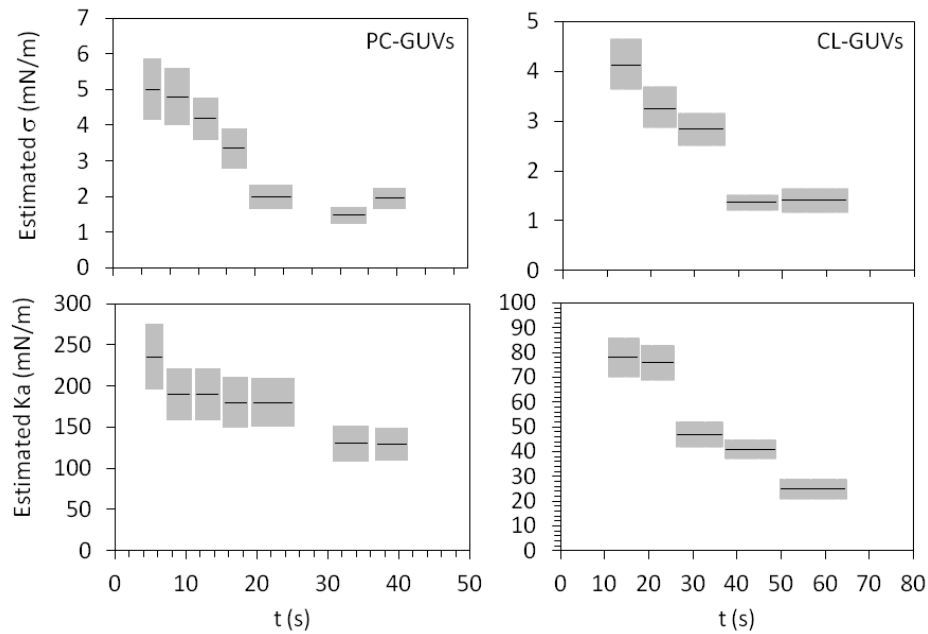


Figure 55 : Evolution des paramètres physiques de la membrane sous oxydation. Estimations de la tension d'ouverture de pore σ et du module élastique K_a en fonction du temps d'une vésicule de 18:2 PC (à gauche) et de 18:2 PC et cardiolipide (à droite) subissant un stress oxydant.

De ces résultats, deux conclusions importantes peuvent être tirées. D'abord, on peut observer que la présence de cardiolipide dans la membrane la rend plus élastique. Ensuite, sur une vésicule subissant de l'oxydation, les valeurs de σ et de K_a décroissent avec le temps : la membrane devient plus fragile et plus étirable.

5.3 Oxydation de membranes composées de PC, PE et Cardiolipide

Définies comme un modèle minimal de membrane interne de mitochondries, nous étudierons ici des vésicules constituées de 50 mol% de 18:2 PC, de 35 mol% de 18:2 PE et de 15 mol% de cardiolipide (IM-GUVs).

Traitées et analysées selon les mêmes procédés que les PC-GUVs et les CL-GUVs, nous verrons que ces vésicules ont un comportement singulièrement différent. Des pores, de longue durée de vie, autorisent la diffusion des sucres, participant ainsi significativement à la perméabilisation de la vésicule.

5.3.1 Effets du PE

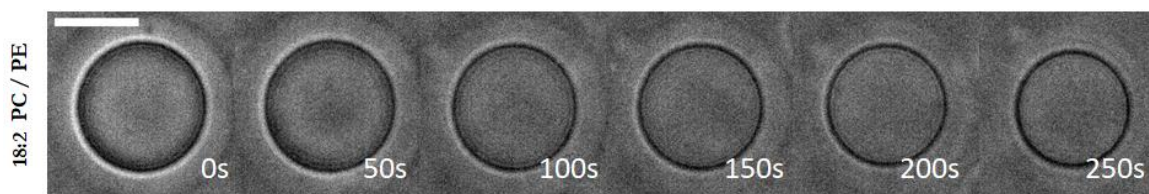


Figure 56 : Oxydation photo-induite d'une PE-GUV. Barre d'échelle : 10 μm

Nous avons étudié l'effet du cardiolipide dans une matrice lipidique de 18:2 PC. Afin de comprendre son effet dans une matrice de 18:2 PC et 18:2 PE, il nous faut d'abord étudier le comportement d'une telle membrane et ses différences vis-à-vis d'une membrane de 18:2 PC. En étudiant ces PE-GUVs, composées de 51 mol% de 18:2 PC et de 49 mol% de 18:2 PE, on observe un comportement similaire à celui des PC-GUVs (fig. 56), à ceci près que la forte proportion de PE augmente grandement la résistance de la membrane à l'oxydation : le temps de début de perméabilisation est 3,5 fois plus grand : $t_0 = 35,34 \pm 3,37 \text{ s}$ et la perméabilité photo-induite, calculée à partir du temps caractéristique de la décroissance exponentielle du contraste, est 2,2 fois plus faible : $P = (0,47 \pm 0,04) \times 10^{-7} \text{ m/s}$.

Le PE, du fait de son paramètre d'empilement plus bas (en cône inversé), augmente l'ordre au sein de la membrane. Cette augmentation a été quantifiée par une expérience de spectrofluorométrie avec du Laurdan (suivant la méthodologie de [Khalifat et al., 2011], voir paragraphe 3.1.4). Le GP, pour Generalized Polarization, caractérise l'ordre dans une membrane. Il varie entre -1 (très désordonné) et +1 (parfaitement ordonné). Le GP, mesuré dans nos conditions d'expériences (tampon HEPES à pH 7,8 notamment), de membranes constituées de 18:2 PC vaut $-0,18 \pm 0,040$ et le GP de membranes constituées de 18:2 PC et 18:2 PE vaut $-0,048 \pm 0,0074$. Cette augmentation d'ordre stabilise la membrane, accroissant ainsi sa résistance à l'oxydation. Le temps de début de perméabilisation, la perméabilité photo-induite ainsi que le délai moyen entre deux ouvertures de pores vont dans ce sens.

5.3.2 Comportement d'une IM-GUV oxydée

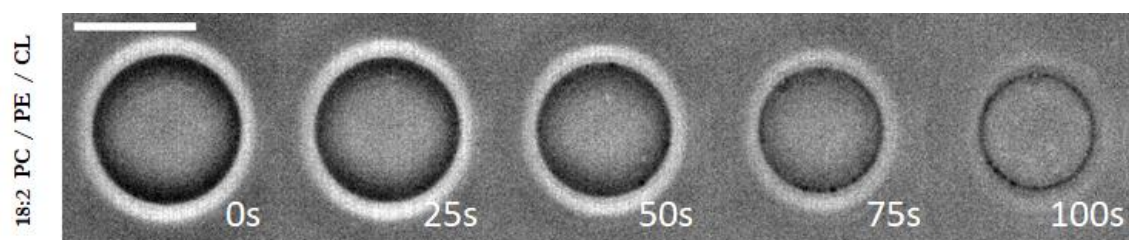


Figure 57 : Photo-oxydation d'une IM-GUV. Barre d'échelle : 10 μm

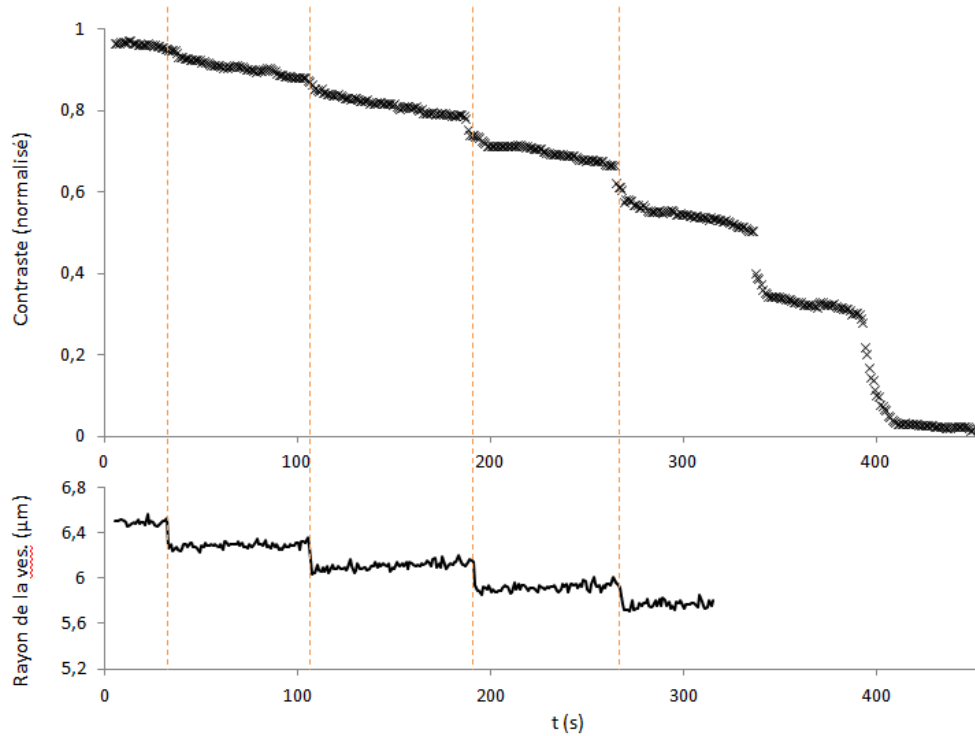


Figure 58 : Perméabilisation d'une IM-GUV. (en haut) Décroissance du contraste en fonction du temps. On observe une "cascade" d'exponentielle dont les chutes sont de plus en plus marquées. D'autre part, ces chutes sont corrélées avec les chutes du rayon de la vésicule (en bas), précédemment associées à l'ouverture de pores dans la membrane.

Pour une IM-GUV, membrane composée de 18:2 PC, de 18:2 PE et de cardiolipide dans des proportions proches de celles de la membrane interne mitochondriale, le comportement est différent. On peut voir sur la figure de décroissance du contraste (fig. 58) que cette dernière ne suit plus une exponentielle, mais une "cascade" d'exponentielles.

Un ajustement de cette courbe montre qu'elle suit l'addition d'une exponentielle de temps caractéristique très long ($\tau > 100s$) à de multiples exponentielles de temps caractéristiques courts ($\tau < 2s$). D'autre part, un tracé du rayon de la vésicule observée en fonction du temps indique que les "cascades" démarrent au moment des chutes brutales de rayons, c'est-à-dire, au moment des ouvertures de pores (fig. 58).

Ces deux observations indiquent que la perméabilisation a ici 2 causes distinctes. Une part de la perméabilisation est analogue aux mélanges précédemment étudiés, et vient de défauts de membrane, causés par les changements chimiques subis par les lipides. Cette part donne l'exponentielle "enveloppe", de temps caractéristique long. L'autre part de la perméabilisation est due à une diffusion des sucres à travers les pores ouverts, diffusion reflétée par les cascades du contraste. Sur des prises de vue rapides, on a d'ailleurs pu constater une plus grande durée de vie des pores ouverts dans les IM-GUVs ($\sim 0,05$ s) que dans les autres membranes ($< 0,01$ s). Cette différence de durée de vie peut expliquer pourquoi la diffusion des sucres est significative dans le cas des IM-GUVs et pas dans celui des autres membranes.

Ainsi, les IM-GUVs restent essentiellement imperméables sous stress oxydant : leur temps caractéristique de perméabilisation est environ de 10 fois supérieur à celui des PC-GUVs. Le comportement de ces membranes, à l'inverse de celui des autres membranes étudiées ici, peut être décrit comme une perméabilisation à seuil : lorsque le niveau d'oxydation est trop élevé, la membrane est rompue.

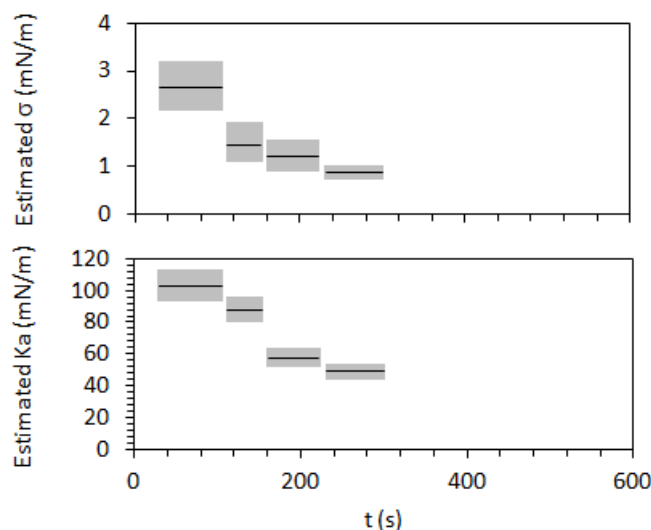


Figure 59 : Evolution des paramètres physiques de la membrane sous oxydation. Estimations de la tension d'ouverture de pore σ et du module élastique K_a en fonction du temps d'une vésicule de 18:2 PC / 18:2 PE / Cardiolipide (50:35:15 %mol) subissant un stress oxydant.

A l'instar des PC-GUVs et CL-GUVs, on peut calculer les variations de la tension de membrane σ et du module d'extension K_a pour les IM-GUVs. Comme pour les PC- et CL-GUVs, on observe une diminution de K_a et de σ pour les IM-GUVs (fig. 59).

Cependant, les calculs de σ et K_a sont ici plus discutables. En effet, deux des hypothèses nécessaires sont remises en cause. La durée de vie des pores étant plus de deux fois plus grande dans le cas des IM-GUVs, l'hypothèse d'instantanéité du changement d'osmolarité à l'intérieur de la GUV peut être invalidée. D'autre part, la décroissance du contraste indique que l'ouverture des pores a une influence importante (et de plus en plus marquée avec le temps d'oxydation) sur la perméabilité. Il devient alors impossible de considérer cette grandeur constante lors d'un cycle. Les valeurs obtenues de σ et K_a par ce calcul ne sont donc pas pertinentes. En revanche, l'évolution de ces grandeurs au cours du temps, dans le sens d'un amollissement de la membrane reste cohérente avec les observations.

5.4 Discussions

5.4.1 Origine de l'augmentation de la pression osmotique responsable des cycles de gonflement

Le gonflement des IM-GUVs subissant l'oxydation peut être attribué à une augmentation de la différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane. Cette augmentation vient nécessairement du changement de concentration d'espèces au sein même de la vésicule, le volume externe pouvant être considéré comme infini (volume d'une vésicule de rayon $10\ \mu\text{m}$ $V_{GUV} = 4 \cdot 10^{-6}\ \mu\text{L}$; volume de la lamelle d'observation $V_{lamelle} = 100\ \mu\text{L}$).

Il y a ainsi deux causes possibles à l'origine de l'accroissement de cette pression : l'apparition de nouvelles espèces, qui seraient des produits d'oxydation des lipides, ou bien une différence de vitesse de diffusion entre saccharose et glucose à travers la membrane.

Si chaque lipide de la vésicule était oxydé de manière à produire une espèce fragmentée, c'est-à-dire une chaîne de 9 carbones liée à un groupement polaire, la concentration obtenue dans le milieu intérieur serait de l'ordre de 1 mM pour une vésicule de $10\ \mu\text{m}$ de rayon, c'est-à-dire l'ordre du Δc estimée précédemment. Cependant, 3 arguments montrent que cette valeur est surestimée par ce calcul. En premier lieu, il existe d'autres produits d'oxydation, non fragmentés. Ensuite, les chaînes fragmentées sont peu solubles dans l'eau, elles auront ainsi tendance à rester dans la partie hydrophobe de la bicouche. Enfin, la Ce6 étant présente uniquement dans le feuillet externe de la membrane; c'est là, très majoritairement, que sont formés ces produits. Le feuillet interne limite alors leur diffusion vers le milieu intérieur de la vésicule. Ainsi l'augmentation de pression osmotique ne peut pas être entièrement attribuée à la formation des produits d'oxydation.

La pression osmotique pourrait également être due au fait que le glucose, plus petit, diffuse plus rapidement à travers la membrane que le saccharose. Dans l'eau, son coefficient de diffusion est d'ailleurs 1,3 fois plus élevé. De façon transitoire, l'osmolarité à l'intérieur de la vésicule est donc plus grande qu'à l'extérieur. Cependant, la différence de concentration générée est difficile à estimer. En effet, la diffusibilité de ces sucres à travers la membrane est fortement liée à l'état d'oxydation de cette dernière.

5.4.2 Défauts membranaires et perméabilisation

L'origine de la perméabilisation des membranes non due aux pores peut être attribuée à des défauts d'organisation des lipides dans la membrane. Des simulations ont montré, sur des lipides 16:0-18:1 PC et 18:0-22:6 PC, des défauts d'une surface entre 10 et 35 Å, plus ou moins profonds dans la membrane. Un défaut membranaire est ici une région où

le premier atome de lipide rencontré en s'enfonçant orthogonalement dans la membrane est un carbone d'une chaîne lipidique [Pinot et al., 2014]. Ces défauts peuvent survenir à cause de repliements des chaînes, repliements que les insaturations favorisent. En outre, d'autres simulations ont montré que les chaînes aliphatiques des lipides fragmentés issus de l'oxydation, qui ont une certaine polarité, peuvent être plus exposées au milieu aqueux que les têtes polaires [Khandelia et Mouritsen, 2009]. La fluidité de ces défauts dans la membrane peut ainsi permettre le passage de molécules de sucres, tel le saccharose (dont la taille est de l'ordre du nanomètre) ou le glucose (de l'ordre de deux fois plus petit).

Conclusion du chapitre

L'analyse de vésicules de différentes compositions met en évidence que la présence de cardiolipide dans la membrane augmente la résistance de ces dernières à l'oxydation. En particulier, la perméabilisation induite par l'oxydation est retardée et la perméabilité photo-induite est plus faible pour les membranes contenant de cardiolipide (fig. 60).

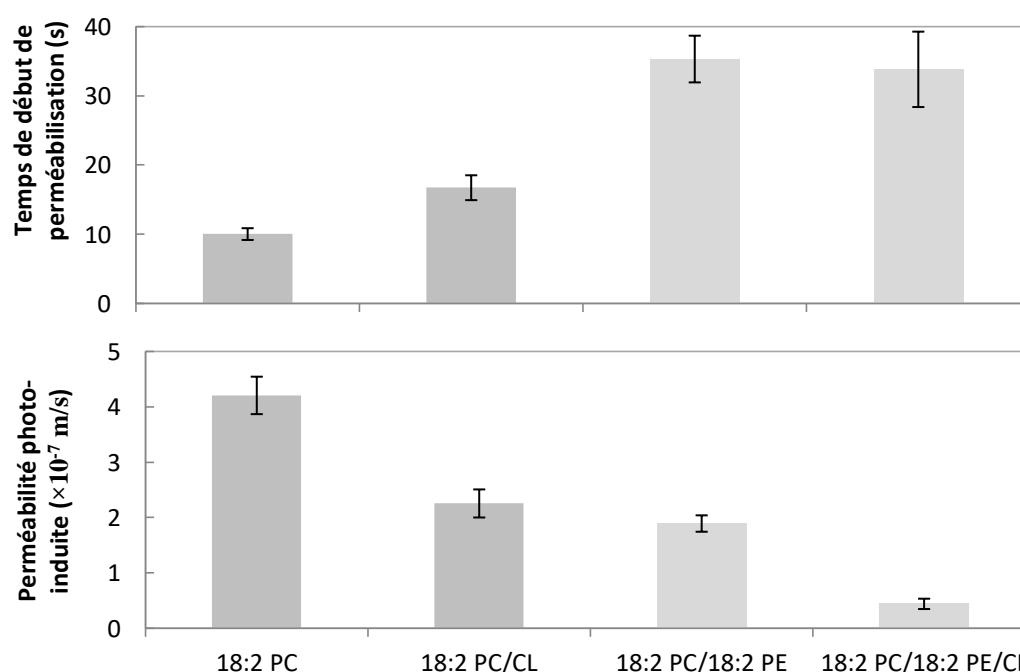


Figure 60 : Temps de début de perméabilisation moyens (en haut) et perméabilité photo-induite moyenne (en bas) pour les différentes compositions de GUVs étudiées.

Quelque soit le type de vésicule étudié, l'évolution de leur rayon durant une oxydation photo-induite illustre un cycle de gonflement puis de chute brutale du volume, associée à l'ouverture d'un pore transitoire dans la membrane. Cependant, l'ouverture de ces pores n'est pas corrélée à la baisse du contraste due à la perméabilisation, sauf pour les GUVs composée à la fois de PC, PE et cardiolipide, soit des GUVs proches de la composition

des membranes mitochondriales internes (IM-GUVs). Pour ces dernières, un effet significatif de ces pores sur la perméabilisation est mis en évidence, et expliqué par la durée de vie plus longue de ces pores. L'autre mécanisme de perméabilisation pourrait être dû à des défauts d'organisation dans la bicouche, générés par les changements physico-chimiques des lipides au cours de l'oxydation.

Chapitre 6

Influence des insaturations des chaînes carbonées dans la résistance des membranes au stress oxydant

Table des matières :

6.1 Transitions de forme et perméabilisation	103
6.1.1 Transitions de forme durant la phase A	103
6.1.2 Perméabilisation	104
6.1.3 Module élastique et tension de membrane	106
6.2 Chimie en temps réel de l'oxydation photo-induite	107
6.2.1 Pics principaux des spectres Raman des lipides	108
6.2.2 Evolution temporelle des spectres Raman	109
6.3 Discussions	111
6.3.1 Temps de début de perméabilisation	111
6.3.2 Nécessité de la délocalisation des électrons	112
Conclusion du chapitre	113

6 Influence des insaturations des chaînes carbonées dans la résistance des membranes au stress oxydant

Dans les membranes naturelles, les lipides diffèrent à la fois par leur tête polaire et par leurs chaînes aliphatiques. La grande majorité de ces chaînes est non-ramifiée, et varie essentiellement par le nombre de carbones, ainsi que par le nombre et la position des double-liaison entre carbones. La [figure 59](#) donne en exemple la composition moyenne en acides gras des lipides mitochondriaux de foie de rat. Ainsi, le phospholipide moyen de ces membranes est constitué d'une chaîne de 16,5 carbones et de 1,5 insaturations.

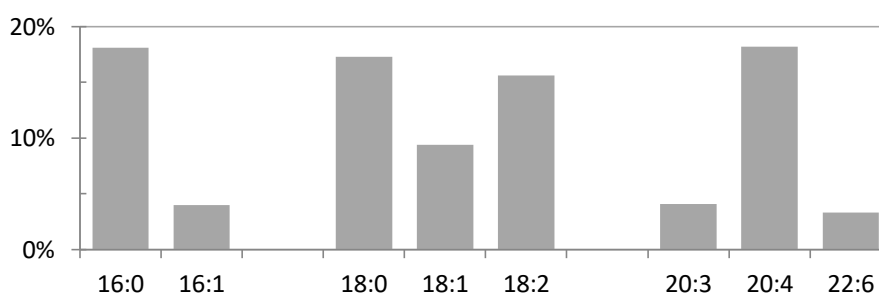


Figure 61 : Composition phospholipidique moyenne des membranes mitochondriales de foie de rat, mesurée par HPLC. Histogramme tracé à partir des données de Ruggiero et al., 1984.

Le nombre et la position des insaturations des lipides d'une membrane influent sur les propriétés physiques de cette dernière. Notamment, la tension de lyse, le module d'extension et le module de courbure diminuent avec le nombre d'insaturations [[Olbrich et al., 2000](#) ; [Rawicz et al., 2000](#)].

Ces insaturations étant les cibles privilégiées de l'oxydation, nous nous proposons ici de comprendre l'influence de leur densité et de leur profondeur dans la bicouche vis-à-vis d'un stress oxydant photo-induit. Pour cela, nous comparerons des membranes constituées de lipides de tête polaires identiques, PC. D'une part, il s'agit du lipide le plus abondant dans les membranes naturelles, et d'autre part, les formes de PC comportant 2 chaînes aliphatiques ayant chacune entre 0 et 2 insaturations ont un paramètre d'empilement qui les rend aptes à former des bicouches. En revanche, l'expérience montre qu'il est impossible de former en grande quantité des GUVs de 18:3 PC. Nous utiliserons donc ce lipide avec du 18:1 PC, en proportion 1:1.

De même qu'au chapitre précédent, c'est l'irradiation à 405 nm de la Ce6, présente dans les membranes en proportion d'une molécule de Ce6 pour 100 lipides, qui déclenchera un stress oxydant contrôlé. Les vésicules subiront ainsi des transitions de forme et une perméabilisation, selon le scénario décrit au chapitre 5.

Il sera intéressant de comparer le comportement vis-à-vis de l'oxydation photo-induite de membranes constituées de 18 :1 PC à celui de membranes de 18 :2 PC. Puisqu'elles comportent deux fois plus de double liaisons et donc de cibles pour l'oxygène singulet, on peut s'attendre à une perméabilisation plus rapide pour les vésicules de 18 :2 PC. Ces dernières ont le même nombre moyen d'insaturations que des vésicules de 18 :1 PC - 18 :3 PC (50/50), avec lesquelles nous les comparerons ensuite.

Pour comprendre l'influence de la position et de la conformation des insaturations, nous comparerons des vésicules de 18 :1 PC (insaturation en position 9, conformation *cis*) avec, respectivement, des vésicules de 18 :1 $\Delta 6$ PC (insaturation en position 6, c'est-à-dire plus proche de la tête polaire, conformation *cis*), et des vésicules de 18 :1 *trans* PC (insaturation en 9, conformation *trans*).

L'analyse de LUVs de mêmes compositions à l'aide d'un montage de spectrométrie Raman donnera accès à la chimie de l'oxydation, que nous pourrons ainsi relier aux changements physiques subies par les GUVs.

6.1 Transitions de forme et perméabilisation

6.1.1 Transitions de forme durant la phase A

Les vésicules étudiées exposent une phase de fluctuations, d'amplitude et de durée variables, ainsi que des bourgeonnements internes et externes, lorsqu'elles sont photo-oxydées (fig. 62). S'ensuit une phase de perméabilisation, mise en évidence par la décroissance du contraste entre l'intérieur de la vésicule et son extérieur.

Le temps t_0 de début de perméabilisation, qui quantifie la durée de la phase A, varie selon la nature des lipides constituant la vésicule, et donc selon le nombre et la position des insaturations des chaînes aliphatiques. t_0 est ici du même ordre pour les GUVs constituées de 18:1 PC ou de 18:2 PC (respectivement $9,4 \pm 0,9$ s et $10,0 \pm 0,9$ s). Le temps de début de perméabilisation est en revanche bien plus faible ($2,61 \pm 0,69$ s) pour des vésicules constituées pour moitié de 18:1 PC et de 18:3 PC.

Les GUVs de 18 :1 $\Delta 6$ PC, dont la double liaison est plus proche de la tête du lipide que les 18:1 PC (double liaison en position 9), ont un t_0 plus grand ($28,42 \pm 0,70$ s). Leur fluctuations photo-induites sont bien plus amples et durent plus longtemps (plus de 20s) que pour les autres vésicules.

Les GUVs de 18:1 *trans* PC ont quant à elles un comportement plus singulier puisqu'elles ne présentent ni transitions de forme, ni perte de contraste.

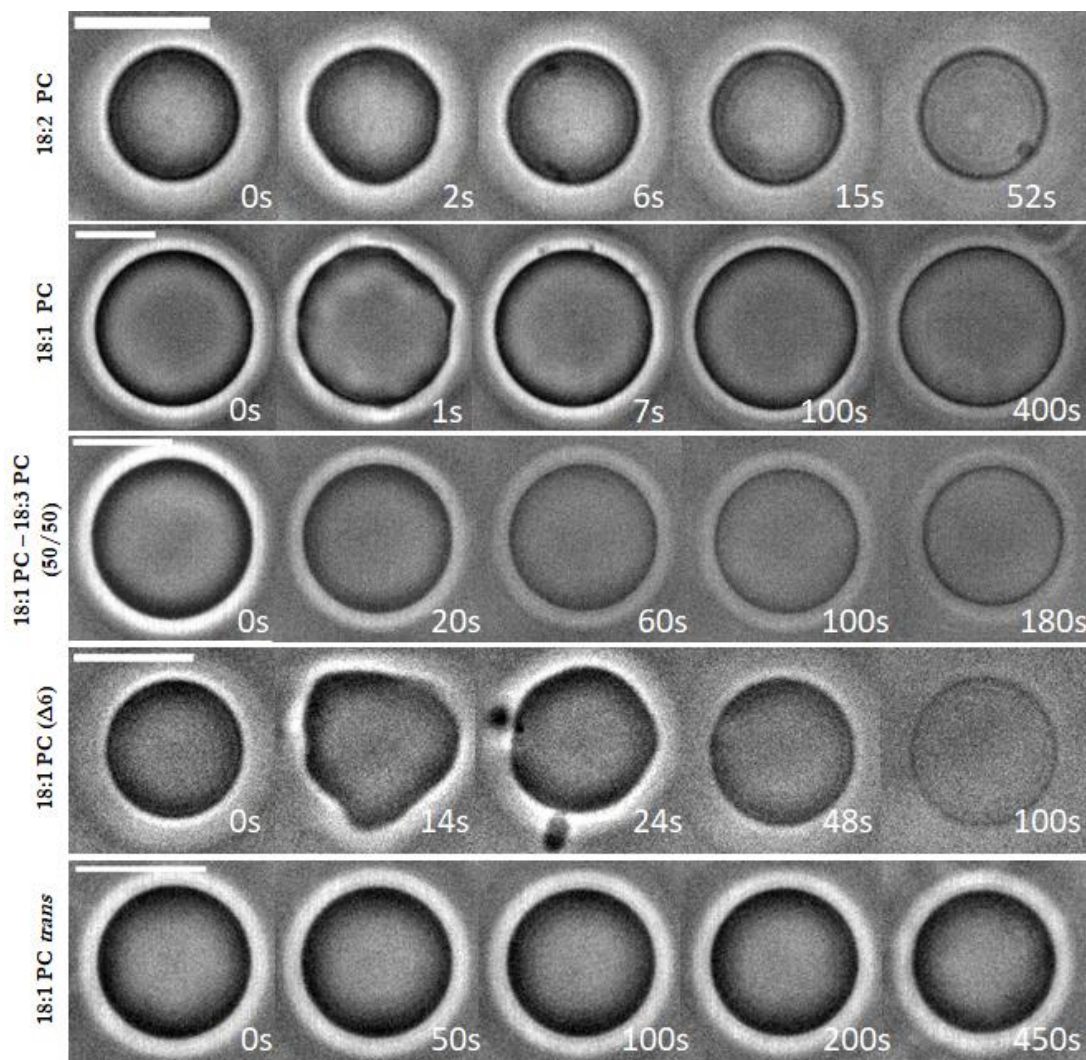


Figure 62 : Séquences illustrant les changements de forme typiques sur des vésicules photo-oxydées. Les vésicules constituées de 18:1 *trans* PC ne montrent aucun changement. Les autres montrent une décroissance du contraste, ainsi qu'une phase de fluctuations importantes peu de temps après le début de l'irradiation. Barre d'échelle : 10 μm .

6.1.2 Perméabilisation – Phase B

La décroissance du contraste générée par la perméabilisation de la vésicule nous permet, comme précédemment, de quantifier cette dernière. La perméabilité photo-induite P suit un schéma assez simple : elle est d'autant plus élevée que le nombre d'insaturation (et donc de cibles pour l'oxygène singulet) est élevé. Comme attendu, la perméabilité photo-induite des GUVs de 18:2 PC est identique à celle des GUVs de 18:1/18:3 PC.

De plus, P est bien plus grande pour le 18:1 $\Delta 6$ PC que pour son homologue $\Delta 9$. En effet, l'espèce qui résulte du clivage du 18:1 $\Delta 6$ PC est plus conique (paramètre d'empilement plus faible), cela pourrait expliquer qu'elle soit d'autant plus efficace à perméabiliser la membrane.

Influence des insaturations des chaînes carbonées dans la résistance des membranes au stress oxydant

	18:1 PC $\Delta 9$	18:1 PC $\Delta 6$	18:2 PC	18:1 PC / 18:3 PC	18 :1 <i>trans</i> PC
t_0 (s)	$9,43 \pm 0,85$	$28,42 \pm 0,7$	$10,05 \pm 0,85$	$2,61 \pm 0,69$	∞
P (10^{-7} m/s)	$0,33 \pm 0,02$	$2,52 \pm 0,31$	$1,05 \pm 0,09$	$1,13 \pm 0,19$	0

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des temps de début de perméabilisation et des valeurs de perméabilité photo-induite mesurés durant les expériences de photo-oxydation de vésicules lipidiques de différentes compositions. Le photo-sensibilisateur utilisé est la chlorine e6 au ratio de une molécule pour 100 lipides. Le pH est tamponné à 7,8.

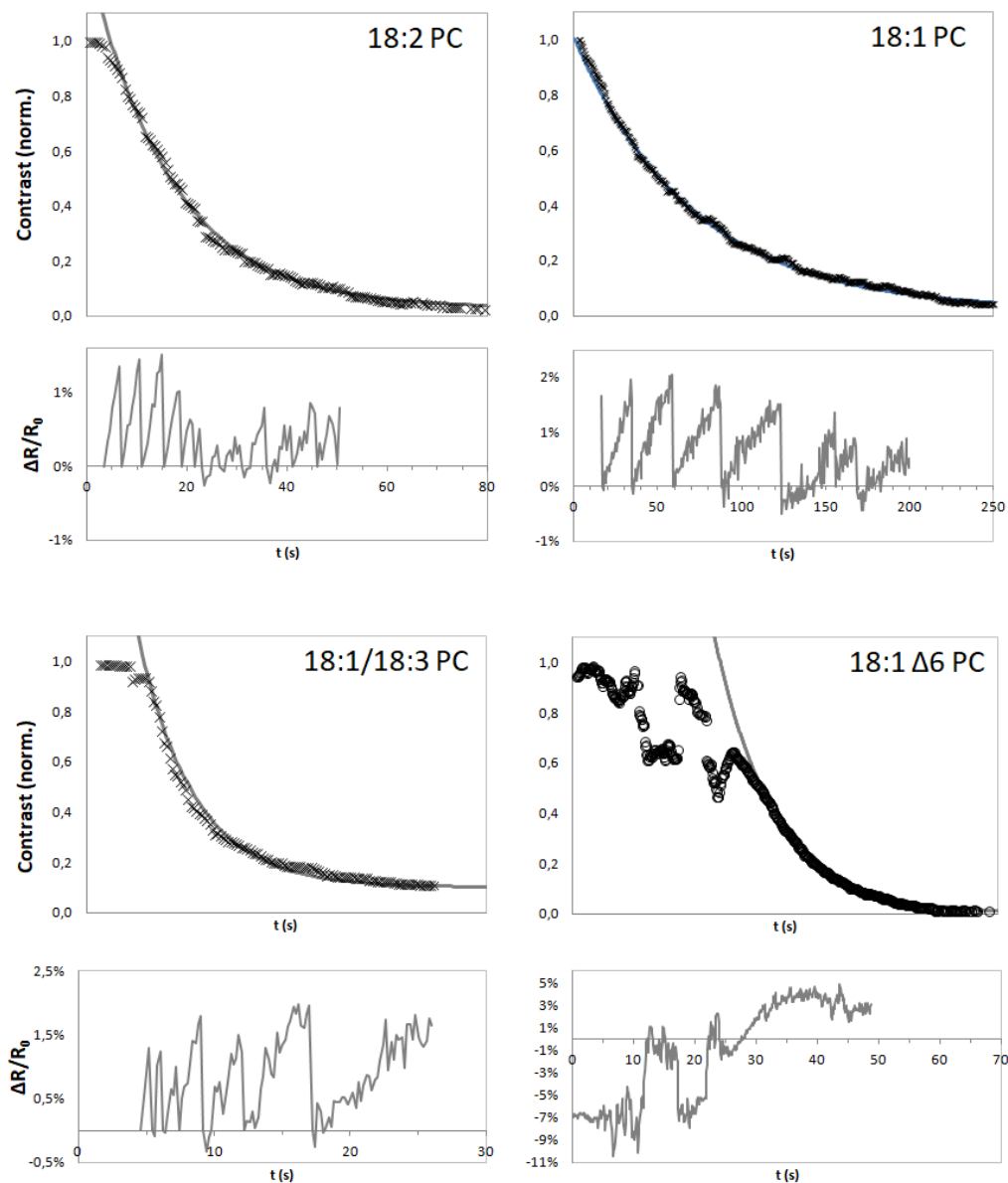


Figure 63 : Perméabilisation des vésicules de différentes compositions (18:2 PC, 18:1 PC, 18:1/18:3 PC et 18:1 PC $\Delta 6$) subissant une oxydation. (En haut) Evolution typique du contraste entre intérieur (saccharose initialement) et extérieur (glucose) de la vésicule. L'exponentielle ajustée aux points expérimentaux permet d'extraire le temps de début de perméabilisation t_0 ainsi que la perméabilité photo-induite P . (En bas) Evolution relative du rayon des vésicules.

Sauf pour les GUV de 18:1 PC $\Delta 6$, on observe des cycles de gonflement-éclatement pour toutes les compositions lipidiques (fig. 63). En revanche, l'ouverture des pores ne participe pas ici significativement à la diffusion des sucres, et donc à la décroissance du contraste. On retrouve l'accroissement du délai entre deux pores successifs, déjà présent pour les mélanges lipidiques contenant du cardiolipide, avec l'observation nouvelle que l'augmentation du nombre d'insaturation par chaîne aliphatique amène à des Δt plus petits (fig. 64).

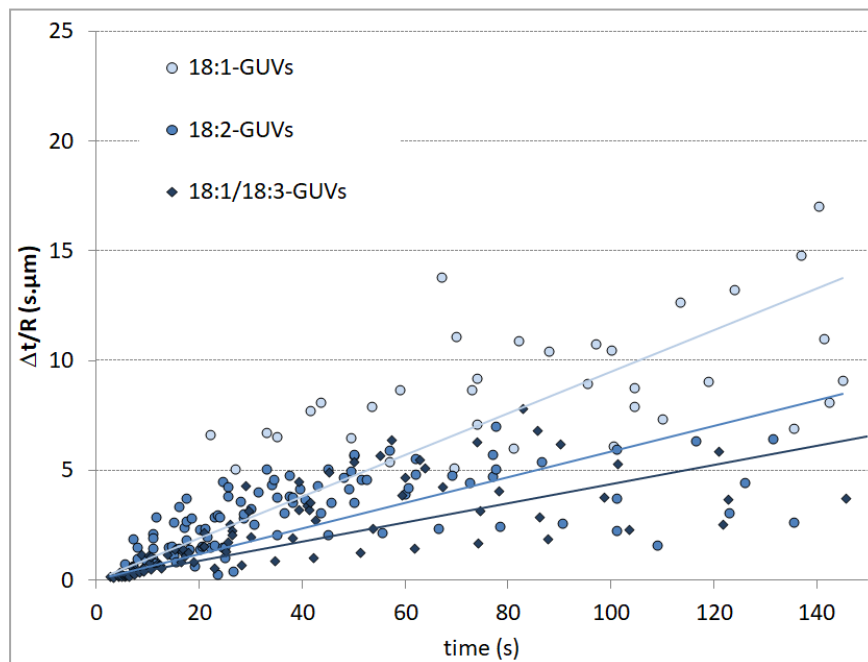


Figure 64 : Ouverture de pores pendant l'oxydation des vésicules lipidiques. Le délai entre deux pores, normalisé par le rayon de la vésicule, est ici tracé en fonction du temps d'irradiation. Les points bleu clair correspondent aux vésicules de 18:1 PC, les bleu foncé aux vésicules de 18:2 PC et les carrés à celles de 18:1 PC et 18:3 PC (50/50 mol%).

6.1.3 Module élastique et tension de membrane

En appliquant les mêmes calculs, conditionnés par les mêmes hypothèses qu'au chapitre 5, on peut estimer, grâce au suivi du rayon au cours des cycles de gonflement-éclatement suivis par les vésicules, la tension de membrane ainsi que le module élastique au cours du temps d'oxydation.

Influence des insaturations des chaînes carbonées dans la résistance des membranes au stress oxydant

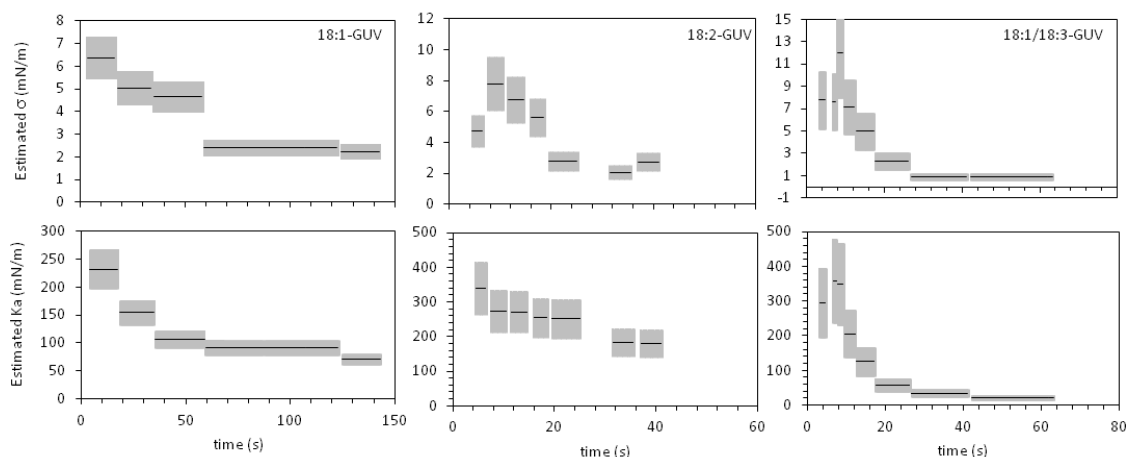


Figure 65 : Evolution des paramètres physiques de la membrane sous oxydation. Estimations de la tension d'ouverture de pore σ et du module élastique K_a en fonction du temps d'une vésicule de 18:2 PC (à gauche), de 18:1 PC (au milieu) et de 18:1 PC-18:3 PC (50/50) (à droite), subissant un stress oxydant.

L'évolution de la tension de rupture σ et du module élastique K_a montre que la membrane devient plus fragile et plus étirable (fig. 65). On peut noter que ces grandeurs sont divisées par 2 ou 3 par l'oxydation des membranes de 18:1 PC ou de 18:2 PC. En revanche, elles sont divisées par 10 pour des membranes de 18:1/18:3 PC.

6.2 Chimie en temps réel de l'oxydation photo-induite

La chimie de l'oxydation des lipides, ainsi que les changements morphologiques subis par des vésicules géantes en cours d'oxydation sont bien étudiés. En revanche, les liens entre ces deux aspects, malgré un modèle cinétique proposé récemment [Sankhagowit et al., 2014], n'ont pas été l'objet d'observations directes.

Cependant, le montage Raman – pinces optiques décrit au chapitre 3 est un outil puissant dans la caractérisation des liaisons chimiques, et qui, grâce à un temps d'acquisition court, permet la visualisation en temps réel de la chimie des lipides. Ce montage associé aux observations en microscopie à contraste de phase de vésicules géantes photo-oxydées permet de corréliser transitions morphologiques et transformations chimiques.

6.2.1 Pics principaux des spectres Raman des lipides

La plupart des bandes Raman obtenues correspondent aux vibrations des liaisons entre les carbones des chaînes aliphatiques des lipides.

Le pic à 1660 cm^{-1} est simple à identifier. On observe, sur la figure 66, que ce pic est absent pour des membranes de 14:0 PC, mais présent pour le 18:1 PC et d'intensité double pour le 18:2 PC. Ce pic est donc lié au nombre de double liaison C=C, il correspond en fait aux vibrations élongationnelles de ces liaisons $\nu(\text{C}=\text{C})$.

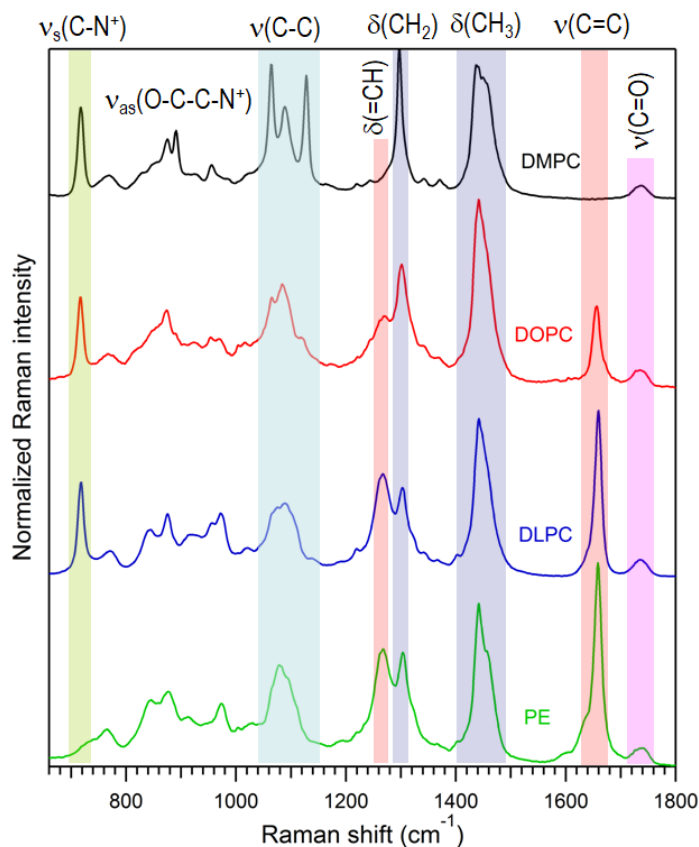


Figure 66 : Spectres des vésicules de différentes compositions lipidiques, en absence de photo-sensibilisateur. Les pics d'intérêt sont identifiés. Du haut vers le bas, les spectres correspondent à des vésicules pures de 14:0 PC, 18:1 PC, 18:2 PC et 18:2 PE. Le pic à 1660 cm^{-1} est particulièrement remarquable car correspondant aux vibrations élongationnelles des double-liaisons C=C. Il est ainsi absent du 14:0 PC, et double sur le 18:2 PC comparé au 18:1 PC.

On remarque également un pic à 720 cm^{-1} , présent pour les espèces PC mais absent des PE. En effet, ce pic est caractéristique de l'élongation des liaisons entre carbone et azote $\nu(\text{C-N}^+)$ bien plus nombreuses sur les têtes polaires des PC que sur celles des PE. Notons d'ailleurs que puisque les têtes ne sont pas altérées dans nos expériences d'oxydation, ce pic sera utilisé pour normaliser les spectres entre chaque type de lipide analysé.

D'après Muik et al., 2005, les pics importants (fig. 66) correspondent à :

- 860 cm^{-1} – élongation du groupe O-C-C-N⁺
- 970 cm^{-1} – élongation du groupe HC=CH

- 1265 cm^{-1} – torsion d'un groupe CH, dont le C a également une double liaison $\delta(\text{C-H})$
- 1302 cm^{-1} – torsion des CH_2 , $\delta(\text{CH}_2)$
- 1442 cm^{-1} – mode de cisaillement des CH_2
- 1660 cm^{-1} - élongation des liaisons C=C
- 1747 cm^{-1} – élongation des liaisons esters $\nu(\text{C=O})$

6.2.2 Evolution temporelle des spectres Raman

Pour le 18 :1 PC, le processus d'oxydation débute avec l'isomérisation *cis-trans* des doubles liaisons C=C des chaînes aliphatiques. Ce changement conformationnel a une signature Raman visible : le pic correspondant à la vibration élongationnelle de la double liaison C=C passe de 1660 cm^{-1} pour l'isomère *cis*, à 1670 cm^{-1} pour l'isomère *trans* (fig. 67). Cette isomérisation est également visible sur les vésicules de 18 :1 PC $\Delta 6$.

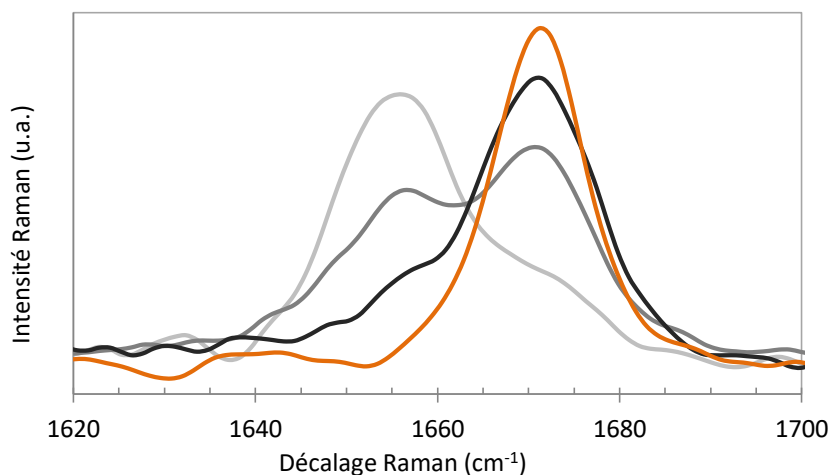


Figure 67 : Spectre Raman de vésicules de 18:1 PC (en configuration *cis*) subissant un stress oxydant photo-induit par la chlorine e6 (1:1000 Ce6:lipides). Les 3 spectres gris à noir, du plus clair au plus foncé, correspondent à 0s, 117s et 252s de durée d'irradiation. Le spectre orange est celui de vésicules de 18:1 PC en configuration *trans*. La correspondance des pics entre les spectres du 18:1 PC *cis* oxydé et du 18:1 PC *trans* indique qu'une isomérisation *cis-trans* est une étape de l'oxydation du 18:1 PC.

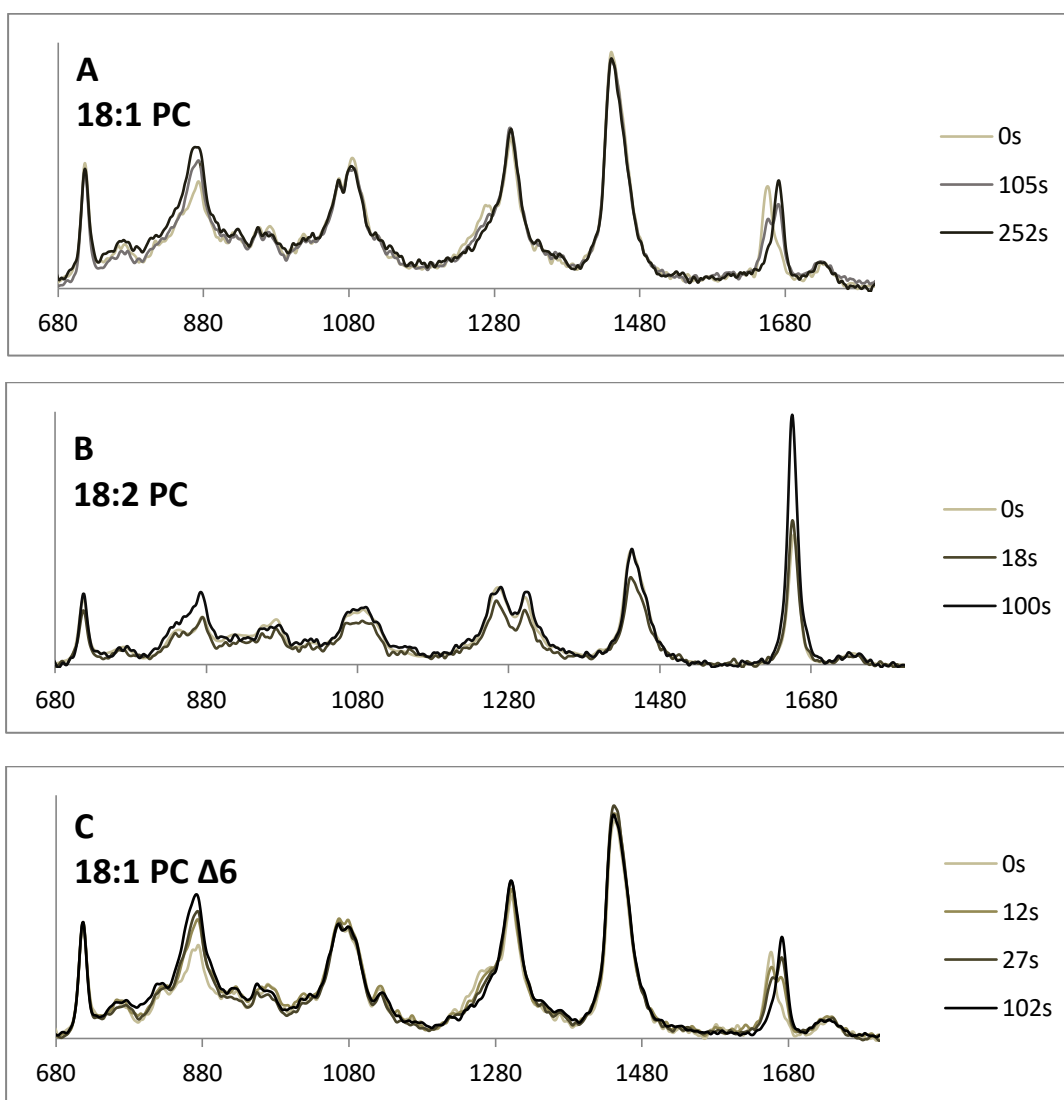
Dans le cas du 18 :2 PC (fig. 68A), la conjugaison des 2 doubles liaisons (en position 9 et 12), aboutit à une forte augmentation du pic $\nu(\text{C=C})$, ainsi qu'à un léger décalage de 1660 cm^{-1} vers 1655 cm^{-1} . Les autres pics liés aux doubles liaisons (à 1265 cm^{-1} et à 970 cm^{-1}) ont également des formes légèrement altérées.

L'hydroperoxydation des carbones insaturés amènent à la formation de composés de durées de vie très courtes, visibles sur tous les spectres, à l'exception du 18 :1 PC *trans* (fig. 68E). Ils correspondent à l'augmentation d'intensité des pics autour de 865 cm^{-1} .

Les spectres Raman de chaque mélange après un temps d'irradiation long montrent une diminution de la bande $\nu(\text{C}=\text{C})$. Elle peut être attribuée à la seconde attaque radicalaire sur un lipide, qui aboutit au clivage d'une queue carbonée du lipide.

L'intensité moyenne des spectres diminue fortement après quelques dizaines de seconde d'irradiation. Cette baisse reflète une perte de matière dans le piège optique. En effet, le piège génère une tension supplémentaire sur les vésicules qui, fragilisées par l'oxydation, se rompent et ne sont donc plus retenues dans le piège.

Notre composition-contrôle, le 14 :0 PC, ne montre, comme attendu, aucun changement lors de l'irradiation (fig. 68D).



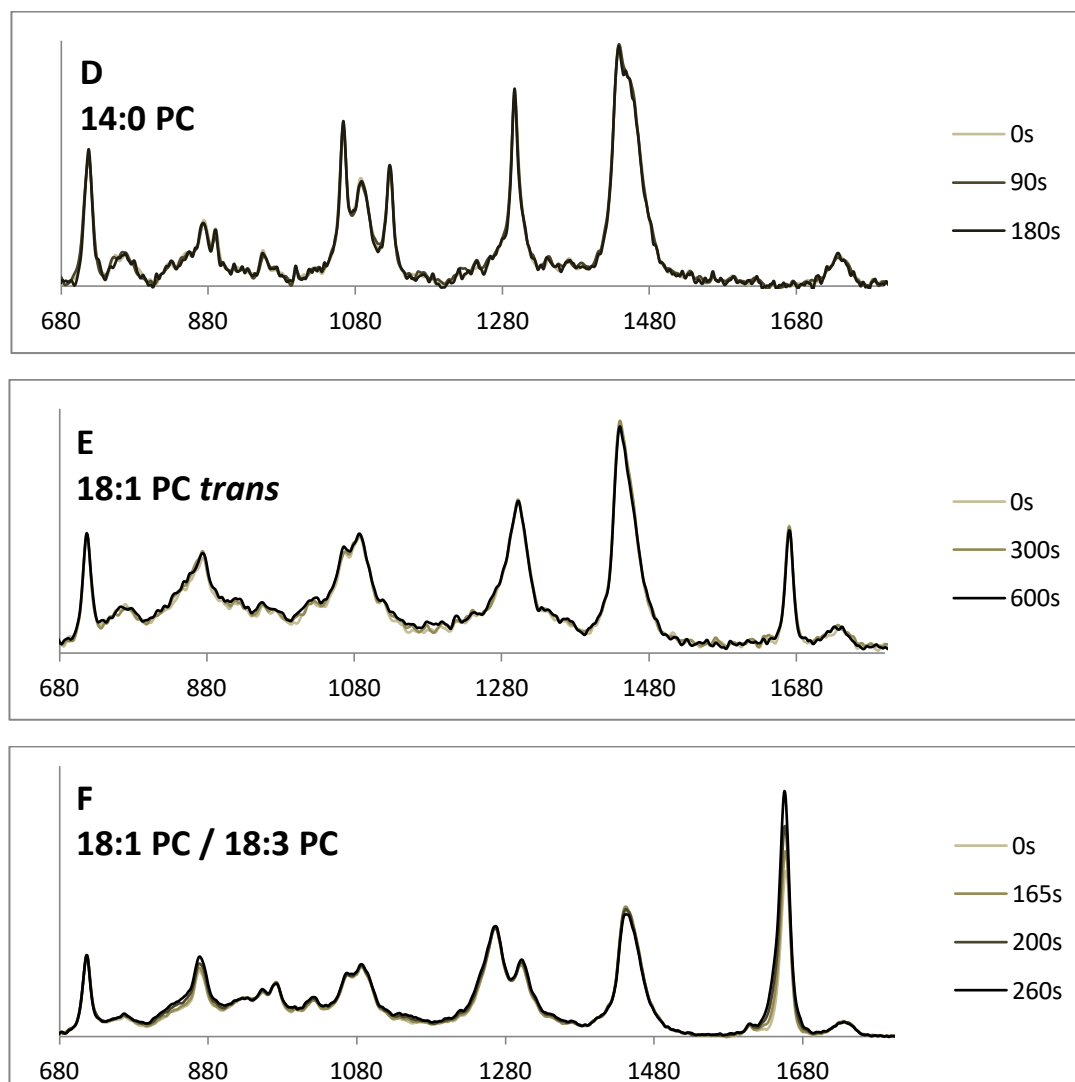


Figure 68 : Evolution des spectres Raman de vésicules de 18 :1 PC, 18:2 PC, 18 :1 PC Δ 6, 18 :1 PC trans, 18 :2 PC, 14 :0 PC et 18 :1/18 :3 PC (50/50) durant une oxydation photo-induite.

6.3 Discussions

6.3.1 Temps de début de perméabilisation

Dans les expériences décrites ici, le temps de début de perméabilisation est le même pour des GUVs constituées de lipides à 1 ou à 2 insaturations par chaînes aliphatiques. Cependant, une autre série d'expériences, menées dans les mêmes conditions mais à puissance d'irradiation 16 fois plus faible ($12,5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$), donne $t_0 = 43,2 \pm 8,8\text{s}$ pour le 18:1 PC et $t_0 = 20,1 \pm 3,0\text{s}$ pour le 18:2 PC. Ainsi, doubler le nombre d'insaturations

par chaîne divisé par 2 le temps de début de perméabilisation. Cependant, à intensité de fluorescence plus forte, le traitement mathématique appliqué à l'évolution temporelle du contraste de la vésicule (en particulier l'utilisation de la moyenne glissante) et nécessaire à l'obtention de t_0 , diminue fortement notre précision dans les premières secondes de l'oxydation.

Ainsi, t_0 suit le classement suivant : $t_0(18:1) > t_0(18:2) > t_0(18:3)$. Cependant, il est difficile d'expliquer cet ordre uniquement par l'augmentation du nombre de cibles d'oxydation puisque ce nombre est en moyenne le même pour les 18:1 PC et les 18:3 PC. Deux explications peuvent être envisagées :

- En premier lieu, l'augmentation du nombre de double liaison va de paire avec la multiplicité des lieux de réaction : le 18:1 PC a une double liaison au niveau du carbone 9, le 18:2 PC en 9 et 12, et le 18:3 PC en 9, 12 et 15. La peroxydation, puis le clivage, sont ainsi possibles à chacune de ces positions, amenant à des produits différents et donc à un désordre accru dans la bicouche, susceptible de la déstabiliser plus rapidement.

- D'autre part, la polarité du groupement -OOH plutôt hydrophile contribue au fait que les chaînes hydroperoxydées ont tendance à externaliser ce groupement, ce qui est d'autant plus aisé que la chaîne est insaturée [Khandelia et al., 2009]. La probabilité de formation de ces défauts d'organisation est donc plus grande pour des membranes contenant du 18:3 PC et donc, le temps t_0 est plus faible. Par ailleurs, cet argument peut également expliquer l'augmentation de la perméabilité photo-induite avec le nombre d'insaturations des lipides.

6.3.2 Nécessité de la délocalisation des électrons

L'isomérisation *cis-trans* et la formation de diènes conjugués survenant lors de l'oxydation des GUVs respectivement de 18:1 PC et de 18:2 PC sont la conséquence de la délocalisation des électrons mis en jeu dans les double-liaisons des chaînes aliphatiques. Cette délocalisation est impossible lorsque les lipides de la membrane sont en conformation *trans* avant l'oxydation : les spectres Raman des vésicules de 18 :1 PC *trans* sont inchangés pendant toute la durée d'irradiation. On peut ainsi en déduire que la délocalisation est une étape nécessaire à la réaction entre les lipides et l'oxygène singulet, ce qui concorde avec les mécanismes réactionnels décrits dans la littérature [Porter et al., 1995].

Conclusion du chapitre

L'association de deux techniques expérimentales, la microscopie à contraste de phase et la spectroscopie Raman, nous donne accès à la cinétique des changements physico-chimiques intervenant sur une membrane lipidique subissant un stress oxydant photo-induit. Les comportements observés d'une composition lipidique à l'autre sont similaires : perméabilisation, fragilisation, étirabilité, et sont bien corrélés avec les changements chimiques détectés par le Raman, notamment au niveau des doubles liaisons C=C.

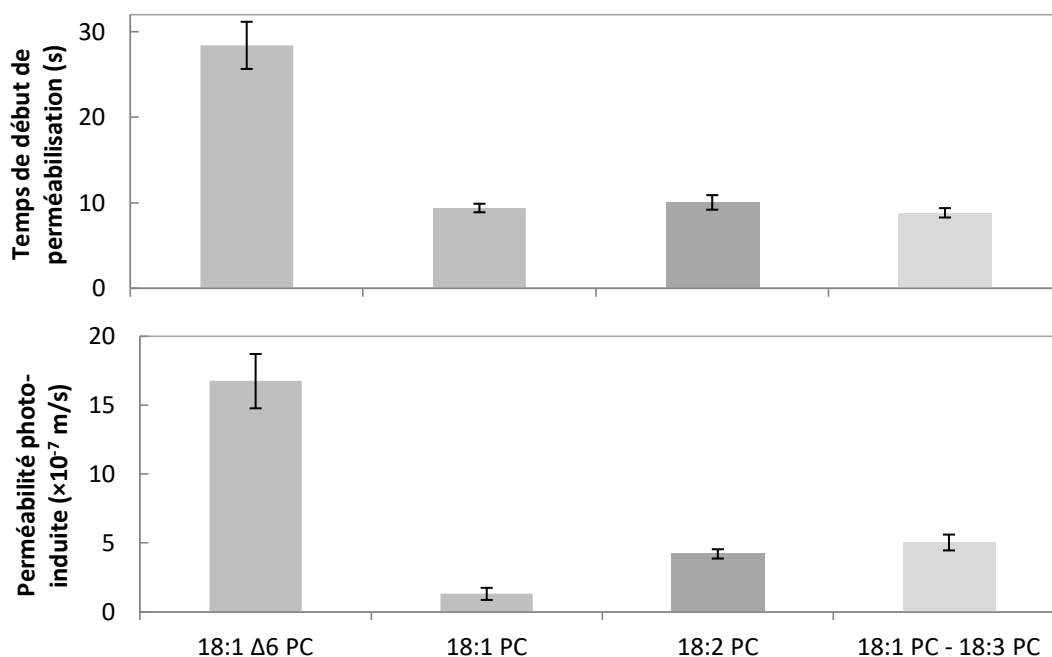


Figure 69 : Temps de début de perméabilisation (en haut) et perméabilité photo-induite moyenne (en bas) pour les différentes compositions de GUVs étudiées dans ce chapitre.

La perméabilisation des membranes est de plus en plus efficace avec le nombre d'insaturation par chaîne. La position de l'insaturation joue également un rôle important : plus elle est proche de la tête polaire du lipide, plus la géométrie du lipide est modifiée par l'oxydation, et plus la membrane est efficacement perméabilisée (fig. 69).

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

La mitochondrie remplit deux fonctions essentielles de la cellule : elle est à la fois le lieu de la production d'énergie, production qui s'accompagne d'un certain degré d'oxydation et le centre de régulation de la mort cellulaire, lorsque le niveau d'oxydation devient trop important. On sait que la perméabilisation des membranes mitochondriales, lors de l'apoptose est essentiellement due à des protéines [Elmore, 2007]. Il faut ainsi que les propriétés physico-chimiques des membranes mitochondriales rendent ces mécanismes possibles. Elles doivent en particulier être suffisamment résistantes à l'oxydation pour ne pas être rompue avant le début de l'apoptose et leurs propriétés mécaniques doivent permettre le fonctionnement de la chaîne respiratoire, malgré l'oxydation qu'elle génère.

Les études présentées dans ce manuscrit amènent à plusieurs conclusions sur les effets de l'oxydation sur les membranes phospholipidiques, notamment sur des membranes de composition proche de celle des membranes mitochondriales internes.

Nous avons montré que plus le nombre d'insaturations sur les chaînes aliphatiques des lipides est grand, plus la perméabilité photo-induite de la membrane oxydée est grande. En revanche, le nombre d'insaturations n'a pas d'influence sur le temps de début de perméabilisation. La position des insaturations joue également un rôle : plus elles sont à proximité de la tête, plus vite la membrane se perméabilise. Il semble ainsi que l'efficacité de la perméabilisation photo-induite est étroitement liée à la différence de géométrie entre les produits d'oxydation et les lipides initiaux de la membrane.

Les lipides hydroperoxydés peuvent avoir la possibilité d'externaliser un groupe peroxyde, polaire, et ainsi d'augmenter leur aire, et ce d'autant plus que la double liaison est éloignée de la tête du lipide [Khandelia et Mouritsen, 2009 ; Wong-Ekkabut et al., 2007] et d'autant plus que le nombre d'insaturations est grand [Rajamoorthi et al., 2005]. Des études en RMN ainsi que des simulations moléculaires montrent en revanche qu'un grand nombre d'insaturations peut aboutir à des conformations très compactes du lipide au sein de la bicouche [Gawrich et al., 2003]. Le clivage d'un lipide réduit le volume occupé par sa partie hydrophobe et donc diminue son paramètre d'empilement [Karatekin et al., 2003] d'autant plus que le clivage a lieu près de la tête polaire.

Pourtant, le cardiolipide, constitué de 4 chaînes aliphatiques chacune ayant 2 double liaisons C=C, échappe à ce cadre général.

Cardiolipide et résistance au stress oxydant

Le comportement des membranes contenant du cardiolipide vis-à-vis des photosensibilisateurs est différent de celui des membranes qui n'en contiennent pas. Les expériences de fluorimétrie décrites au chapitre 4 montrent notamment que la Ce6, dans les membranes avec cardiolipide (CL-GUVs et IM-GUVs), est dans un environnement plus hydrophobe que dans les autres membranes. Son pic d'émission de fluorescence dans les CL- et IM-GUVs est en effet situé à 672 nm (fig. 70), ce qui correspond à son émission lorsqu'elle est dissoute dans de l'éther diéthylique, un solvant très peu polaire. Dans les membranes sans cardiolipide, le spectre d'émission de la Ce6 se rapproche de son spectre d'émission dans l'éthanol (pic à 668 nm), solvant plus polaire que l'éther diéthylique. Nous avons également mesuré la fluorescence de la Ce6 dans des membranes de 18:2 PC et 18:2 PhosphatidylGlycérol (18:2 PG). Rappelons que, du point de vue de sa structure chimique, le cardiolipide est un dimère de 18:2 PG. Or, le pic d'émission de fluorescence de la Ce6 est situé à 666 nm dans le 18:2 PG, indiquant un environnement moins hydrophobe même que les membranes sans cardiolipide. On peut déduire de ce résultat que la différence d'environnement de la Ce6 entre les membranes avec et sans cardiolipide est due principalement à la structure particulière du dimère.

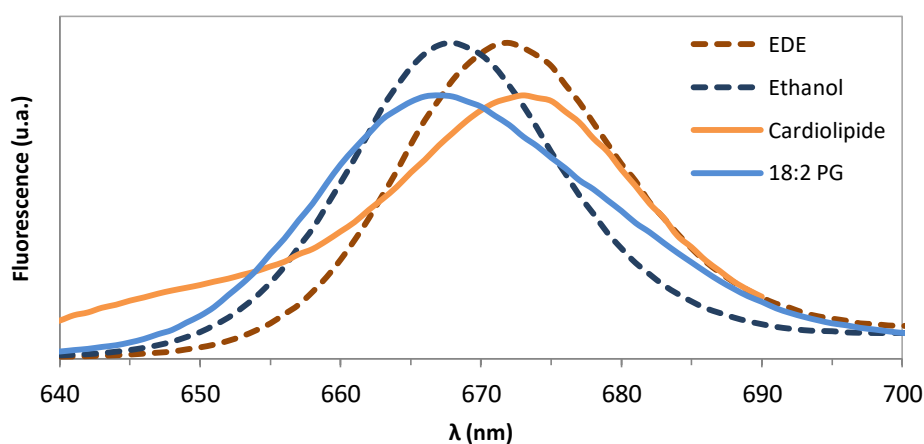


Figure 70 : Spectres d'émission de fluorescence de la chlorine e6 dans différents environnements : en pointillés bleus, dans l'éthanol ; en pointillés rouges, dans l'éther diéthylique, et en traits pleins bleus et rouges respectivement des membranes de 18:2 PC et 18:2 PG et des membranes de 18:2 PC et cardiolipide.

On peut également remarquer que la présence de 15% de cardiolipide diminue la constante d'affinité entre la chlorine-e6 et les membranes considérées (d'un facteur 3,2 pour des vésicules de 18:2 PC, et d'un facteur 1,5 pour des vésicules de 18:2 PC et 18:2 PE). Peu de données sur l'association des photo-sensibilisateurs avec des membranes contenant du cardiolipide sont présentes dans la littérature. On peut cependant supposer que cet effet demeure pour des photo-sensibilisateurs partageant avec la Ce6 certains points communs : répartition asymétrique entre des zones hydrophiles et des zones

hydrophobes, état de protonation à pH physiologique notamment. Des photosensibilisateurs naturels, comme l'hématoporphyrine ou la protoporphyrine IX (fig. 25) entrent dans cette catégorie.

Plusieurs résultats, exposés dans ce manuscrit, associent la présence de cardiolipide dans une membrane à sa résistance accrue au stress oxydant. Nous avons montré au chapitre 5 que le cardiolipide, à quantités égales de Ce6, retarde et ralentit la perméabilisation photo-induite. Lorsque du cardiolipide est présent dans une vésicule de 18:2 PC, son temps de début de perméabilisation est multiplié par 1,7 et sa perméabilité photo-induite est divisée par 2. Lorsque du cardiolipide est présent dans une matrice de 18:2 PC et 18:2 PE, la membrane est perméabilisée par un mécanisme différent : il ne s'agit plus de défauts d'organisation de la bicouche qui rendent la membrane perméable, mais de l'ouverture de pores temporaires de durée de vie suffisamment longue et de rayon suffisamment grand pour autoriser une diffusion significative des solutés. La fuite, une fois un pore ouvert, est alors bien plus rapide que la perméabilité due uniquement à des défauts membranaires.

Ce mécanisme de rupture membranaire, intervenant à un seuil d'oxydation important, peut être mis en parallèle avec le fonctionnement de la membrane interne de mitochondrie. De composition lipidique proche de celle de nos membranes modèles, la membrane mitochondriale interne doit fonctionner sans que son intégrité ne soit altérée par l'oxydation permanente qu'elle subit. Cependant, si le niveau d'oxydation est trop important, la mitochondrie doit pouvoir entrer en apoptose afin de préserver l'organisme.

En outre, un mécanisme de gonflement semblable à celui observé dans nos expériences avec les IM-GUVs existe dans les mitochondries, et fait partie de son fonctionnement normal. Un gonflement jusqu'à 30% du volume initial de la mitochondrie agit comme médiateur entre des signaux hormonaux de la phosphorylation oxydative [Halestrap, 1989]. Des études ont d'ailleurs montré que le cardiolipide est indispensable à la résistance des mitochondries à ce gonflement [Koshkin et Greenberg, 2002]. Nos études étendent cette idée aux membranes oxydées.

Vers des systèmes plus biologiques...

Les membranes modèles étudiées, si elles présentent des similarités de comportement avec les membranes mitochondriales internes, ne prennent pas en compte de nombreux paramètres, en particulier la présence de protéines. Les mitoplastes, des mitochondries dont la membrane externe a été ôtée de manière à préserver la membrane interne, constituent un modèle plus complexe et pertinent biologiquement (puisque les protéines y sont conservées et, en partie, fonctionnelles), tout en restant compatibles avec notre

montage expérimental (puisque'ils sont de taille micrométrique et donc observable au microscope dans les mêmes conditions que les GUVs).

○ Mitoplastes

Nous avons pu réaliser des expériences préliminaires similaires à celles menées sur membranes artificielles, sur deux types de mitoplastes : des mitoplastes de cellules cardiaques de souris, et des mitoplastes de tissu adipeux brun, qui sont de l'ordre de 2 fois plus riches en cardiolipide [Ruggiero et al., 1989].

Cependant, comparées aux études sur vésicules géantes, ces expériences posent plusieurs problèmes expérimentaux supplémentaires. En effet, la production des mitoplastes génère un certain nombre d'agglomérats indéterminés, probablement protéiques qui captent une partie des photo-sensibilisateurs. Ces agglomérats deviennent ainsi fluorescents et rendent l'étude de l'affinité entre photo-sensibilisateurs et membranes par fluorométrie (chapitre 4) impossible. Nombreux et opaques, ils compliquent également l'observation au microscope. D'autre part, les méthodes d'extraction des mitoplastes ne permettent pas de choisir les milieux internes et externes aux membranes. Ces objets sont donc peu contrastés et ne sédimentent que très lentement, ce qui complique davantage leur observation. Une centrifugation légère réduit cependant le nombre d'agglomérats et autorise de légères modification du milieu extérieur. On pourrait également modifier le milieu extérieur à l'aide d'un montage micro-fluidique constitué de plots bloquant les mitoplastes (fig. 71), ou par la micro-manipulation des mitoplastes.

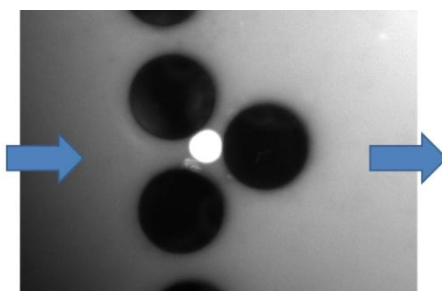


Figure 71 : Montage microfluidique. Les plots, disposés en triangle, retiennent les vésicules emportés par le flux hydrodynamique (indiqué par les flèches bleues). Les vésicules sont ici constituées de 18:1 PC et de 0,1% de lipides marqués (Rhod-PE), afin de pouvoir les visualiser en fluorescence. Le diamètre des plots est de 100 μm .

Nous avons pu observer 4 mitoplastes de chaque type, en présence de chlorure d'europium. Si le suivi du contraste s'est avéré impossible, nous avons obtenu des résultats préliminaires concernant l'observation de la morphologie des membranes. Comme pour les vésicules géantes, 3 des mitoplastes de cellules cardiaques sur les 4 observés ont exposé une phase d'importantes fluctuations après quelques secondes d'irradiation (fig. 72, A). L'un a également montré des fusions de membranes, observée, dans certaines conditions, lors de la photo-oxydation (fig. 72, B) [Heuvingh et Bonneau, 2009]. Aucun des mitoplastes de tissu adipeux brun n'a montré de changement morphologique dans nos conditions expérimentales (fig. 72, C).

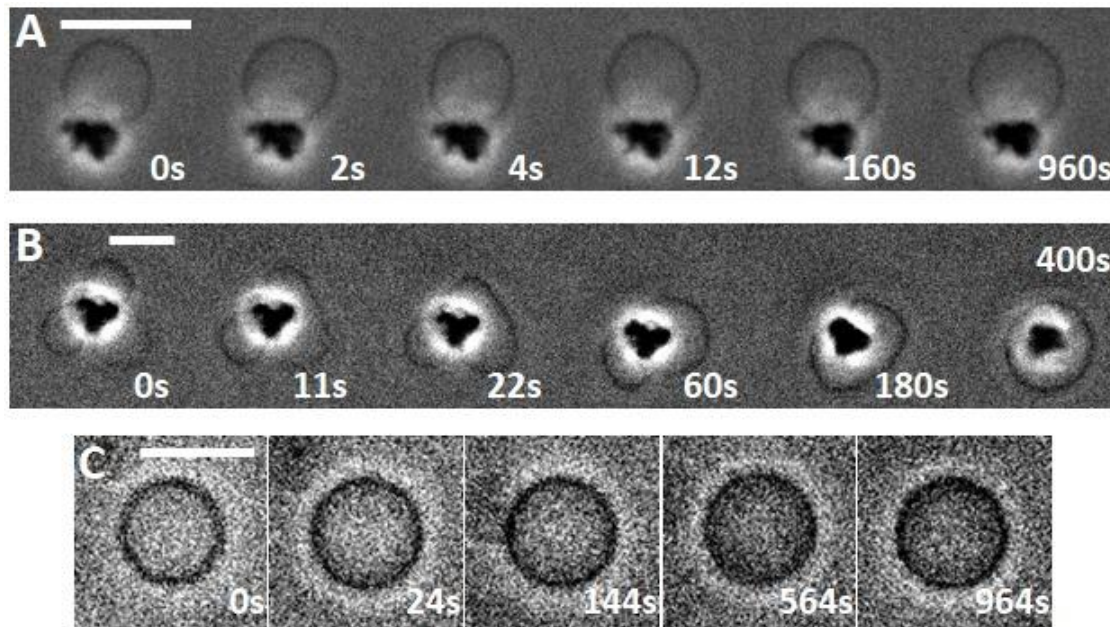


Figure 72 : Séquence d'images de l'oxydation photo-induite de mitochondres de cellules cardiaques (A et B) et de tissu adipeux brun (C) de souris, prises au microscope à contraste de phase. Les mitochondres sont en présence de chlorure de calcium sous irradiation constante à 405 nm. Les mitochondres de cellules cardiaques montrent une phase d'importantes fluctuations pendant environ 20s avant de reprendre une forme circulaire stable (A). L'un présente également un phénomène de fusion de membranes (B). Les mitochondres de tissu adipeux brun ne présentent aucun changement (C)

Le tissu adipeux brun est abondant chez les mammifères hibernants. Chez l'humain, il est présent chez le fœtus et le nouveau-né, et presque absent chez l'adulte. Les cellules du tissu adipeux brun génèrent de la chaleur par le découplage de la chaîne respiratoire : il y a consommation des graisses sans production d'ATP [Ailhaud et al., 2000]. La résistance des adipocytes bruns à l'oxydation, qui y est ainsi plus importante, pourrait être liée à l'abondance de cardiolipide au sein des membranes de ses mitochondries.

Ces observations vont ainsi dans le sens des conclusions obtenues précédemment : le cardiolipide augmente la résistance des membranes lipidiques au stress oxydant, ou aux effets de ce stress.

○ Structures mitochondriales

La membrane mitochondriale interne, outre la présence de cardiolipide, se caractérise par sa structure particulière en crêtes. Après avoir étudié les effets de l'oxydation sur les paramètres physiques de la membrane, il est donc intéressant d'en étudier les effets sur l'organisation spatiale de cette dernière. Deux voies de recherche ont été engagées pour cela : l'étude de membranes modèles présentant des structures analogues à celles de la membrane mitochondriale interne et l'observation de mitochondries *in vivo*.

Oxydation de crêtes mitochondriales modèles

Sur des vésicules géantes contenant du cardiolipide, il est possible de générer, par acidification locale de la membrane, des structures tubulaires semblables aux crêtes mitochondriales [Khalifat et al., 2008, 2011]. Ces structures sont maintenues tant que l'acidité locale est maintenue.

Or, nos expériences ont montré que l'oxydation photo-induite provoque des changements morphologiques importants sur les vésicules : fluctuations, bourgeonnements... Afin de comprendre la morphologie des mitochondries sous l'effet de l'oxydation, il serait intéressant de photo-oxyder des structures modèles de crêtes, et également de savoir s'il est possible de former ces structures à partir d'une membrane préalablement oxydée.

D'autre part, il est possible d'inclure dans des GUVs contenant du cardiolipide des ATP synthétase fonctionnelles [Almendro-Vedia et al., 2017]. Le photo-contrôle de l'oxydation d'un tel système pourrait être un moyen de caractériser l'efficacité de l'ATP synthétase selon la proportion de cardiolipide d'une part et selon le niveau d'oxydation du cardiolipide d'autre part. Générer des crêtes sur ce systèmes pourraient alors permettre de comprendre les liens entre structure, composition et fonctionnement de ce modèle minimal de mitochondrie.

Microscopie super-résolue SIM

La microscopie de fluorescence conventionnelle est limitée en résolution par la diffraction. Cette limite est de l'ordre de 200-300 nm.

Ici, le but est d'imager, de façon dynamique, les structures de la membrane interne mitochondriale, d'une largeur typique de 50 nm. Pour cela, nous avons utilisé un montage de microscopie super-résolue : la microscopie à illumination structurée, ou SIM (Structured-Illumination Microscopy).

La microscopie à illumination structurée repose sur l'utilisation de l'effet moiré. Lorsque deux motifs suffisamment fins sont superposées, typiquement deux grilles dont les lignes sont peu espacées, un motif apparaît : les franges de moiré (fig. 74a). Cet effet optique est d'ailleurs utilisé dans de nombreuses œuvres artistiques (fig. 73). Dans notre cas, l'un des deux motifs sera la structure à résoudre : les repliements de la membrane interne mitochondriale, ou plus précisément la distribution d'un marqueur fluorescent spécifique, et l'autre sera une grille de fréquence spatiale connue positionnée sur le chemin de la lumière d'excitation.

Figure 73 : Sculpture de Jens Zorn illustrant l'effet Moiré. La superposition de deux motifs en fait apparaître un troisième.

Figure 74 : Illustration du concept de l'amélioration de la résolution par illumination structurée. (a) Deux motifs de lignes superposés font apparaître des franges de moiré. (b) La limite imposée par la diffraction pour un microscope conventionnel définit une région observable circulaire dans l'espace réciproque. (c) Un motif sinusoïdale d'illumination a 3 composants dans l'espace de Fourier. (d) Lorsqu'un échantillon est illuminé par un motif sinusoïdal, la position des informations obtenues dans l'espace de Fourier est modifiée. La nouvelle région observable contient alors, en plus des informations obtenues en microscopie conventionnelle, des informations supplémentaires au-delà de la limite de diffraction. (e) Par une séquence de telles images, avec différentes orientations du motif sinusoïdal, on obtient une aire de la région observable deux fois plus grande, c'est-à-dire que la résolution spatiale est multipliée par deux. [Gustafsson, 2000]

Pour comprendre comment on peut récupérer l'information contenue dans les franges de moiré obtenues, il est plus aisé de penser l'image de l'échantillon dans l'espace réciproque, c'est-à-dire de visualiser la transformée de Fourier de cette image. Dans cet espace, toute l'information d'une image obtenue sur un microscope conventionnel est située dans un cercle centré sur l'origine (fig. 74b).

Si on choisit par exemple une illumination structurée selon des bandes sinusoïdales régulières, on obtient dans l'espace réciproque trois points dont l'un est à l'origine et les deux autres sont aux frontières de la région observable, diamétralement opposés. Leur angle dépend de l'orientation des bandes du motif utilisé. En superposant ce motif à l'échantillon à résoudre, on visualise des cercles centrés sur les points obtenus précédemment, et dont le rayon les étant au-delà de la zone observable (fig. 74d). Ces zones en dehors des frontières sont autant d'information nouvelle. En variant l'orientation des bandes du motif, on peut étendre la zone observable dans chaque direction, et ainsi doubler sa taille (fig. 74e). Autrement dit, dans l'espace direct, la résolution de l'image est doublée.

Observation des mitochondries de cellules HeLa

A l'aide du montage SIM et d'un marqueur fluorescent spécifiques aux membranes mitochondriales, le MitoTracker Green, il nous a ainsi été possible de visualiser la dynamique des structures mitochondriales. Ces membranes peuvent être préalablement mises en présence de chlorure de cobalt, c'est alors à la dynamique des changements de formes dues à l'oxydation des crêtes mitochondriales que nous avons accès.

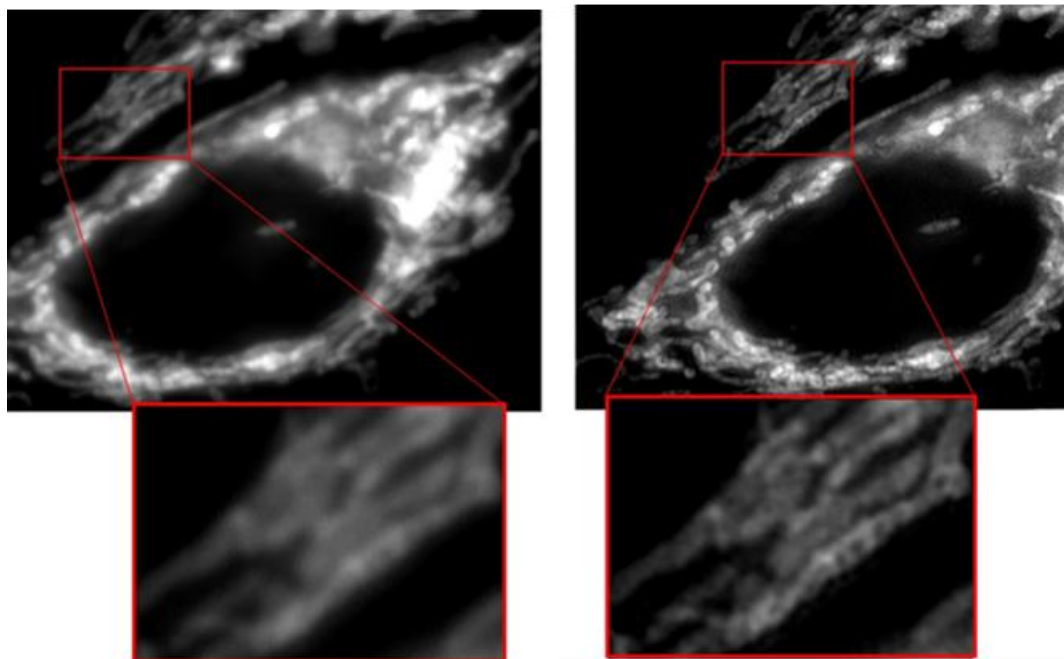


Figure 75 : Images de cellule HeLa dont les mitochondries sont marquées, en microscopie de fluorescence classique (à droite) et en microscopie SIM (à gauche). Temps d'acquisition : 66 ms.

Même avec la SIM, les crêtes mitochondriales sont sous la limite de résolution. En revanche, il est possible d'observer des structures internes correspondant aux crêtes mitochondriales, et ainsi de tirer des données quantitatives statistiques des images obtenues : longueur et rapport d'aspect des mitochondries, fréquence des crêtes sur une mitochondrie...

Les recherches exposées dans ce manuscrit s'inscrivent à la fois dans un contexte d'étude des effets de l'oxydation des objets biologiques et dans la compréhension du fonctionnement des mitochondries. Les interactions entre photo-sensibilisateurs et membranes lipidiques sont une thématique explorée au sein de notre équipe, en témoignent les précédentes thèses soutenues [Kerdous, 2013 ; Mojsizova, 2007]. Le travail mené ici complète la caractérisation de l'interaction entre la chlorine-e6 en particulier et les bicouches lipidiques. D'autre part, il établit des liens entre la chimie de l'oxydation des lipides et la physique de la perméabilisation des vésicules, croisant ainsi à la fois les domaines scientifiques et les échelles de taille. Le sujet a d'ailleurs des liens étroits avec l'actualité de ces différents domaines scientifiques, comme la question des graisses *trans* dans l'alimentation [Uauy et al., 2009], pointée par un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé, ou encore le rôle critique des mitochondries et de leur oxydation dans la maladie d'Alzheimer [Reddy et Beal, 2005] et dans les maladies dégénératives en général [Bhat et al., 2015].

Annexes

Annexes

A.1 Macro ImageJ utilisée pour le repérage des contours des vésicules

X est choisie préalablement par l'utilisateur en fonction de la taille de la vésicule étudiée.

```
// Ouvrir la séquence d'images

// Reconnaissance des contours
//run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
//run("Apply LUT", "stack");
run("Subtract Background...", "rolling=50 light stack");
setOption("BlackBackground", false);
run("Make Binary", "method=Default background=Default calculate");
run("Fill Holes", "stack");
run("Open", "stack");

// Mesures & sauvegarde
run("Set Measurements...", "area mean min centroid perimeter fit
shape stack display redirect=None decimal=3");
run("Analyze Particles...", "size=X-Infinity circularity=0.60-1.00
show=Outlines display clear add stack");
saveAs("Results");
run("Clear Results");
```

A.2 Macro ImageJ utilisée pour la quantification du contraste

```
// Fermer la séquence après la macro GUVContour puis la rouvrir
// Mais garder ROI Manager ouvert !

n=roiManager("count");
run("Set Measurements...", "area mean standard min stack display
redirect=None decimal=3");
for(i=0; i<n; i++)
{
    roiManager("Select", i);
    getSelectionBounds(xcorner,ycorner,width,height);
```

```

    if(xcorner<width/2)
    {
        xcorner=0;
    }
    else if(xcorner>=getWidth()-width/2)
    {
        xcorner=getWidth()-width*2;
    }
    else
    {
        xcorner=xcorner-width/2;
    }

    if(ycorner<=height/2)
    {
        ycorner=0;
    }
    else if(ycorner>=getHeight()-height/2)
    {
        ycorner=getHeight()-height*2;
    }
    else
    {
        ycorner=ycorner-height/2;
    }

    makeOval(xcorner,ycorner,width*2,height*2);
    roiManager("Update");
    run("Measure");
}
saveAs("Results");

```

A.3 Macro ImageJ d'ajustement de l'exponentielle décroissante du contraste des vésicules

```

//Time
time=newArray(nResults);
fps=getNumber("Entrer fps",5);

for(i=0 ; i<nResults ; i++)
{
    time[i]=getResult("Slice",i);
}

```



```

        time[i]=time[i]/fps;
    }

//Contrast
c=newArray(nResults);

for(i=0 ; i<nResults ; i++)
{
    c[i]=getResult("StdDev",i) / getResult("Mean",i);
}

//Normalizing contrast
Array.getStatistics(c, cmin, cmax, cmean, cstddev);
ctmp=newArray(nResults);
cnorm=newArray(nResults);
for(i=0 ; i<nResults ; i++)
{
    ctmp[i]=c[i]-cmin;
}
Array.getStatistics(ctmp, ctmpmin, ctmpmax, ctmpmean, ctmpstddev);
for(i=0 ; i<nResults ; i++)
{
    cnorm[i]=ctmp[i]/ctmpmax;
}

//Smooth Contrast
sc=newArray(nResults); //sc = Smooth Contrast
nsc=getNumber("Lissage du contraste en combien de points ?",9) ;
nsc=floor(nsc/2);
tmpsc=newArray(nsc);
for(i=0+nsc ; i<nResults-nsc ; i++)
{
    nscCorr=nsc;
    tmpsc=Array.slice(cnorm, i-nsc, i+nsc+1);
    Array.getStatistics(tmpsc, min, max, mean, stdDev);
    for(j=0 ; j<nsc ; j++)
    {
        test=0; //test vaut 0 si le contraste est compris entre
mean-stDev et mean+stdDev
        if (tmpsc[j]<mean-stdDev || tmpsc[j]>mean+stdDev)
        {
            nscCorr--;
            test=1;
        }
    }
}

```

```

        if (test==0)
            {
                sc[i]=sc[i]+tmpsc[j];
            }
    }
    if (nscCorr!=0)
        {
            sc[i]=sc[i]/nscCorr;
        }
    else
        {
            sc[i]=sc[i-1] ;
        }
}

//Save
file = File.open("");
for(i=0 ; i<nResults ; i++)
{
    print( file, d2s(time[i],1) + "\t"+d2s(sc[i],6) ) ;
}

//Plots
Plot.create("Contrast", "time (s)", "Contrast", time, sc);
Plot.show();

//Fit
inGuesses=newArray(4);
inGuesses[0]=getNumber("Contraste initial ?", 1);
inGuesses[1]=getNumber("Début de perméabilisation ?", 10);
inGuesses[2]=getNumber("Temps de perméabilisation ?", 100);
inGuesses[3]=getNumber("Décalage en y de l'exp ?", 0);
t1=getNumber("Chercher t0 autour de quel temps ?", 0);
t1=floor(t1*fps);

r2=0;
i=floor(t1-nResults/6+1);
if(i<0)
{
    i=0;
}

while(i>t1-nResults/6 && i<t1+nResults/6)

```

```

{
    timecut=newArray(nResults-nsc-i);
    timecut=Array.slice(time, i, nResults-nsc);
    sccut=newArray(nResults-nsc-i);
    sccut=Array.slice(sc, i, nResults-nsc);

    Fit.doFit("y = a*exp((b-x)/c)+d", timecut, sccut, inGuesses);
    if(r2<Fit.rSquared && Fit.p(1)>0 && Fit.p(2)>0)
    {
        close();
        Fit.plot;
        r2=Fit.rSquared;
        fitTimeOK=i;
        print(r2);
        af=Fit.p(0);
        bf=Fit.p(1);
        cf=Fit.p(2);
        df=Fit.p(3);
    }

    LastTimeTested=time[i];
    i++;
}

//Affichage
print("");
print("-----");
print("a=" + af);
print("b=" + bf);
print("c=" + cf);
print("d=" + df);
print("r²=" + r2);
fitTimeOK=fitTimeOK/fps;
print("fitTime=" + fitTimeOK);
print("Last Time Tested=" + LastTimeTested);
print("-----");
beep();

```

Références

- [Acehan et al., 2011] Acehan, D., Vaz, F., Houtkooper, R. H., James, J., Moore, V., Tokunaga, C., ... & Khuchua, Z. (2011). Cardiac and skeletal muscle defects in a mouse model of human Barth syndrome. *Journal of biological chemistry*, 286(2), 899-908.
- [Adams et Wilkinson, 1971] Adams, D. R., & Wilkinson, F. (1972). Lifetime of singlet oxygen in liquid solution. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 68, 586-593.
- [Agarwal et al., 2006] Agarwal, A., Gupta, S., & Sikka, S. (2006). The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 18(3), 325-332.
- [Ailhaud et al., 2000] Gérard Ailhaud, Bernard Beck, Pierre-François Bougnères, Marie-Aline Charles, Marie-Laure Frelut, et al. Obésité : dépistage et prévention chez l'enfant. [Rapport de recherche] Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM). 2000 <hal-01571949>
- [Akbarzadeh et al., 2013] Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., ... & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, 8(1), 102.
- [Alberts et al., 1990] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (1990). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- [Allen et al., 1989] Allen, R. D., Schroeder, C. C., & Fok, A. K. (1989). An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *The Journal of cell biology*, 108(6), 2233-2240.
- [Allen, 1995] Allen, R. D. (1995). Membrane tubulation and proton pumps. *Protoplasma*, 189(1-2), 1-8.
- [Allegrini and al., 1984] Allegrini, P. R., Pluschke, G., & Seelig, J. (1984). Cardiolipin conformation and dynamics in bilayer membranes as seen by deuterium magnetic resonance. *Biochemistry*, 23(26), 6452-6458.
- [Allison, 1998] Allison, W. S. (1998). F1-ATPase: a molecular motor that hydrolyzes ATP with sequential opening and closing of catalytic sites coupled to rotation of its γ subunit. *Accounts of chemical research*, 31(12), 819-826.
- [Almeida et al., 1992] Almeida, P. F., Vaz, W. L., & Thompson, T. E. (1992). Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis. *Biochemistry*, 31(29), 6739-6747.
- [Almendro-Vedia et al., 2017] Almendro-Vedia, V. G., Natale, P., Mell, M., Bonneau, S., Monroy, F., Joubert, F., & López-Montero, I. (2017). Nonequilibrium fluctuations of lipid membranes by the rotating motor protein F1F0-ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201701207.
- [Altmann, 1894] Altmann, R. (1894). *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen*. Veit.
- [Angelova et Dimitrov, 1986] Angelova, M. I., & Dimitrov, D. S. (1986). Liposome electroformation. *Faraday discussions of the Chemical Society*, 81, 303-311.
- [Angelova et Dimitrov 1988] Angelova, M., & Dimitrov, D. S. (1988). A mechanism of liposome electroformation. In *Trends in colloid and interface science II* (pp. 59-67). Steinkopff.
- [Arnarez et al., 2013-a] Arnarez, C., Marrink, S. J., & Periole, X. (2013). Identification of cardiolipin binding sites on cytochrome c oxidase at the entrance of proton channels. *Scientific reports*, 3, 1263.
- [Arnarez et al., 2013-b] Arnarez, C., Mazat, J. P., Elezgaray, J., Marrink, S. J., & Periole, X. (2013). Evidence for cardiolipin binding sites on the membrane-exposed surface of the cytochrome bc 1. *Journal of the American Chemical Society*, 135(8), 3112-3120.
- [Aust et Eveleigh, 1999] Aust, A. E., & Eveleigh, J. F. (1999). Mechanisms of DNA oxidation. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 222(3), 246-252.
- [Babior, 1999] Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93(5), 1464-1476.
- [Bainton, 1981] Bainton, D. F. (1981). The discovery of lysosomes. *J Cell Biol*, 91(3), 66s-76s.
- [Banfield, 2011] Banfield, D. K. (2011). Mechanisms of protein retention in the Golgi. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(8), a005264.
- [Barell et al., 1979] Barrell, B. G., Bankier, A. T., & Drouin, J. (1979). A different genetic code in human mitochondria. *Nature*, 282(5735), 189.
- [Bartke et Hannun, 2009] Bartke, N., & Hannun, Y. A. (2009). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of lipid research*, 50(Supplement), S91-S96.
- [Bayir et al., 2007] Bayir, H., Tyurin, V. A., Tyurina, Y. Y., Viner, R., Ritov, V., Amoscato, A. A., ... & Basova, L. V. (2007). Selective early cardiolipin peroxidation after traumatic brain injury: an oxidative lipidomics analysis. *Annals of neurology*, 62(2), 154-169.

- [Bell, 2012] Bell, S. (2012). *A dictionary of forensic science*. Oxford University Press.
- [Ben Dror et al., 2008] Dror, S. B., Bronshtein, I., Garini, Y., O'Neal, W. G., Jacobi, P. A., & Ehrenberg, B. (2009). The localization and photosensitization of modified chlorin photosensitizers in artificial membranes. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(3), 354-361.
- [Ben-Hur et al., 1996] Ben-Hur, E., Moor, A. C. E., Margolis-Nunno, H., Gottlieb, P., Zuk, M. M., Lustigman, S., ... & Dubbelman, T. M. A. R. (1996). The photodecontamination of cellular blood components: mechanisms and use of photosensitization in transfusion medicine. *Transfusion medicine reviews*, 10(1), 15-22.
- [Bensley and Hoerr, 1934] Bensley, R. R., & Hoerr, N. L. (1934). Studies on cell structure by the freezing-drying method VI. The preparation and properties of mitochondria. *The Anatomical Record*, 60(4), 449-455.
- [Bereiter-Hahn et Vöth, 1994] Bereiter-Hahn, J., & Vöth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy research and technique*, 27(3), 198-219.
- [Berg et al., 1999] Berg, K., Selbo, P. K., Prasmickaite, L., Tjelle, T. E., Sandvig, K., Moan, J., ... & Rodal, G. H. (1999). Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer research*, 59(6), 1180-1183.
- [Berg et al., 2002] Berg, J. M. (2002). Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry P. 155.
- [Berger et al., 2001] Berger, N., Sachse, A., Bender, J., Schubert, R., & Brandl, M. (2001). Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International journal of pharmaceutics*, 223(1-2), 55-68.
- [Bhat et al., 2015] Bhat, A. H., Dar, K. B., Anees, S., Zargar, M. A., Masood, A., Sofi, M. A., & Ganie, S. A. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 74, 101-110.
- [Brack, 1993] Brack, A. (Ed.). (1998). *The molecular origins of life: assembling pieces of the puzzle*. Cambridge University Press.
- [Bragg, 1921] Bragg, W. H. (1921). The crystal structure of ice. *Proceedings of the Physical Society of London*, 34(1), 98.
- [Brault et al., 1986] Brault, D., Vever-Bizet, C., & Le Doan, T. (1986). Spectrofluorimetric study of porphyrin incorporation into membrane models-evidence for pH effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 857(2), 238-250.
- [Brenner et al., 2005] Brenner, D.J., Krieg, N.R. & Staley, J.T. 2005. Volume Two. The Proteobacteria. Part A. Introductory Essays. In G.M. Garrity (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition. Springer-Verlag, New York: [i]-xxvi, 1-304.
- [Brigelius-Flohé et Traber, 1999] Brigelius-Flohe, R., & Traber, M. G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13(10), 1145-1155.
- [Brunmark et Cadenas, 1989] Brunmark, A., & Cadenas, E. (1989). Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(4), 435-477.
- [Buncel et Rajagopal, 1990] Buncel, E., & Rajagopal, S. (1990). Solvatochromism and solvent polarity scales. *Accounts of Chemical Research*, 23(7), 226-231.
- [Cadenas et Davies, 2000] Cadenas, E., & Davies, K. J. (2005). Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(10), 1274.
- [Campbell et Farell, 2007] Campbell, M. K., & Farrell, S. O. (2007). Biochemistry, Brooks.
- [Castile et Taylor, 1999] Castile, J. D., & Taylor, K. M. (1999). Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze-thaw extrusion. *International journal of pharmaceutics*, 188(1), 87-95.
- [Cass et Finkelstein, 1967] Cass, A., & Finkelstein, A. (1967). Water permeability of thin lipid membranes. *The Journal of general physiology*, 50(6), 1765-1784.
- [Chen et Li, 2001] Chen, Q. P., & Li, Q. T. (2001). Effect of cardiolipin on proton permeability of phospholipid liposomes: the role of hydration at the lipid-water interface. *Archives of biochemistry and biophysics*, 389(2), 201-206.
- [Cogliati et al., 2013] Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M. E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., ... & Perales-Clemente, E. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*, 155(1), 160-171.
- [Cogliati, 2016] Cogliati, S., Enriquez, J. A., & Scorrano, L. (2016). Mitochondrial cristae: where beauty meets functionality. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 261-273.
- [Cooper et Hausman, 2007] Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2007). *The cell: Molecular approach*. Medicinska naklada.

- [Comte et al., 1976] Comte, J., Maisterrena, B., & Gautheron, D. C. (1976). Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 419(2), 271-284.
- [Crowe et al., 1988] Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., Rudolph, A. S., Wistrom, C. A., Spargo, B. J., & Anchordoguy, T. J. (1988). Interactions of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 947(2), 367-384.
- [Cui et al., 2012] Cui, H., Kong, Y., & Zhang, H. (2012). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Journal of signal transduction*, 2012.
- [Cunderlikova et al., 1999] Čunderlíková, B., Gangeskar, L., & Moan, J. (1999). Acid-base properties of chlorin e6: relation to cellular uptake. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 53(1-3), 81-90.
- [Curatolo, 1987] Curatolo, W. (1987). Glycolipid function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 906(2), 137-160.
- [Dahlberg, 2007] Dahlberg, M. (2007). Polymorphic phase behavior of cardiolipin derivatives studied by coarse-grained molecular dynamics. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(25), 7194-7200.
- [Dalton et al., 1999] Dalton, T. P., Shertzler, H. G., & Puga, A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39(1), 67-101.
- [Daum, 1984] Daum, G. (1985). Lipids of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 822(1), 1-42.
- [Daum and Vance, 1997] Daum, G., & Vance, J. E. (1997). Import of lipids into mitochondria. *Progress in lipid research*, 36(2-3), 103-130.
- [Davies et al., 2012] Davies, K. M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gómez, J. D., & Kühlbrandt, W. (2012). Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13602-13607.
- [Dawson et al., 1992] Dawson, T. M., Dawson, V. L., & Snyder, S. H. (1992). A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Annals of neurology*, 32(3), 297-311.
- [De Gennes, 1992] De Gennes, P. G. (1992). Soft matter. *Reviews of modern physics*, 64(3), 645.
- [De Lamirande et Gagnon, 1995] De Lamirande, E., & Gagnon, C. (1995). Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reproduction*, 10(suppl_1), 15-21.
- [Deamer et Akeson, 1994] Deamer, D. W., & Akeson, M. (1994). Role of water in proton conductance across model and biological membranes.
- [DeRosa et Crutchley, 2002] DeRosa, M. C., & Crutchley, R. J. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233, 351-371.
- [Desagher et Martinou, 2000] Desagher, S., & Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in cell biology*, 10(9), 369-377.
- [Desport et Couratier, 2002] Desport, J. C., & Couratier, P. (2002). Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 253-259.
- [Deuling et Helfrich, 1976] Deuling, H. J., & Helfrich, W. (1976). The curvature elasticity of fluid membranes: a catalogue of vesicle shapes. *Journal de Physique*, 37(11), 1335-1345.
- [Dietrich et al., 2001] Dietrich, C., Bagatolli, L. A., Volovyk, Z., Thompson, N. L., Levi, M., Jacobson, K., & Gratton, E. (2001). Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophysical journal*, 80(3), 1417-1428.
- [Dobereiner, 2000] Döbereiner, H. G. (2000). Properties of giant vesicles. *Current Opinion in colloid & interface science*, 5(3-4), 256-263.
- [Doleiden et al., 1974] Doleiden, F. H., Fahrenholtz, S. R., Lamola, A. A., & Trozzolo, A. M. (1974). Reactivity of cholesterol and some fatty acids toward singlet oxygen. *Photochemistry and photobiology*, 20(6), 519-521.
- [Dunford, 2002] Dunford, H. B. (2002). Oxidations of iron (II)/(III) by hydrogen peroxide: from aquo to enzyme. *Coordination Chemistry Reviews*, 233, 311-318.
- [Eble et al., 1989] Eble, K. S., Coleman, W. B., Hantgan, R. R., & Cunningham, C. C. (1990). Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 265(32), 19434-19440.
- [Elmore et al., 2004] Elmore, S. P., Nishimura, Y., Qian, T., Herman, B., & Lemasters, J. J. (2004). Discrimination of depolarized from polarized mitochondria by confocal fluorescence resonance energy transfer. *Archives of biochemistry and biophysics*, 422(2), 145-152.
- [Elmore, 2007] Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

- [Estes et Mayer, 2004] Estes, D. J., & Mayer, M. (2005). Electroformation of giant liposomes from spin-coated films of lipids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 42(2), 115-123.
- [Esser et al., 1994] Esser, P., Pohlmann, B., & Scharf, H. D. (1994). The photochemical synthesis of fine chemicals with sunlight. *Angewandte Chemie International Edition*, 33(20), 2009-2023.
- [Etienne et David, 2012] Etienne, S., & David, L. (2012). Introduction à la physique des polymères-2e éd. Dunod.
- [Evans et Needham, 1987] Evans, E., & Needham, D. (1987). Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions. *Journal of Physical Chemistry*, 91(16), 4219-4228.
- [Fahy et al., 1994] Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., ... & Shimizu, T. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of lipid research*, 46(5), 839-862.
- [Falk, 1975] Falk, J. E. (1975). *Porphyrins and metalloporphyrins: a new edition based on the original volume by JE Falk* (Vol. 2). Elsevier Science & Technology.
- [Favier, 2003] Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.
- [Feigenson, 2007] Baumgart, T., Hunt, G., Farkas, E. R., Webb, W. W., & Feigenson, G. W. (2007). Fluorescence probe partitioning between L_o/L_d phases in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1768(9), 2182-2194.
- [Fiel et al., 1981] Fiel, R. J., Datta-Gupta, N., Mark, E. H., & Howard, J. C. (1981). Induction of DNA damage by porphyrin photosensitizers. *Cancer Research*, 41(9 Part 1), 3543-3545.
- [Filippov et al., 2003] Filippov, A., Orådd, G., & Lindblom, G. (2003). The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers. *Biophysical journal*, 84(5), 3079-3086.
- [Finkel et Holbrook, 2000] Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239.
- [Fournier et Galatola, 1998] Fournier, J. B., & Galatola, P. (1998). Bilayer membranes with 2D-nematic order of the surfactant polar heads. *Brazilian journal of physics*, 28(4), 00-00.
- [Frey et Mannella, 2000] Frey, T. G., & Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences*, 25(7), 319-324.
- [Friskén et al., 1999] Friskén, B. J., Asman, C., & Patty, P. J. (2000). Studies of vesicle extrusion. *Langmuir*, 16(3), 928-933.
- [Gandini et al., 1999] Gandini, S. C., Yushmanov, V. E., Borissevitch, I. E., & Tabak, M. (1999). Interaction of the tetra (4-sulfonatophenyl) porphyrin with ionic surfactants: aggregation and location in micelles. *Langmuir*, 15(19), 6233-6243.
- [Gardès-Albert et al., 2003] Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 91.
- [Gawrisch et al., 2003] Gawrisch, K., Eldho, N. V., & Holte, L. L. (2003). The structure of DHA in phospholipid membranes. *Lipids*, 38(4), 445-452.
- [Geiger et al., 1979] Geiger, A., Rahman, A., & Stillinger, F. H. (1979). Molecular dynamics study of the hydration of Lennard-Jones solutes. *The Journal of Chemical Physics*, 70(1), 263-276.
- [Ghormley et Hochanadel, 1971] Ghormley, J. A., & Hochanadel, C. J. (1971). Amorphous ice: density and reflectivity. *Science*, 171(3966), 62-64.
- [Gilkerson et al., 2013] Gilkerson, R. W., Selker, J. M., & Capaldi, R. A. (2003). The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS letters*, 546(2-3), 355-358.
- [Gillery, 2006] Gillery, P. (2006, July). Stress oxydant et glycation des protéines au cours du diabète sucré. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 64, No. 4, pp. 309-314).
- [Giraud et al., 2002] Giraud, M. F., Paumard, P., Soubannier, V., Vaillier, J., Arselin, G., Salin, B., ... & Velours, J. (2002). Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1555(1-3), 174-180.
- [Girotti, 2001] Girotti, A. W. (2001). Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1-3), 103-113.
- [Gold, 2016] Gold, M. H. (2016). A Historical Look at Photodynamic Therapy. In *Cosmetic Photodynamic Therapy* (Vol. 3, pp. 1-7). Karger Publishers.
- [Gonzalvez et al., 2005] Gonzalvez, F., Pariselli, F., Dupaigne, P., Budihardjo, I., Lutter, M., Antonsson, B., ... & Wang, X. (2005). tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak. *Cell death and differentiation*, 12(6), 614.

- [Gonzalvez et al., 2008] Gonzalvez, F., Schug, Z. T., Houtkooper, R. H., MacKenzie, E. D., Brooks, D. G., Wanders, R. J., ... & Gottlieb, E. (2008). Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. *The Journal of cell biology*, 183(4), 681-696.
- [Gould, 1991] Gould, S. J. (1991). *La vie est belle: les surprises de l'évolution*. Éditions du Seuil.
- [Griendling et al., 1994] Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D., & Alexander, R. W. (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation research*, 74(6), 1141-1148.
- [Gruen, 1985] Gruen, D. W. (1985). A model for the chains in amphiphilic aggregates. 1. Comparison with a molecular dynamics simulation of a bilayer. *The Journal of Physical Chemistry*, 89(1), 146-153.
- [Gudheti et al., 2007] Gudheti, M. V., Mlodzianoski, M., & Hess, S. T. (2007). Imaging and shape analysis of GUVs as model plasma membranes: effect of trans DOPC on membrane properties. *Biophysical journal*, 93(6), 2011-2023.
- [Guo et al., 2016] Guo, Y., Baulin, V. A., & Thalmann, F. (2016). Peroxidised phospholipid bilayers: insight from coarse-grained molecular dynamics simulations. *Soft matter*, 12(1), 263-271.
- [Gustafsson, 2000] Gustafsson, M. G. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of microscopy*, 198(2), 82-87.
- [Habersetzer et al., 2013] Habersetzer, J., Ziani, W., Larrieu, I., Stines-Chaumeil, C., Giraud, M. F., Brèthes, D., ... & Paumard, P. (2013). ATP synthase oligomerization: from the enzyme models to the mitochondrial morphology. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(1), 99-105.
- [Hahn et al., 2016] Hahn, A., Parey, K., Bublitz, M., Mills, D. J., Zickermann, V., Vonck, J., ... & Meier, T. (2016). Structure of a complete ATP synthase dimer reveals the molecular basis of inner mitochondrial membrane morphology. *Molecular cell*, 63(3), 445-456.
- [Haines et Dencher, 2002] Haines, T. H., & Dencher, N. A. (2002). Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS letters*, 528(1-3), 35-39.
- [Hakomori, 1975] Hakomori, S. I. (1975). Structures and organization of cell surface glycolipids dependency on cell growth and malignant transformation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 417(1), 55-89.
- [Halestrap, 1989] Halestrap, A. P. (1989). The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 973(3), 355-382.
- [Hall et Chignell, 1986] Hall, R. D., & Chignell, C. F. (1987). Steady-state near-infrared detection of singlet molecular oxygen: a Stern-Volmer quenching experiment with sodium azide. *Photochemistry and photobiology*, 45(4), 459-464.
- [Hallermaier et Neupert, 1973] Hallermaier, G., & Neupert, W. (1974). Lipid composition of mitochondrial outer and inner membranes of *Neurospora crassa*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 355(1), 279-288.
- [Hammer et Wills, 1978] Hammer, C. T., & Wills, E. D. (1978). The role of lipid components of the diet in the regulation of the fatty acid composition of the rat liver endoplasmic reticulum and lipid peroxidation. *Biochemical Journal*, 174(2), 585.
- [Han et Bartels, 1996] Han, P., & Bartels, D. M. (1996). Temperature dependence of oxygen diffusion in H₂O and D₂O. *The Journal of physical chemistry*, 100(13), 5597-5602.
- [Hatz et al., 2008] Hatz, S., Poulsen, L., & Ogilby, P. R. (2008). Time-resolved Singlet Oxygen Phosphorescence Measurements from Photosensitized Experiments in Single Cells: Effects of Oxygen Diffusion and Oxygen Concentration. *Photochemistry and photobiology*, 84(5), 1284-1290.
- [Hayyan et al., 2016] Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chemical reviews*, 116(5), 3029-3085.
- [Heuvingh et Bonneau, 2009] Heuvingh, J., & Bonneau, S. (2009). Asymmetric oxidation of giant vesicles triggers curvature-associated shape transition and permeabilization. *Biophysical journal*, 97(11), 2904-2912.
- [Hom et Sheu, 2009] Hom, J., & Sheu, S. S. (2009). Morphological dynamics of mitochondria—a special emphasis on cardiac muscle cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46(6), 811-820.
- [Hope et al., 1984] Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., & Cullis, P. R. (1985). Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 812(1), 55-65.
- [Horger et al., 2015] Horger, K. S., Liu, H., Rao, D. K., Shukla, S., Sept, D., Ambudkar, S. V., & Mayer, M. (2015). Hydrogel-assisted functional reconstitution of human P-glycoprotein (ABCB1) in giant liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(2), 643-653.

- [Huffman et al., 2010] Huffman, J., Gerber, R., & Du, L. (2010). Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers*, 93(9), 764-776.
- [Huster et al., 1997] Huster, D., Jin, A. J., Arnold, K., & Gawrisch, K. (1997). Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by ^{17}O NMR. *Biophysical journal*, 73(2), 855-864.
- [Idiart et Levin, 2004] Levin, Y., & Idiart, M. A. (2004). Pore dynamics of osmotically stressed vesicles. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 331(3-4), 571-578.
- [Israelachvili et al., 1975] Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J., & Ninham, B. W. (1976). Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 72, 1525-1568.
- [Israelachvili, 2011] Israelachvili, J. N. (2011). *Intermolecular and surface forces*. Academic press.
- [Jacobson et al., 1987] Jacobson, K., Ishihara, A., & Inman, R. (1987). Lateral diffusion of proteins in membranes. *Annual review of physiology*, 49(1), 163-175.
- [Jalmar and al., 2013] Jalmar, O., François-Moutal, L., García-Sáez, A. J., Perry, M., Granjon, T., Gonzalez, F., ... & Petit, P. X. (2013). Caspase-8 binding to cardiolipin in giant unilamellar vesicles provides a functional docking platform for bid. *PLoS one*, 8(2), e55250.
- [Jesorka and Orwar, 2008] Jesorka, A., & Orwar, O. (2008). Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 1, 801-832.
- [Jiménez-Hernández et al., 2005] Jiménez-Hernández, M. E., Manjón, F., García-Fresnadillo, D., & Orellana, G. (2006). Solar water disinfection by singlet oxygen photogenerated with polymer-supported Ru (II) sensitizers. *Solar Energy*, 80(10), 1382-1387.
- [Kagan et al., 2005] Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., Amoscato, A. A., ... & Vlasova, I. I. (2005). Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nature chemical biology*, 1(4), 223.
- [Karatekin et al., 2003] Karatekin, E., Sandre, O., Guitouni, H., Borghi, N., Puech, P. H., & Brochard-Wyart, F. (2003). Cascades of transient pores in giant vesicles: line tension and transport. *Biophysical journal*, 84(3), 1734-1749.
- [Karlsson et al., 2005] Karlsson, A., Sott, K., Markström, M., Davidson, M., Konkoli, Z., & Orwar, O. (2005). Controlled initiation of enzymatic reactions in micrometer-sized biomimetic compartments. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(4), 1609-1617.
- [Karnkowska et al., 2016] Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., Treitli, S. C., Petrželková, R., Eme, L., ... & Soukal, P. (2016). A eukaryote without a mitochondrial organelle. *Current Biology*, 26(10), 1274-1284.
- [Kates et al., 1984] Kates M., Pugh E.L., Ferrante G. (1984) Regulation of Membrane Fluidity by Lipid Desaturases. In: Kates M., Manson L.A. (eds) *Membrane Fluidity. Biomembranes*, vol 12. Springer, Boston, MA
- [Kawai and al., 2014] Kawai, C., Araújo-Chaves, J. C., Magrini, T., Sanches, C. O., Pinto, S., Martinho, H., ... & Nantes, I. L. (2014). Photodamage in a Mitochondrial Membrane Model Modulated by the Topology of Cationic and Anionic Meso-Tetrakis Porphyrin Free Bases. *Photochemistry and photobiology*, 90(3), 596-608.
- [Kerdous, 2013] Kerdous, R. (2013). Utilisation de nanoparticules copolymériques pour le ciblage cellulaire de photosensibilisateurs: étude sur des membranes modèles et corrélation avec l'internalisation cellulaire (Doctoral dissertation, Paris 6).
- [Kerdous et al., 2011] Kerdous, R., Heuvingh, J., & Bonneau, S. (2011). Photo-dynamic induction of oxidative stress within cholesterol-containing membranes: shape transitions and permeabilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(12), 2965-2972.
- [Khalifat et al., 2008] Khalifat, N., Puff, N., Bonneau, S., Fournier, J. B., & Angelova, M. I. (2008). Membrane deformation under local pH gradient: mimicking mitochondrial cristae dynamics. *Biophysical journal*, 95(10), 4924-4933.
- [Khalifat et al., 2011] Khalifat, N., Fournier, J. B., Angelova, M. I., & Puff, N. (2011). Lipid packing variations induced by pH in cardiolipin-containing bilayers: the driving force for the cristae-like shape instability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(11), 2724-2733.
- [Khandelia et Mouritsen, 2009] Khandelia, H., & Mouritsen, O. G. (2009). Lipid gymnastics: evidence of complete acyl chain reversal in oxidized phospholipids from molecular simulations. *Biophysical journal*, 96(7), 2734-2743.
- [Kim and al., 2010] Kim, J., Minkler, P. E., Salomon, R. G., Anderson, V. E., & Hoppel, C. L. (2011). Cardiolipin: characterization of distinct oxidized molecular species. *Journal of lipid research*, 52(1), 125-135.
- [Kirby et Gregoriadis, 1984] Kirby, C., & Gregoriadis, G. (1984). Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Nature Biotechnology*, 2(11), 979.

- [Koley et Bard, 2010] Koley, D., & Bard, A. J. (2010). Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(39), 16783-16787.
- [Koshkin et Greenberg, 2002] Koshkin, V., & Greenberg, M. L. (2002). Cardiolipin prevents rate-dependent uncoupling and provides osmotic stability in yeast mitochondria. *Biochemical Journal*, 364(Pt 1), 317.
- [Krasnovsky, 1983] Krasnovsky Jr, A. A., Kagan, V. E., & Minin, A. A. (1983). Quenching of singlet oxygen luminescence by fatty acids and lipids: Contribution of physical and chemical mechanisms. *FEBS Letters*, 155(2), 233-236.
- [Krauss 2001] Krauss, S. (2001). Mitochondria: Structure and role in respiration. *eL.S.*
- [Krebbs et al., 1979] Krebs, J. J., Hauser, H., & Carafoli, E. (1979). Asymmetric distribution of phospholipids in the inner membrane of beef heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 254(12), 5308-5316.
- [Kumar et al., 2007] Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Aster, J. C. (2014). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book*. Elsevier health sciences.
- [Kuroiwa et al., 1998] Kuroiwa, T., Kuroiwa, H., Sakai, A., Takahashi, H., Toda, K., & Itoh, R. (1998). The division apparatus of plastids and mitochondria. In *International review of cytology* (Vol. 181, pp. 1-41). Academic Press.
- [Kuzelova et Brault, 1994] Kuzelova, K., & Brault, D. (1994). Kinetic and equilibrium studies of porphyrin interactions with unilamellar lipidic vesicles. *Biochemistry*, 33(32), 9447-9459.
- [Lahda et al., 1996] Ladha, S., Mackie, A. R., Harvey, L. J., Clark, D. C., Lea, E. J., Brullemans, M., & Duclouier, H. (1996). Lateral diffusion in planar lipid bilayers: a fluorescence recovery after photobleaching investigation of its modulation by lipid composition, cholesterol, or alamethicin content and divalent cations. *Biophysical Journal*, 71(3), 1364-1373.
- [Lasic, 1993] Lasic, D. D. (1993). *Liposomes: from physics to applications*. Elsevier Science Ltd.
- [Lea et al., 1994] Lea, P. J., Temkin, R. J., Freeman, K. B., Mitchell, G. A., & Robinson, B. H. (1994). Variations in mitochondrial ultrastructure and dynamics observed by high resolution scanning electron microscopy (HRSEM). *Microscopy research and technique*, 27(4), 269-277.
- [Lenaz et al., 2002] Lenaz, G., Bovina, C., D'aurelio, M., Fato, R., Formiggini, G., Genova, M. L., ... & Ventura, B. (2002). Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959(1), 199-213.
- [Lentz et al., 1980] Lentz, B. R., Barrow, D. A., & Hoehli, M. (1980). Cholesterol-phosphatidylcholine interactions in multilamellar vesicles. *Biochemistry*, 19(9), 1943-1954.
- [Leray, 2010] Leray, C. (2010). *Les lipides dans le monde vivant: introduction à la lipidomique*. Tec et Doc.
- [Li et al., 1998] Li, A., Ségué, J., Heinemann, S. H., & Hoshi, T. (1998). Oxidation Regulates Cloned Neuronal Voltage-Dependent Ca²⁺ Channels Expressed in Xenopus Oocytes. *Journal of Neuroscience*, 18(17), 6740-6747.
- [Lewis et Engelman, 1983] Lewis, B. A., & Engelman, D. M. (1983). Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *Journal of molecular biology*, 166(2), 211-217.
- [Lewis and McElhaney, 2009] Lewis, R. N., & McElhaney, R. N. (2009). The physicochemical properties of cardiolipin bilayers and cardiolipin-containing lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(10), 2069-2079.
- [Lichtenberg et al., 1981] Lichtenberg, D., Freire, E., Schmidt, C. F., Barenholz, Y., Felgner, P. L., & Thompson, T. E. (1981). Effect of surface curvature on stability, thermodynamic behavior, and osmotic activity of dipalmitoylphosphatidylcholine single lamellar vesicles. *Biochemistry*, 20(12), 3462-3467.
- [Lide, 2009] Lide, D. R. (2009). *CRC handbook of chemistry and physics*.
- [London et Brown, 2000] London, E., & Brown, D. A. (2000). Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1508(1), 182-195.
- [Maier et Chan, 2002] Maier, C. M., & Chan, P. H. (2002). Book review: role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *The Neuroscientist*, 8(4), 323-334.
- [Malinin et al., 2012] Malinin, A. V., Zanishevskaja, A. A., Tuchin, V. V., Skibina, Y. S., & Silokhin, I. Y. (2012, May). Photonic crystal fibers for food quality analysis. In *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care III* (Vol. 8427, p. 842746). International Society for Optics and Photonics.
- [Maman et al., 1999] Maman, N., Dhimi, S., Phillips, D., & Brault, D. (1999). Kinetic and equilibrium studies of incorporation of di-sulfonated aluminum phthalocyanine into unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1420(1), 168-178.

- [Mannella, 2006] Mannella, C. A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(5-6), 542-548.
- [Margalit et al., 1983] Margalit, R., Shaklai, N., & Cohen, S. (1983). Fluorimetric studies on the dimerization equilibrium of protoporphyrin IX and its haemato derivative. *Biochemical Journal*, 209(2), 547.
- [Margulis et Bermudes, 1985] Margulis, L., & Bermudes, D. (1985). Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory. *Symbiosis (Philadelphia, Pa.)*, 1, 101-124.
- [Margulis, 1975] Margulis, L. (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. In *Symposia of the Society for Experimental Biology* (No. 29, pp. 21-38).
- [Martin et al., 2012] Martin, D. F., Maguire, M. G., Fine, S. L., Ying, G. S., Jaffe, G. J., Grunwald, J. E., ... & Ferris, F. L. (2012). Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology*, 119(7), 1388-1398.
- [Mathai et al., 2008] Mathai, J. C., Tristram-Nagle, S., Nagle, J. F., & Zeidel, M. L. (2008). Structural determinants of water permeability through the lipid membrane. *The Journal of general physiology*, 131(1), 69-76.
- [Maxfield et Tabas, 2005] Maxfield, F. R., & Tabas, I. (2005). Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*, 438(7068), 612.
- [Mayer et al., 1986] Mayer, L. D., Hope, M. J., & Cullis, P. R. (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 858(1), 161-168.
- [Megli et Russo, 2008] Megli, F. M., & Russo, L. (2008). Different oxidized phospholipid molecules unequally affect bilayer packing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(1), 143-152.
- [Meksiarun et al., 2015] Meksiarun, P., Maeda, Y., Hiroi, T., Andriana, B. B., & Sato, H. (2015). Analysis of the effects of dietary fat on body and skin lipids of hamsters by Raman spectroscopy. *Analyst*, 140(12), 4238-4244.
- [Merkel and Kearns, 1971] Merkel, P. B., & Kearns, D. R. (1971). Direct measurement of the lifetime of 1Δ oxygen in solution. *Chemical Physics Letters*, 12(1), 120-122.
- [Messerli et al., 2005] Messerli, M. A., Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E., Jung, S. K., Smith, P. J., & Sogin, M. L. (2005). Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukaryotic acidophile. *Journal of Experimental Biology*, 208(13), 2569-2579.
- [Miao et al., 1994] Miao, L., Seifert, U., Wortis, M., & Döbereiner, H. G. (1994). Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: the effect of area-difference elasticity. *Physical Review E*, 49(6), 5389.
- [Miloni, 2012] Milioni, D. (2012). *Perméabilisation photocontrôlée de la membrane biologique: étude en systèmes modèles et en cellules* (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).
- [Min and Boff, 2002] Min, D. B., & Boff, J. M. (2002). Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 1(2), 58-72.
- [Mitchell et Moyle, 1967] Mitchell, P., & Moyle, J. (1967). Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*, 213(5072), 137.
- [Mojzisova, 2007] Mojzisova, H. (2007). Facteurs structuraux et physicochimiques déterminant la localisation cellulaire de photosensibilisateurs et leur capacité à photo-perméabiliser des membranes: étude sur des membranes modèles, des protéines plasmiques et des cellules en culture (Doctoral dissertation, Paris 6).
- [Mojzisova et al., 2007b] Mojzisova, H., Bonneau, S., Vever-Bizet, C., & Brault, D. (2007). The pH-dependent distribution of the photosensitizer chlorin e6 among plasma proteins and membranes: a physico-chemical approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1768(2), 366-374.
- [Mojzisova et al., 2007c] Mojzisova, H., Bonneau, S., Vever-Bizet, C., & Brault, D. (2007). Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1768(11), 2748-2756.
- [Moon et al., 2011] Moon, J. J., Suh, H., Bershteyn, A., Stephan, M. T., Liu, H., Huang, B., ... & Goodwin, J. T. (2011). Interbilayer-crosslinked multilamellar vesicles as synthetic vaccines for potent humoral and cellular immune responses. *Nature materials*, 10(3), 243.
- [Morell et Quarles, 1999] Morell, P., & Quarles, R. H. (1999). Characteristic composition of myelin. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*, 6.
- [Muik et al., 2005] Muik, B., Lendl, B., & Molina-Díaz, A. (2005). Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy. *Chemistry and physics of lipids*, 134(2), 173-182.
- [Munro et Blier, 2012] Munro, D., & Blier, P. U. (2012). The extreme longevity of *Arctica islandica* is associated with increased peroxidation resistance in mitochondrial membranes. *Aging Cell*, 11(5), 845-855.
- [Nagle, 1993] Nagle, J. F. (1993). Area/lipid of bilayers from NMR. *Biophysical journal*, 64(5), 1476-1481.
- [Nakamoto et al., 1999] Nakamoto, R. K., Ketchum, C. J., & Al-Shawi, M. K. (1999). Rotational coupling in the F0F1 ATP synthase. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 28(1), 205-234.

- [Nelson et Cox, 2008] Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- [Newton, 1993] Newton, A. C. (1993). Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 22(1), 1-25.
- [Nichols-Smith and al., 2004] Nichols-Smith, S., Teh, S. Y., & Kuhl, T. L. (2004). Thermodynamic and mechanical properties of model mitochondrial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1663(1), 82-88.
- [Nicolson, 2013] Nicolson, G. L. (2014). The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(6), 1451-1466.
- [Nozaki et Tanford, 1981] Nozaki, Y., & Tanford, C. (1981). Proton and hydroxide ion permeability of phospholipid vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(7), 4324-4328.
- [Ogilby, 2010] Ogilby, P. R. (2010). Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chemical Society Reviews*, 39(8), 3181-3209.
- [Olbrich et al., 2000] Olbrich, K., Rawicz, W., Needham, D., & Evans, E. (2000). Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 79(1), 321-327.
- [Ostrander et al., 2001] Ostrander, D. B., Sparagna, G. C., Amoscato, A. A., McMillin, J. B., & Dowhan, W. (2001). Decreased Cardiolipin Synthesis Corresponds with Cytochrome c Release in Palmitate-induced Cardiomyocyte Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 38061-38067.
- [Ott et al., 2001] Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), 1259-1263.
- [Padayatti et al., 2003] Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., ... & Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American college of Nutrition*, 22(1), 18-35.
- [Pahl et Baeuerle, 1994] Pahl, H. L., & Baeuerle, P. A. (1994). Oxygen and the control of gene expression. *Bioessays*, 16(7), 497-502.
- [Paumard et al., 2002] Paumard, P., Vaillier, J., Couly, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., ... & Velours, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *The EMBO journal*, 21(3), 221-230.
- [Pautot et al., 2003] Pautot, S., Frisken, B. J., & Weitz, D. A. (2003). Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion. *Langmuir*, 19(7), 2870-2879.
- [Petereit et al., 2017] Petereit, J., Katayama, K., Lorenz, C., Ewert, L., Schertl, P., Kitsche, A., & Eubel, H. (2017). Cardiolipin supports respiratory enzymes in plants in different ways. *Frontiers in plant science*, 8, 72.
- [Petrache et al., 2000] Petrache, H. I., Dodd, S. W., & Brown, M. F. (2000). Area per lipid and acyl length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by 2H NMR spectroscopy. *Biophysical journal*, 79(6), 3172-3192.
- [Phan and Shin, 2015] Phan, M. D., & Shin, K. (2015). Effects of cardiolipin on membrane morphology: a Langmuir monolayer study. *Biophysical journal*, 108(8), 1977-1986.
- [Pinot et al., 2014] Pinot, M., Vanni, S., Pagnotta, S., Lacas-Gervais, S., Payet, L. A., Ferreira, T., ... & Barelli, H. (2014). Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science*, 345(6197), 693-697.
- [Pollak et Sutton, 1980] Pollak, J. K., & Sutton, R. (1980). The differentiation of animal mitochondria during development. *Trends in Biochemical Sciences*, 5(1), 23-27.
- [Porter, 1987] Porter, N. A. (1987). Autoxidation and Enzymatic Oxidation of Unsaturated Lipids. In *Anticarcinogenesis and Radiation Protection* (pp. 11-16). Springer, Boston, MA.
- [Porter et al., 1995] Porter, N. A., Caldwell, S. E., & Mills, K. A. (1995). Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30(4), 277-290.
- [Presley et al., 2003] Presley, A. D., Fuller, K. M., & Arriaga, E. A. (2003). MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 793(1), 141-150.
- [Przybylo et al., 2006] Przybylo, M., Sýkora, J., Humpolíčková, J., Benda, A., Zan, A., & Hof, M. (2006). Lipid diffusion in giant unilamellar vesicles is more than 2 times faster than in supported phospholipid bilayers under identical conditions. *Langmuir*, 22(22), 9096-9099.

- [PubChem Open Chemistry Database] Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA, Wang J, Yu B, Zhang J, Bryant SH. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4; 44(D1):D1202-13. Epub 2015 Sep 22 [PubMed PMID: 26400175] doi: 10.1093/nar/gkv951.
- [Pueyo et al., 1999] Pueyo, M. E., Gonzalez, W., Nicoletti, A., Savoie, F., Arnal, J. F., & Michel, J. B. (2000). Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor- κ B activation induced by intracellular oxidative stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(3), 645-651.
- [Rajamoorthi et al., 2005] Rajamoorthi, K., Petrache, H. I., McIntosh, T. J., & Brown, M. F. (2005). Packing and viscoelasticity of polyunsaturated ω -3 and ω -6 lipid bilayers as seen by ^2H NMR and X-ray diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, 127(5), 1576-1588.
- [Rao et Rao, 2007] Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 55(3), 207-216.
- [Rawicz et al., 2000] Rawicz, W., Olbrich, K. C., McIntosh, T., Needham, D., & Evans, E. (2000). Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophysical journal*, 79(1), 328-339.
- [Reczek et Chandel, 2015] Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Current opinion in cell biology*, 33, 8-13.
- [Redmond et Gamlin, 1999] Redmond, R. W., & Gamlin, J. N. (1999). A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and photobiology*, 70(4), 391-475.
- [Reddy et al., 2012] Reddy, P. H., Tripathi, R., Troung, Q., Tirumala, K., Reddy, T. P., Anekonda, V., ... & Manczak, M. (2012). Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as early events in Alzheimer's disease: implications to mitochondria-targeted antioxidant therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 639-649.
- [Reis et Spickett, 2015] Reis, A., & Spickett, C. M. (2012). Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(10), 2374-2387.
- [Ren et al., 2014] Ren, M., Phoon, C. K., & Schlame, M. (2014). Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. *Progress in lipid research*, 55, 1-16.
- [Ricchelli, 1995] Ricchelli, F. (1995). Photophysical properties of porphyrins in biological membranes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 29(2-3), 109-118.
- [Richmond et al., 2010] Richmond, D. L., Schmid, E. M., Martens, S., Stachowiak, J. C., Liska, N., & Fletcher, D. A. (2011). Forming giant vesicles with controlled membrane composition, asymmetry, and contents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(23), 9431-9436.
- [Rigaud et al., 1988] Rigaud, J. L., Paternostre, M. T., & Bluzat, A. (1988). Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 27(8), 2677-2688.
- [Riske et al., 2009] Riske, K. A., Sudbrack, T. P., Archilha, N. L., Uchoa, A. F., Schroder, A. P., Marques, C. M., ... & Itri, R. (2009). Giant vesicles under oxidative stress induced by a membrane-anchored photosensitizer. *Biophysical journal*, 97(5), 1362-1370.
- [Robinson, 1982] Robinson, N. C. (1982). Specificity and binding affinity of phospholipids to the high-affinity cardiolipin sites of beef heart cytochrome c oxidase. *Biochemistry*, 21(1), 184-188.
- [Robinson, 1991] Robinson, J. A. (1991). Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 332(1263), 107-114.
- [Rosing et Slater, 1972] Rosing, J., & Slater, E. C. (1972). The value of ΔG for the hydrolysis of ATP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 267(2), 275-290.
- [Ruggiero et al., 1989] Ruggiero, F. M., Gnoni, G. V., & Quagliariello, E. (1989). Lipid composition of brown adipose tissue mitochondria and microsomes in hyperthyroid rats. *The International journal of biochemistry*, 21(3), 327-332.
- [Rumble, 2017] Rytömaa, M., Mustonen, P., & Kinnunen, P. K. (1992). Reversible, nonionic, and pH-dependent association of cytochrome c with cardiolipin-phosphatidylcholine liposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 267(31), 22243-22248.
- [Rytömaa et al., 1992] Rytömaa, M., Mustonen, P., & Kinnunen, P. K. (1992). Reversible, nonionic, and pH-dependent association of cytochrome c with cardiolipin-phosphatidylcholine liposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 267(31), 22243-22248.
- [Sabatini et al., 2006] Sabatini, K., Mattila, J. P., Megli, F. M., & Kinnunen, P. K. (2006). Characterization of two oxidatively modified phospholipids in mixed monolayers with DPPC. *Biophysical journal*, 90(12), 4488-4499.
- [Sackmann, 1990] Sackmann, E. (1990). Molecular and global structure and dynamics of membranes and lipid bilayers. *Canadian Journal of Physics*, 68(9), 999-1012.

- [Sanderson, 1976] Sanderson, R. T. (1976). Chemical Bonds and Bond Energy Academic. *New York*, 77.
- [Sanderson, 1983] Sanderson, R. T. (1983). Polar Covalence, 240 p.
- [Sankhagowit et al., 2014] Sankhagowit, S., Wu, S. H., Biswas, R., Riche, C. T., Povinelli, M. L., & Malmstadt, N. (2014). The dynamics of giant unilamellar vesicle oxidation probed by morphological transitions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(10), 2615-2624.
- [Sastre et al., 2003] Sastre, J., Pallardó, F. V., & Viña, J. (2003). The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(1), 1-8.
- [Savill, 1997] Savill, J. (1997). Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *British medical bulletin*, 53(3), 491-508.
- [Sauer et al., 2001] Sauer, H., Wartenberg, M., & Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular physiology and biochemistry*, 11(4), 173-186.
- [Schenkel et Bakovic, 2014] Schenkel, L. C., & Bakovic, M. (2014). Formation and regulation of mitochondrial membranes. *International journal of cell biology*, 2014.
- [Schloerb et al., 1950] Schloerb, P. R., Friis-Hansen, B. J., Edelman, I. S., Solomon, A. K., & Moore, F. D. (1950). The measurement of total body water in the human subject by deuterium oxide dilution: With a consideration of the dynamics of deuterium distribution. *The Journal of clinical investigation*, 29(10), 1296-1310.
- [Schubert et al., 1986] Schubert, R., Beyer, K., Wolburg, H., & Schmidt, K. H. (1986). Structural changes in membranes of large unilamellar vesicles after binding of sodium cholate. *Biochemistry*, 25(18), 5263-5269.
- [Schweitzer et Schmidt, 2003] Schweitzer, C., & Schmidt, R. (2003). Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chemical reviews*, 103(5), 1685-1758.
- [Sciortino et Fornili, 1989] Sciortino, F., & Fornili, S. L. (1989). Hydrogen bond cooperativity in simulated water: Time dependence analysis of pair interactions. *The Journal of Chemical Physics*, 90(5), 2786-2792.
- [Sciortino et Sastry, 1994] Sciortino, F., & Sastry, S. (1994). Sound propagation in liquid water: the puzzle continues. *The Journal of chemical physics*, 100(5), 3881-3893.
- [Scolaro et al., 2002] Scolaro, L. M., Castriciano, M., Romeo, A., Patane, S., Cefali, E., & Allegrini, M. (2002). Aggregation behavior of protoporphyrin IX in aqueous solutions: clear evidence of vesicle formation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(10), 2453-2459.
- [Seifert, 1997] Seifert, U. (1997). Configurations of fluid membranes and vesicles. *Advances in physics*, 46(1), 13-137.
- [Selbo et al., 2012] Selbo, P. K., Weyergang, A., Eng, M. S., Bostad, M., Mølandsmo, G. M., Høgset, A., & Berg, K. (2012). Strongly amphiphilic photosensitizers are not substrates of the cancer stem cell marker ABCG2 and provides specific and efficient light-triggered drug delivery of an EGFR-targeted cytotoxic drug. *Journal of controlled release*, 159(2), 197-203.
- [Sharman et al., 2000] Sharman, W. M., Allen, C. M., & van Lier, J. E. (2000). Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. In *Methods in enzymology* (Vol. 319, pp. 376-400). Academic Press.
- [Shoemaker and al., 2002] Shoemaker, S. D., & Vanderlick, T. K. (2002). Intramembrane electrostatic interactions destabilize lipid vesicles. *Biophysical journal*, 83(4), 2007-2014.
- [Singer, 1972] Singer, S. J. (1972). A fluid lipid-globular protein mosaic model of membrane structure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 195(1), 16-23.
- [Smith et Green, 1974] Smith, R. J. M., & Green, C. (1974). The rate of cholesterol 'flip-flop' in lipid bilayers and its relation to membrane sterol pools. *FEBS letters*, 42(1), 108-111.
- [Snyder et al., 2006] Snyder, J. W., Skovsen, E., Lambert, J. D., Poulsen, L., & Ogilby, P. R. (2006). Optical detection of singlet oxygen from single cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(37), 4280-4293.
- [Soret, 1878] Soret, J.-L. (1878) Sur les specters d'absorption ultra-violet des terres de la gadolinite. *Comptes-rendus hebdomadaires des séances de l'académie des sciences*. <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k3043m/f1124.table> (consultée le 22/05/2018).
- [Strauss et al., 2008] Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R. R., & Kühlbrandt, W. (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *The EMBO journal*, 27(7), 1154-1160.
- [Susin et al., 1998] Susin, S. A., Zamzami, N., & Kroemer, G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1366(1-2), 151-165.
- [Tappel, 1962] Tappel, A. L. (1962). Vitamin E as the biological lipid antioxidant. In *Vitamins & Hormones* (Vol. 20, pp. 493-510). Academic Press.

- [Tatischeff et al., 2012] Tatischeff, I., Larquet, E., Falcón-Pérez, J. M., Turpin, P. Y., & Kruglik, S. G. (2012). Fast characterisation of cell-derived extracellular vesicles by nanoparticles tracking analysis, cryo-electron microscopy, and Raman tweezers microspectroscopy. *Journal of extracellular vesicles*, 1(1), 19179.
- [Tomsie and al., 2005] Tomšič, N., Babnik, B., Lombardo, D., Mavčič, B., Kandušer, M., Igljč, A., & Kralj-Igljč, V. (2005). Shape and size of giant unilamellar phospholipid vesicles containing cardiolipin. *Journal of chemical information and modeling*, 45(6), 1676-1679.
- [Turrens, 2003] Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(2), 335-344.
- [Uauy et al., 2009] Uauy, R., Aro, A., Clarke, R., L'abbé, M. R., Mozaffarian, D., Skeaff, C. M., ... & Tavella, M. (2009). WHO Scientific Update on trans fatty acids: summary and conclusions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(S2), S68.
- [Unsay et al., 2013] Unsay, J. D., Cosentino, K., Subburaj, Y., & García-Sáez, A. J. (2013). Cardiolipin effects on membrane structure and dynamics. *Langmuir*, 29(51), 15878-15887.
- [Vafai et Mootha 2012] Vafai, S. B., & Mootha, V. K. (2012). Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature*, 491(7424), 374.
- [Van Bruggen et al., 1983] Van Bruggen, J. J., Stumm, C. K., & Vogels, G. D. (1983). Symbiosis of methanogenic bacteria and sapropelic protozoa. *Archives of microbiology*, 136(2), 89-95.
- [Van Meer et al., 2008] Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(2), 112.
- [Vitkova et al., 2006] Vitkova, V., Genova, J., Mitov, M. D., & Bivas, I. (2006). Sugars in the aqueous phase change the mechanical properties of lipid mono- and bilayers. *Molecular crystals and liquid crystals*, 449(1), 95-106.
- [Voet et al, 2013] Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level.
- [Vysniauskas et al., 2016] Vyšniauskas, A., Qurashi, M., & Kuimova, M. K. (2016). A Molecular Rotor that Measures Dynamic Changes of Lipid Bilayer Viscosity Caused by Oxidative Stress. *Chemistry-A European Journal*, 22(37), 13210-13217.
- [Wang et Ballatori, 1998] Wang, W., & Ballatori, N. (1998). Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacological Reviews*, 50(3), 335-356.
- [Wasilewski et Scorrano, 2009] Wasilewski, M., & Scorrano, L. (2009). The changing shape of mitochondrial apoptosis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(6), 287-294.
- [Weber et al., 2014] Weber, G., Charitat, T., Baptista, M. S., Uchoa, A. F., Pavani, C., Junqueira, H. C., ... & Schroder, A. P. (2014). Lipid oxidation induces structural changes in biomimetic membranes. *Soft Matter*, 10(24), 4241-4247.
- [Weissmann, 1965] Weissmann, G. (1965). Lysosomes. *New England Journal of Medicine*, 273(20), 1084-1090.
- [Westhoff et Reid, 2004] Westhoff, C. M., & Reid, M. E. (2004). The Kell, Duffy, and Kidd blood group systems. *Immunohematology*, 20(1), 37-49.
- [Wey et al, 1981] Wey, C. L., Cone, R. A., & Edidin, M. A. (1981). Lateral diffusion of rhodopsin in photoreceptor cells measured by fluorescence photobleaching and recovery. *Biophysical journal*, 33(2), 225-232.
- [Wong-Ekkabut et al., 2007] Wong-Ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I. M., Tieleman, D. P., & Monticelli, L. (2007). Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophysical journal*, 93(12), 4225-4236.
- [Woodbury et al., 2006] Woodbury, D. J., Richardson, E. S., Grigg, A. W., Welling, R. D., & Knudson, B. H. (2006). Reducing liposome size with ultrasound: bimodal size distributions. *Journal of liposome research*, 16(1), 57-80.
- [Whikehart et Hess, 1976] Whikehart, D. R., & Hess, H. H. (1977). Properties of liposomes with a phospholipid ratio similar to that of retinal rod outer segment membranes: Interaction with opsin and other proteins. *Experimental eye research*, 24(3), 279-289.
- [White, 1999] White, M. (1999). Mediators of inflammation and the inflammatory process. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(3), S378-S381.
- [Yamakawa et Nagai, 1978] Yamakawa, T., & Nagai, Y. (1978). Glycolipids at the cell surface and their biological functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 3(2), 128-131.
- [Yu-Ran et Jin-Pei, 2015-2016] Yu-Ran Luo and Jin-Pei Cheng "Bond Dissociation Energies" in CRC Handbook of Chemistry and Physics, 96th Edition
- [Zhang et al., 2006] Zhang, Y. L., Frangos, J. A., & Chachisvilis, M. (2006). Laurdan fluorescence senses mechanical strain in the lipid bilayer membrane. *Biochemical and biophysical research communications*, 347(3), 838-841.

Résumé

La mitochondrie est à la fois le lieu de la production d'énergie de la cellule et le centre régulateur de la mort cellulaire. L'efficacité de ces 2 fonctions est liée au niveau d'oxydation de la membrane mitochondriale interne (MMI).

Le but de ce travail est de comprendre l'influence des lipides de la membrane sur sa résistance au stress oxydant. Les expériences sont menées sur des liposomes mimant la MMI. Leur oxydation est déclenchée par l'irradiation de la Ce6, une molécule photo-sensibilisatrice ayant une forte affinité pour les bicouches lipidiques.

D'abord, l'association entre membranes et Ce6 est quantifiée par fluorimétrie. Ces mesures permettent de garder constant le ratio Ce6/lipides d'une composition membranaire à l'autre. Nous étudions ensuite, par microscopie à contraste de phase, l'influence de la nature des têtes des lipides et de la position, du nombre et de la conformation des insaturations des chaînes lipidiques sur la perméabilisation du liposome déclenchée par son oxydation. Cette perméabilisation est due à deux phénomènes : la formation de défauts dans la bicouche et l'ouverture de pores micrométriques dans la membrane. Les seconds ne permettent une fuite significative que pour des membranes de composition proche des MMI. La présence du cardiolipide, spécifique aux mitochondries, retarde et réduit la perméabilité induite. La perméabilisation est d'autant plus efficace que les lipides comportent des insaturations et qu'elles sont proches de la tête polaire. La spectrométrie Raman donne en outre accès à la chimie du phénomène. Notamment, l'oxydation de la membrane n'est possible que si les électrons engagés dans la double liaison peuvent être délocalisés.

Abstract

Mitochondrion is both the place of cell energy production and the regulatory center of apoptosis. The efficiency of these functions depends on the oxidation level of inner mitochondrial membranes (IMM).

The aim of this work is to decipher the influence of lipids on the membrane resistance to oxidative stress. Experiments are done on IMM-mimicking liposomes. Membrane oxidation is controlled by irradiation of the Ce6, a photosensitizer with high affinity for lipid bilayers.

First we quantify the binding of Ce6 to membrane by fluorimetry. These measures are used to have a ratio Ce6/lipids equal between membrane compositions. Then we study, by phase contrast microscopy, the influence of the nature of lipid polar head and of the number, position and conformation of aliphatic chains insaturations on the oxidation-induced liposome permeabilization. This permeabilization is due to 2 phenomena : the formation of membrane defects and micrometric pore openings. These latter allow, for IMM-like membranes, a significant leak of liposome inner medium. The presence of cardiolipin, a mitochondrion-specific lipid, delays and decreases the induced permeability. The more insaturations lipids have and the closer to the polar head they have, the more efficient is the permeabilization. Raman spectroscopy allows us to follow chemical scenario of this phenomenon. In particular, membrane oxidation is possible only if the double bonds electron can be delocalized.