

Laboratoire Jean Perrin FRE 3231
Université Pierre et Marie Curie CNRS

Equipe « Biophotonique »

Titre : Photo-contrôle de la stabilité de membranes biomimétiques.

Title: Photo-control of stability of biomimetic membranes.

Résumé :

La thèse portera sur l'étude de la stabilité de membranes sous l'effet d'un stress oxydant photo-contrôlé. Par des approches physiques et biophysiques, il s'agira d'appréhender les bases physiques de la photo-modulation des propriétés (courbure, symétrie, perméabilité...) de membranes biomimétiques. L'effet de la composition membranaire et des conditions physicochimiques (notamment le pH) sur ces mécanismes sera l'objet d'une attention particulière. La compréhension de ces phénomènes permettra d'une part d'envisager le photo-contrôle du passage membranaire de différents objets et molécules, afin notamment d'envisager d'éventuels effets de seuil. Nos résultats sur des systèmes modèles de membranes seront corrélés à des observations *in cellulose*. D'autre part, en nous attachant aux particularités de la cardiolipine, le photo-contrôle de l'oxydation membranaire permettra d'appréhender le rôle de ce lipide dans la structure, la dynamique et la perméabilité d'une membrane sous stress oxydatif.

Photo-contrôle de la stabilité de membranes biomimétiques

Les membranes biologiques sont des barrières spécifiques limitant et contrôlant la diffusion et le transport des molécules dans les cellules. Ce sont également des objets auxquels la physique de la matière molle s'intéresse. Afin de mieux appréhender ces objets, nous nous intéressons au photo-contrôle de leurs propriétés – notamment de leur perméabilité – via des molécules photo-activables, appelées photosensibilisateurs.

Le macrocycle de ces molécules tétrapyrroliques - porphyrines, chlorines, phtalocyanines... - leur confère des propriétés photo-physiques très particulières. Leur irradiation par la lumière génère, par l'intermédiaire de leur état triplet, des espèces réactives comme l'oxygène singulet ou des oxyradicaux. La durée de vie de ces espèces moléculaires est très courte et leur action est donc très localisée. Ces espèces provoquent, dans la zone à la fois irradiée et marquée par le tétrapyrrole (photosensibilisateur), des altérations moléculaires. Le ciblage précis de photosensibilisateurs vers l'un ou l'autre des compartiments cellulaires est donc à la base de leur potentiel à modifier et à contrôler la physiologie des cellules. Par exemple, l'internalisation photo-assistée (PCI) de macromolécules dans les cellules est basée sur l'altération photo-induite des membranes des endosomes avant leur maturation en lysosomes [1, 2]. Des altérations plus importantes, notamment au niveau des mitochondries, conduisent, elles, à la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose. Cette mort cellulaire photo-induite est utilisée dans le cadre d'une thérapie anti-cancéreuse appelée PhotoDynamic Therapy (PDT). Ces approches ont récemment reçu une nouvelle impulsion avec la création du GRD 3049 POTOMED, qui est aujourd'hui dans une dynamique d'internalisation européenne.

Les effets biologiques des photosensibilisateurs tiennent donc tant à leurs propriétés intrinsèques qu'à leurs interactions avec les biomolécules et leur localisation subcellulaire. Cette dualité d'action est à la base de notre démarche qui concerne à la fois l'étude de processus "au noir" et ceux sous excitation lumineuse.

Thématiques de l'équipe d'accueil :

Les membranes lipidiques sont des cibles biologiques majeures des photosensibilisateurs. Nous étudions l'effet de l'oxydation de membranes sur leurs propriétés physiques (forme, courbure, perméabilité...). Les phénomènes oxydatifs sont déclenchés de façon contrôlée par l'intermédiaire d'un photosensibilisateur. Dans ce cadre, les des objectifs de l'équipe d'accueil sont donc :

- d'appréhender les bases physiques et physico-chimiques de la localisation membranaire des photosensibilisateurs (au niveau de membranes modèles et au niveau subcellulaire). Nous nous intéressons particulièrement à la dynamique de des interactions molécules-membranes.
- de comprendre les mécanismes de photo-perméabilisation des membranes. Une collaboration avec Kristian Berg est établie sur ce sujet (programme d'échange Aurora).
- de photo-contrôler et de mesurer, de façon dynamique, les propriétés physicochimiques, morphologiques et physiques des membranes.

Programme de thèse :

Des études récentes ont permis, par différentes approches, sur SUV (Small Unilamellar Vesicles) et sur GUV (Giant Unilamellar Vesicles), de mieux comprendre les effets mécaniques impliqués dans la déstabilisation photo-induite des membranes : nous avons clairement mis en évidence l'importance de l'asymétrie membranaire [3]. La physique de déstabilisation membranaire est notamment étroitement liée aux différentes voies de relaxations des contraintes photo-induites. De ce fait, la composition de la membrane (et sa photo-modulation) sont des paramètres clés [4, 5].

Bases physiques de la perméabilisation des membranes. Les membranes sur lesquelles ces résultats ont été obtenus sont constituées de phospholipides. Les membranes biologiques sont évidemment beaucoup plus complexes. Entre autre, elles contiennent un grand nombre de constituants, tels que le cholestérol par exemple, susceptibles de passer rapidement d'un feuillet à l'autre de la membrane (flip-flop). Ces molécules modifient de façon importante la physique des membranes. Le cholestérol augmente leur rigidité et donc l'énergie nécessaire pour photo-induire les changements de forme impliqués dans les

mécanismes exposés ci-dessus, mais offre une voie alternative de relaxation du stress photo-induit en diminuant l'asymétrie par flip-flop. L'objet de nos travaux est donc désormais de comprendre l'effet de cette composition membranaire (présence de cholestérol, cardiolipine, phosphatidyl-ethanolamine...) et des conditions physicochimiques (notamment le pH) sur ces mécanismes.

Photo-modulation du trafic intracellulaire. Connaissant à la fois les mécanismes d'interaction des photosensibilisateurs avec les membranes, ceux gouvernant leur localisation dans les cellules [6] et ceux expliquant leur efficacité de perméabilisation photo-induite des membranes dans lesquelles ils se localisent [3, 7], nous souhaitons utiliser ces composés pour contrôler le passage transmembranaire de différents objets de taille et de propriétés physico-chimiques différentes. Nos expériences sont réalisées parallèlement sur des cellules et sur des systèmes modèles. Nous nous intéressons aux effets physiques et physico-chimiques (taille, propriétés de surface...) des composés internalisés sur l'effet de la PCI. Le mécanisme impliqué est très certainement fonction de la taille de la molécule à libérer, de la composition de la membrane, et de l'étendue des dommages photochimiques. Une attention particulière est portée sur les possibles effets de seuil.

Dynamique de structures membranaires biomimétiques : oxydation photo-contrôlée de membranes. Du point de vue biotechnologique, la perméabilisation des membranes est généralement envisagée au regard de l'internalisation des macromolécules dans les cellules. Cependant, d'un point de vue plus fondamental, les propriétés membranaires modifiées par les réactions photochimiques que nous induisons (perméabilité, courbure...) sont directement liées à leurs rôles biologiques. Par exemple, au cours de l'apoptose, la mitochondrie subit des modifications de la perméabilité de ses deux membranes. L'apoptose étant liée à l'oxydation des lipides, notre approche liant peroxydation lipidique et perméabilisation membranaire semble donc pertinente au regard de cette problématique. Notons d'ailleurs que lors de la PDT, la localisation du photosensibilisateur au niveau mitochondrial oriente la destruction tumorale vers un mécanisme apoptotique et non nécrotique. Notre objectif, dans ce contexte, sera d'établir des corrélations entre la biophysique des membranes et les structures mitochondriales, notamment les cristaux de la membrane interne des mitochondries (MIM). Le rôle majeur de la cardiolipine combinée avec l'action des flux de protons dans ces systèmes a déjà été mis en évidence [8]. Nous souhaitons aujourd'hui étudier le rôle des ROS dans la perméabilisation de la MIM ainsi que dans la modification de la structure de cette membrane. Cette problématique devrait trouver une place dans le cadre de l'initiation de l'apoptose, qui s'accompagne à la fois de la perméabilisation de cette membrane, des pertes de structures que nous observons et d'une perte en cardiolipine. D'autre part, les mitochondries saines étant le siège de processus redox, un nombre important de ROS y est naturellement généré. Notre approche devrait permettre de comprendre en quoi est-ce que la cardiolipine permet à cette membrane d'y résister.

Principales techniques utilisées :

Microscopie et microspectroscopie de fluorescence. Spectroscopies optiques. Techniques d'irradiation. Photolyse laser impulsionnelle. Stopped flow. Préparation de Small Unilamellar Vesicles et de Giant Unilamellar Vesicles.

Principales collaborations liées au projet de thèse

Nos collaborations au niveau national sont essentiellement structurées autour du GDR 3049 – PHOTOMED. Notre collaboration avec P. Vicendo se déroule dans le cadre du projet COPOPDT financé par l'ANR. Au niveau international, notre collaboration avec K. Berg du Radium institut d'Oslo (Norvège) a été mise en place dans le cadre de l'étude de l'internalisation photo-assistée, dont il est l'inventeur. Elle a été soutenue par un partenariat Hubert Curien « AURORA » d'EGIDE.

Kristian Berg, Department of Radiation Biology, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norvège.

Julien Heuvingsh, Université Denis Diderot / ESPCI, UMR7636 Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes, Paris.

Nicolas Puff, Université Paris 6 /Laboratoire MSC, Paris.

Pactricia Vicendo, Université Paul Sabatier, Laboratoire des IMRCP - UMR5623, Toulouse.

Références :

1. Berg, K., et al., *Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol*. *Cancer Res*, 1999. **59**(6): p. 1180-3.
2. Selbo, P.K., et al., *In vivo documentation of photochemical internalization, a novel approach to site specific cancer therapy*. *Int J Cancer*, 2001. **92**(5): p. 761-6.
3. Heuvingh, J. and S. Bonneau, *Asymmetric oxidation of giant vesicles triggers curvature-associated shape transition and permeabilization*. *Biophys J*, 2009. **97**(11): p. 2904-12.
4. Kerdous, R., J. Heuvingh, and S. Bonneau, *Photo-dynamic induction of oxidative stress within cholesterol-containing membranes: Shape transitions and permeabilization*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2011. **1808**(12): p. 2965-2972.
5. Yoda, T., et al., *Dynamic Response of a Cholesterol-containing Model Membrane to Oxidative Stress*. *Chemistry Letters*, 2010. **39**(12): p. 1273-1274.
6. Mojzisova, H., S. Bonneau, and D. Brault, *Structural and physico-chemical determinants of the interactions of macrocyclic photosensitizers with cells*. *Eur Biophys J*, 2007. **36**(8): p. 943-53.
7. Mojzisova, H., et al., *Photosensitizing properties of chlorins in solution and in membrane mimicking systems: The role of the photosensitizer localization within the lipidic bilayer*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2009. **8**(6): p. 778-87.
8. Khalifat, N., et al., *Membrane Deformation under Local pH Gradient: Mimicking Mitochondrial Cristae Dynamics*. *Biophysical Journal*, 2008. **95**(10): p. 4924-4933.