THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
PARIS 6 – PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité :
Biophysique Moléculaire

présentée par
Stéphanie BONNEAU

pour l'obtention du grade de
docteur de l'Université de Paris 6

DYNAMIQUE D'INTERACTION DE TETRAPYRROLES AVEC DES MEMBRANES ET DES LIPOPROTEINES : CONSEQUENCES SUR LA LOCALISATION CELLULAIRE

Soutenue le ……. devant le jury composé de :

Jean DELETTRE	(président du jury)
Marie-Pierre FONTAINE AUPART	(rapporteur)
Alain CROISY	(rapporteur)
Fabienne MEROLA	(examinateur)
Jacques BOLARD	(examinateur)
Daniel BRAULT	(examinateur)

SOMMAIRE

INTRODUCTION ET PROBLEMATIQUE BIOMEDICALE 1

CHAPITRE 1 : PROPRIETES DE BASE DES SYSTEMES ETUDIES 30

1.1 Les porphyrines dicarboxyliques et la deutéroporphyrine 30

1.2 Les bicouches lipidiques et liposomes 36

1.3 Les lipoprotéines de basse densité 38

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES 41

2.1 Produits 41

2.2 Appareillages et techniques physico-chimiques 43

2.3 Appareils et techniques de biologie cellulaire 46

RESULTATS

CHAPITRE 3 : ASSOCIATION D'UNE PORPHYRINE AVEC LES MEMBRANES 48

Résumé 48

3.1 Généralités 50

3.2 Etats d'ionisation des porphyrines en solution 51

3.3 Incorporation de la porphyrine dans des vésicules lipidiques 59

3.4 Discussion des résultats et du modèle proposé 66

3.5 Conclusion 67

CHAPITRE 4 : INTERACTION DE LA PORPHYRINE AVEC DES LDL 69

Résumé 69

4.1 Généralités 70

4.2 Etude à l'équilibre : quantification de la fixation de la DP aux LDL *73*

4.3 Etude dynamique : cinétiques d'association et de dissociation de la DP aux LDL 83

4.4 Discussion des résultats et du modèle proposé *98*

4.5 Conclusion..... *100*

CHAPITRE 5 : INTERACTION DE LA PHTALOCYANINE D'ALUMINIUM DISULFONEE AVEC DES LDL 46

Résumé *46*

5.1 Généralités *103*

5.2 Etude à l'équilibre de l'interaction $AlPcS_2$-LDL *105*

5.3 Etudes cinétiques de l'interaction $AlPcS_2$-LDL..... *110*

5.4 Discussion *116*

4.5 Conclusion..... *117*

CHAPITRE 6 : MECANISME D'INTERNALISATION CELLULAIRE, INCORPORATION ET LOCALISATION SUBCELLULAIRE 119

Résumé *119*

5.5 Généralités *121*

5.6 Observation microscopiques de l'incorporation dans les cellules..... *123*

5.7 Conclusion..... *132*

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 133

ANNEXE 1 : MODELES CINETIQUES 142

1 Incorporation de la porphyrine dans les liposomes *143*

2 Association des molécules tétrapyrroliques amphiphiles avec les LDL..... *144*

3 Transfert des molécules tétrapyrroliques des LDL vers l'albumine..... *151*

ANNEXE 2 : TRANSFORMEES DE LAPLACE 155

BIBLIOGRAPHIE 157

INTRODUCTION

Toute cellule eucaryote est limitée par la membrane plasmique et divisée en compartiments (volumes aqueux) par un système membranaire interne. Dans chacun se déroulent des activités enzymatiques spécifiques. On trouve ainsi le noyau où sont transcrits et maturés les ARN messagers, le réticulum endoplasmique où les protéines sont synthétisées, l'appareil de Golgi qui exporte les molécules vers les différents compartiments cellulaires, les mitochondries qui permettent la respiration de la cellule, les peroxysomes, les lysosomes, et, dans les cellules chlorophylliennes, les chloroplastes. Cette compartimentation rend possible le fonctionnement intégré de « l'usine cellulaire » (figure *i*.1).

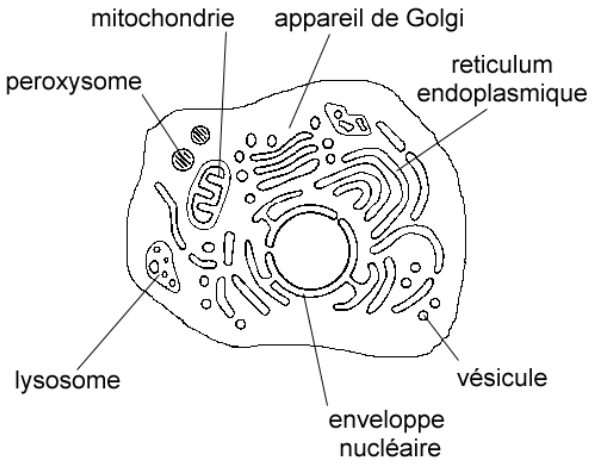


Figure *i*.1 : Représentation schématique d'une cellule eucaryote et de ses différents compartiments cellulaires.

La pénétration d'une molécule dans la cellule, ainsi que sa répartition entre les différentes structures intracellulaires, est en lien étroit d'une part avec sa solubilité dans les compartiments aqueux et, d'autre part, avec sa capacité à traverser les membranes. Pour une molécule hydrophile, sauf lorsque sa petite taille lui permet de diffuser plus ou moins librement au travers des membranes, ces dernières constituent de véritables barrières. La traversée est alors rendue possible par différents processus (diffusion facilitée, transport actif…). Pour une molécule hydrophobe, les membranes sont au contraire une localisation très favorable.

Chez les métazoaires, la problématique se situe dans ce cas également au niveau de l'arrivée jusqu'à la cellule, via les compartiments liquidiens (sang, liquide extracellulaire…). Le plus souvent, lors de leurs déplacements dans l'organisme, les

molécules insolubles sont prises en charge par des transporteurs. Le béta-carotène, par exemple, est transporté dans le sang par les lipoprotéines de basse densité [1]. De telles associations peuvent, évidemment, influencer l'entrée de la molécule dans les cellules. ***C'est dans ce contexte, d'appréhension conjointe du mode de transport et de l'internalisation cellulaire de molécules hydrophobes, que nous avons réalisé l'étude de l'interaction d'une porphyrine avec des modèles de membranes, des lipoprotéines et des cellules.***

Les porphyrines

Les porphyrines sont des pigments rouges, fluorescents, de structure aromatique et tétrapyrrolique [2]. Ce sont des composés d'une extrême importance biologique : ils sont indispensables aux processus d'oxydoréduction qui rendent la vie possible. Une des parties fonctionnellement essentielles de l'hémoglobine est une porphyrine (protoporphyrine IX) combinée au fer. On trouve également ce type de composés dans les cytochromes et les photosystèmes, et nombres de vitamines et cofacteurs appartiennent aussi à cette vaste famille de pigments. Les substituants des carbones β (chaînes latérales) définissent les différentes porphyrines et porphyrinogènes, le suffixe "inogène" indiquant un état réduit des ponts méthènes. Pour donner la protoporphyrine, par exemple, le noyau porphyrique (figure *i*.2) est substitué par : 4 methyl, 2 vinyl, 2 propionyl ; pour la coproporphyrine, les substitutions sont : 4 methyl, 4 propionyl.

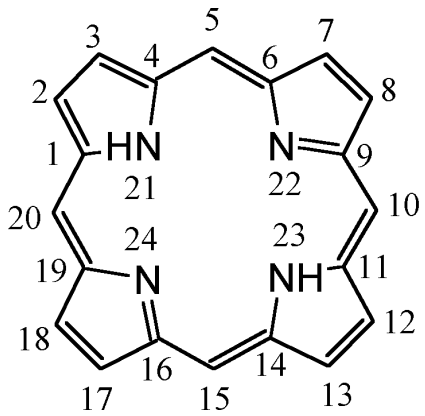


Figure *i*.2 : Noyau porphyrique, avec le schéma de numérotation utilisée pour la nomenclature. Ce noyau est tautomérique en ce qui concerne les deux atomes d'hydrogène non impliqués dans le système conjugué périphérique. Ces deux atomes peuvent s'associer indifféremment à deux des quatre atomes d'azote. Sauf exception, la représentation d'une forme tautomérique n'implique pas l'absence d'un autre tautomère. Cependant, les atomes d'azote saturés occupent, par convention, les positions 21 et 23.

Seuls existent, dans la nature, les isomères I et III de l'uroporphyrine et de la coproporphyrine et l'isomère IX de la protoporphyrine (figure *i*.3).

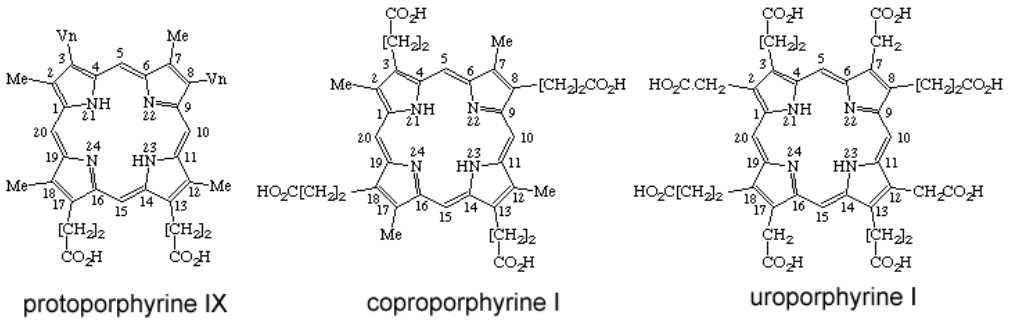


Figure *i*.3 : Structures de porphyrines naturelles. L'isomère IX de la protoporphyrine qui est un intermédiaire métabolique de l'hème, et les isomères I de l'uroporphyrine ainsi que de la coproporphyrine, sont produits par la voie I de la biosynthèse héminique.

La voie de biosynthèse des porphyrines comporte une voie normale, dite voie III, et une voie accessoire où l'uroporphyrinogène III cosynthétase n'intervient pas et qui n'aboutit qu'à des composés éliminés dans les urines et les fèces (figure *i*.4). Remarquons d'ores et déjà que les dernières réactions de cette biosynthèse font intervenir une étape de traversée de la membrane mitochondriale [3]. Des voies métaboliques légèrement différentes produisent l'hème de l'hémoglobine dans la moelle osseuse, la cytohémine des cytochromes dans le foie, et les enzymes à coenzymes héminiques [4]. Comme intermédiaires métaboliques de l'hème, les composés « porphyriques » sont sous leur forme réduite, hormis la protoporphyrine IX. Chez les mammifères, cette dernière est la porphyrine majoritaire. Par ailleurs, la voie I conduit à la formation d'uroporphyrine et de coproporphyrine. Les différents métabolites intermédiaires de la voie de biosynthèse de l'hème sont éliminés sous forme réduite (incolore et non fluorescente) par voie hépatique ou rénale en fonction de leur solubilité relative.

Chez l'homme, les porphyrines naturellement présentes dans l'organisme sont endogènes, essentiellement synthétisées dans le foie et la moelle osseuse. Sous leur forme libre et oxydée, on ne les trouve cependant qu'en très petites quantités (voir tableau *i*.1). Les dérèglements pathologiques peuvent cependant être diagnostiqués par dosage urinaire. L'uroporphyrine, la plus hydrosoluble des porphyrines naturelles, est normalement essentiellement éliminée par les urines. A l'inverse, la protoporphyrine, très hydrophobe, se retrouve dans les selles (48±32 nmol/g de poids sec). La coproporphyrine, de solubilité intermédiaire, emprunte ces deux voies.

Ces données suggèrent fortement que les modes de transport de ces molécules dans un organisme dépendent de leur hydrophobie relative. Dans la circulation sanguine, les porphyrines s'associent, comme tout composé non soluble, aux protéines plasmatiques (albumine, HDL, LDL, VLDL...). Leur répartition entre ces différents transporteurs dépend sans doute là encore de leur solubilité plus ou moins importante [5].

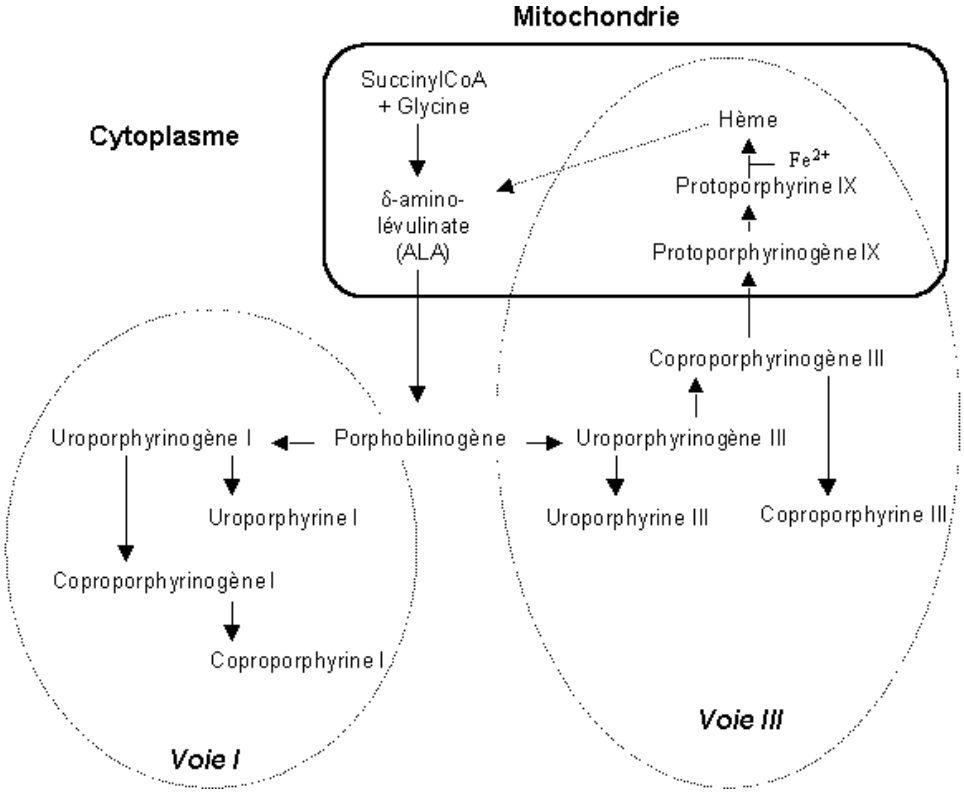


Figure *i*.4 : Schéma de la biosynthèse des porphyrines. La voie III conduit à l'hème, et produit les isomères III de l'uroporphyrine et de la coproporphyrine. La voie I n'aboutit qu'aux isomères I de ces dernières, composés éliminés de l'organisme.

porphyrine	Valeurs sanguines	Valeurs urinaires	Valeurs dans les selles*	Solubilité
Protoporphyrine	764±275 nM	-	48±32 nmol/g	⊖ ↓ ⊕
Coproporphyrine	76,4±20 nM	0,68±0,4 µM	23,7±17 nmol/g	
Uroporphyrine	traces	traces	traces	

Tableau *i*.1 : Résultats normaux, chez un Homme adulte, du dosage des porphyrines dans le sang, les urines et les fèces. Ces valeurs ont été obtenues sur le site http://www.labolamarck.com. (* Dans le cas des porphyrines fécales, les valeurs sont données par gramme de matière sèche).

Les porphyrines sont accumulées, *in vivo*, dans les tissus en croissance. Ce phénomène est connu depuis le début du siècle, Policard ayant remarqué dès 1924 une fluorescence rouge de certaines tumeurs, qu'il attribua à une accumulation porphyrique dans ces structures [6]. L'explication de ce phénomène est cependant encore l'objet de débats. En accord avec de nombreux auteurs, nous avons basé notre travail sur deux hypothèses permettant d'expliquer de façon satisfaisante cette accumulation, l'une en lien avec le *mode de transport spécifique* des porphyrines (1), l'autre en lien avec leur *capacité à franchir les membranes lipidiques* sous certaines conditions physico-chimiques (2) :

(1) Cette accumulation peut en effet se faire via les lipoprotéines de basse densité (LDL), qui sont, comme nous l'avons évoqué, des transporteurs des porphyrines dans l'organisme. Or les tissus en croissance sur-expriment les récepteurs spécifiques des LDL [7]. Dans ce cas, l'entrée de la porphyrine dans la cellule se fait par endocytose spécifique.

(2) Les mécanismes gouvernant cette rétention des porphyrines dans les tissus en croissance sont forcément liés à leur capacité à pénétrer dans les cellules en prolifération. Or, nous l'avons déjà évoqué, l'entrée d'une molécule dans une cellule est en lien étroit avec d'une part sa solubilité dans les milieux extra et intracellulaire, et d'autre part avec son affinité pour les lipides membranaires qu'elle doit traverser. Ces propriétés physico-chimiques de la molécule dépendent fortement des caractéristiques du milieu, notamment son pH. Ainsi, l'augmentation du métabolisme anaérobie du glucose dans la plupart des tissus en hyperprolifération a pour conséquence l'excrétion de lactate dans le milieu extracellulaire qui, la membrane cellulaire constituant une barrière, devient plus acide que le milieu intracellulaire. L'entrée de la porphyrine dans la cellule a lieu, ici, par simple diffusion dans les lipides.

A ce stade, rappelons, au risque d'être redondants, que le mode de transport tout comme l'affinité des porphyrines pour les membranes dépendent, comme nous l'avons vu, de la balance hydrophobie/hydrophilie de la molécule, balance fortement lié à sa structure.

Les LDL et le métabolisme lipidique

L'assimilation des lipides alimentaires par les animaux, tout comme les nombreux et nécessaires échanges de produits du métabolisme lipidique entre différents tissus ou organes, passe par la lymphe et le plasma. Cependant, leur insolubilité exige des formes de transport : en association avec des protéines, ils forment de gros complexes, les lipoprotéines. Dans le sang humain se distinguent quatre classes de lipoprotéines, définies en fonction de leur densité, déterminée par ultracentrifugation de flottation : les chylomicrons (CM), les lipoprotéines de très

faible densité (VLDL), de basse densité (LDL) et de haute densité (HDL). Ces classes de lipoprotéines diffèrent aussi bien par leur taille, leur composition lipidique ou leur(s) apoprotéine(s) que par leur fonction dans le métabolisme lipidique (figure *i*.5).

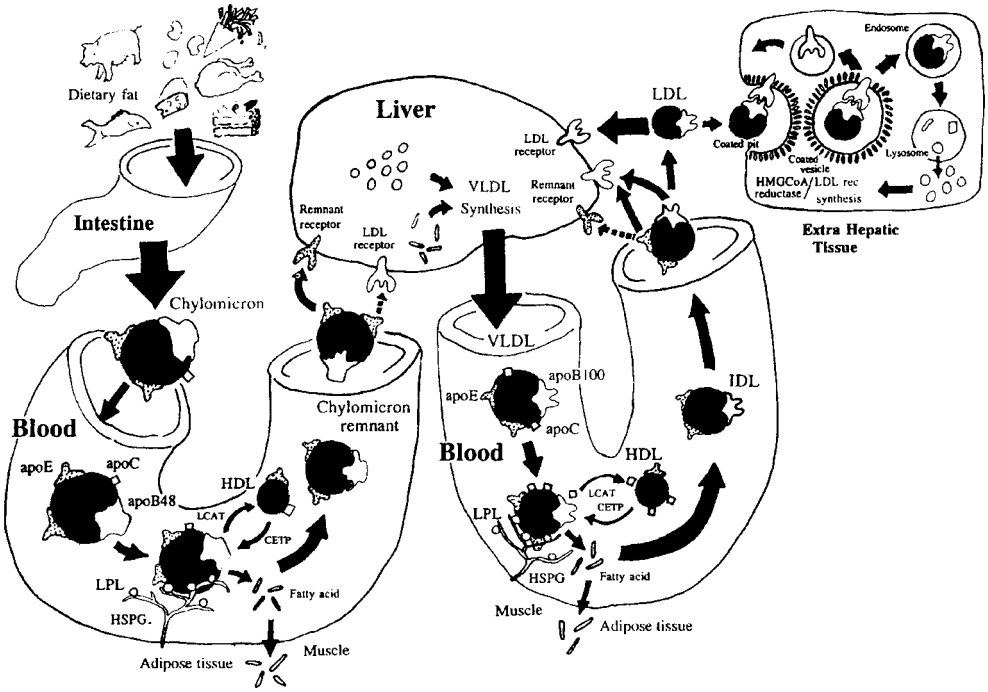


Figure *i*.5 : Représentation schématique du métabolisme des lipoprotéines. Voir le texte ci-dessous. Reproduit de *Rensen and al., Advanced Drug Delivery Reviews 47 (2001) 251-276*. (Abréviations : Apo, apoprotéine ; CETP, protéine de transfert des esters de cholestérol ; HSPG, heparan-sulfate protéoglycanes ; LCAT, lecithine-cholestérol acétyltransférase ; LPL, lipoprotéine lipase ; ○, cholestérol ; □, protéines.)

Les chylomicrons (75-120 nm) redistribuent les lipides alimentaires absorbés au niveau intestinal. Une fois dans le sang, ils sont dégradés activement par un enzyme glycosylé fixé à l'endothélium vasculaire, la lipoprotéine lipase extrahépatique (LPL), libérant ainsi le glycérol et les acides gras pour les tissus périphériques. Dans le même temps, ces particules incorporent certaines apoprotéines, parmi lesquelles l'apoE qui leur est cédée par les HDL. Il en résulte un complexe de petite taille (40-80 nm), qui peut donc traverser l'endothélium fenestré du foie. Ces restes de CM sont incorporés, via des sites de reconnaissance spécifique de l'apoE, par les hépatocytes. En retour, le foie libère des lipides sous forme de VLDL (30-80 nm). De la même façon que les CM, les VLDL sont reconnus par la lipoprotéine lipase. Les VLDL après traitement par cette enzyme sont parfois considérés comme une classe a part entière de lipoprotéines de densité intermédiaire appelées IDL. Ce particules sont en partie récupérés par le foie via, encore, les récepteurs spécifiques de l'apoE. Le reste est intensivement remanié pour aboutir au

produit lipolytique final, les LDL. Ceux-ci sont reconnus, via leurs récepteurs spécifiques, par le foie et par les tissus périphériques. Dans ces mêmes tissus périphériques sont formés, à partir de lipides et de l'apoprotéine AI, les HDL. Ces derniers jouent un rôle majeur dans le transport du cholestérol de ces tissus vers le foie, les LDL assurant le rôle inverse.

Ainsi, lorsqu'une cellule a besoin de cholestérol pour synthétiser sa membrane, elle exprime les récepteurs spécifiques des LDL [8]. Du fait de leur caractère hydrophobe, ces lipoprotéines sont aussi des formes naturelles de transports pour de nombreuses vitamines (par exemple la vitamine E) et des molécules hydrophobes, parmi lesquelles les porphyrines, qui vont donc les « suivre » jusque dans les cellules. Les LDL entrent par endocytose spécifique via les récepteurs « B/E ». Leurs composants sont incorporés dans les lysosomes [9], où les esters de cholestérol sont catabolisés pour être mis à la disposition de la cellule sous forme de cholestérol libre. Ce phénomène constitue l'une des explications avancée pour expliquer l'accumulation des molécules porphyriques, dans les tumeurs [10, 11], et est l'une des hypothèses de travail discutée dans ce manuscrit. En effet, l'intense multiplication des cellules tumorales les conduit à sur-exprimer les récepteurs « B/E » [11] afin de subvenir à leurs besoins en cholestérol. Les LDL, et les porphyrines qu'ils transportent, sont donc incorporés en grande quantité dans ces tissus. Cependant, une fois dans la cellule, la répartition des porphyrines incorporées par cette voie dans les lysosomes ne peut se faire que par diffusion au travers des membranes délimitant les différents compartiments.

Les membranes biologiques : asymétrie et compartimentation

Nous l'avons vu, les membranes constituent des frontières matérielles délimitant la cellule et ses compartiments. Jusque dans les années 50, seule cette fonction de barrière de perméabilité lui été assignée, faute de données précises notamment du point de vue structural. Il fallut attendre la microscopie électronique pour admettre la diversité des fonctions remplies par les membranes, et donc pour supposer l'existence de structures diversifiées, en lien avec la variabilité de composition déjà observée biochimiquement. En effet, si une membrane est toujours constituée de protéines et de lipides (essentiellement des phospholipides), le rapport en poids lipide/protéine varie de 4 pour la myéline à 0,3 pour la membrane interne des mitochondries. Dans les années 70 émerge un modèle consensus, autour de l'idée de l'organisation en bicouche lipidique que les techniques de cryofractures ont permis d'observer. C'est la membrane en *mosaïque fluide* [12], qui introduit l'idée de dynamique membranaire. Ainsi, les déplacements lipidiques transversaux rendent possibles beaucoup des activités des protéines membranaires qui peuvent (ré)agir en chaîne en se déplaçant, s'associant, se dissociant etc… dans la membrane.

Cependant, la diffusion transversale des lipides dans le plan perpendiculaire à la membrane (flip-flop) est un phénomène beaucoup plus lent, ce qui permet une certaine asymétrie entre les deux faces (l'asymétrie protéique est cependant plus nette que l'asymétrie lipidique qui, vraisemblablement, dépend de la spécificité de chaque classe de lipide vis-à-vis des différentes protéines). La conséquence en est une orientation de la membrane qui lui permet d'assurer ses fonctions vectorielles comme le transport, la transduction du signal hormonal… Cette asymétrie résulte de la composition différente des deux compartiments séparés par la membrane et de l'insertion asymétrique de ses constituant lors de sa genèse. Réciproquement, la fonction première d'une membrane biologique est de permettre le maintien de propriétés éventuellement différentes dans chaque compartiment en s'opposant à la libre diffusion des macromolécules, en régulant les échanges et l'étanchéité des espaces « clos ».

Ainsi, dans les tissus hyperproliératifs, souvent mal oxygénés, le lactate produit par métabolisation anaérobie du glucose peut s'accumuler dans le milieu interstitiel séparé du compartiment cellulaire par la barrière membranaire. Comme nous l'avons vu, cela conduit à l'acidification du milieu extracellulaire qui devient plus acide que le cytoplasme. Le pH modifiant l'affinité des porphyrines pour les bicouches lipidiques [13-16], ce gradient de pH entre les compartiments extra et intracellulaires peut favoriser leur pénétration dans les cellules et donc l'accumulation des porphyrines dans les tumeurs [17].

D'autre part, quel que soit la voie d'incorporation cellulaire que ces molécules ont suivi, leur distribution entre les différentes organites pourrait en outre être gouvernée par le même type de processus. En effet, les caractéristiques de chaque compartiment, ainsi d'ailleurs que la composition de la membrane qui le délimite, sont spécifiques. Par exemple, le pH interne des lysosomes est autour de 5 alors que le pH physiologique normal se situe autour de 7,4. Il y a ainsi un gradient de pH entre le compartiment cytoplasmique et le compartiment lysosomial. Le pH de la matrice mitochondriale est, lui, à pH 8, tout comme le stroma des chloroplastes, dont l'espace intrathylacoïde est à pH 5. L'existence de ces gradients influence sans doute la répartition des différentes molécules dans la cellule.

In fine, les membranes biologiques sont des structures d'une très grande complexité et d'une diversité importante. Bien que l'entrée dans les cellules des porphyrines soit évidemment liée à leur hydrophobie, leur affinité pour chaque type membranaire doit vraisemblablement différer. La perméabilité membranaire dépend donc des propriétés de chaque molécule candidate au transport, mais aussi de la composition lipidique et protéique de la membrane et des caractéristiques de chaque compartiment. Si les protéines membranaires sont essentielles aux transports actifs de molécules à travers la membrane, l'entrée passive d'une molécule dans la cellule, éventuellement influencée par les conditions physico-chimiques de chaque

compartiment, se fait via la phase lipidique de la membrane plasmique. Pour s'affranchir des problèmes que la complexité des structures membranaires aurait immanquablement posés, nous avons choisi de travailler, dans un premier temps, sur des modèles membranaires simplifiés, correspondant à la structure membranaire, en bicouche lipidique : des liposomes.

Problèmes biologiques posés

Les porphyrines étant des molécules peu solubles, elles sont transportées dans le sang par les protéines plasmatiques, parmi lesquelles les LDL. Ce mode de transport, lié à l'hydrophobie relative de la molécule transportée, apporte une explication possible à l'accumulation de ces molécules dans les cellules prolifératives. Cependant, l'entrée dans la cellule ne se fait pas forcément par endocytose via les LDL, puisqu'elle pourrait dépendre en partie des caractères physico-chimiques propres de la porphyrine et qu'elle peut être influencée, semble t-il, par le pH. Sachant que la répartition plasmatique des porphyrines et leur affinité pour les membranes dépendent grossièrement, nous l'avons dit, de leur structure ou en tout cas de leur hydrophobie relative, ***quels liens serait-il possible de faire entre mode de transport et mécanismes d'entrée et de répartition dans la cellule ?***

Tradition scientifique et études menées[*]

Au cours des années 1950-60, l'utilisation de méthodes physiques et physico-chimiques pour l'étude de systèmes biologiques a pris forme sous la dénomination de biophysique[**]. Les études présentées dans ce mémoire ont été réalisées dans ce contexte de recherche, en mettant plus particulièrement en œuvre les méthodologies

---

[*] Ce chapitre croise brièvement les analyses et explications de trois articles de *Methods in Enzymology*, vol 278, écrits respectivement par Gregorio Weber, Maurice R. Eftink et Mengsu Yang et David P. Millar, ainsi que des ouvrages *Biophysical Chemistry* de Charles R. Cantor et Paul R. Schimmel et *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy* édité par T. Gregory Dewey. Ces analyses sont parfois complétées grâce aux articles de *Techniques of Organic Chemistry* vol. III, *Rates and Mecanisms of Reactions*, part. II édité en 1963 par S.L. Friess, E.S. Lewis et A. Weiss chez Intersciences Publisher, N.Y., ainsi que par quelques recherches bibliographiques personnelles.

[**] En 1957, est organisée aux Etats-Unis la première Conférence Nationale de Biophysique tenue à Columbus, Ohio, du 4 au 6 mars, conduisant à la fondation, au début de 1958 à Cambridge, de l' « American Biophysic Society ». En France, l'Académie des Sciences crée le Comité National de Biophysique le 7 mars 1966. La Société Française de Biophysique sera, quant à elle, fondée en 1982, et la « European Society » en 1984.

développées autour des propriétés de fluorescence de certains systèmes biologiques. Ces techniques, en effet, sont souvent des outils de choix pour les études biophysiques, notamment pour l'étude des interactions macromolécules-ligand, comme l'a souligné Maurice F. Eftink :

« Fluorescence spectroscopy is the most versatile, sensitive, and convenient method for the characterization of the binding of ligands to macromolecules » [18].

Du fait de sa grande sensibilité, la fluorescence permet en effet de travailler à de très faibles concentrations, et donne donc accès à des constantes caractérisant de très hautes affinités. D'autre part, l'utilisation de méthodes « en solution », comme c'est ici le cas, permet de faire varier les paramètres du milieu comme la force ionique, la température ou le pH.

C'est dans les années 1920-30, avec les développements de la théorie quantique, que la spectroscopie de fluorescence a pris son essor. En effet, les méthodes permettant de déterminer les différents paramètres de l'émission de fluorescence (distribution spectrale, rendement quantique, durée de vie des états excités…) se sont développées au rythme de la compréhension théorique de chacun d'entre eux, ce qui a permit d'aborder des systèmes de plus en plus complexes. Il est remarquable que cette émergence ait eu lieu alors même que les expérimentateurs ne disposaient pas de système vraiment fiable de mesure de la fluorescence. Les premières mesures de rendement de fluorescence [19], ou de durée de vie de fluorescence [20] par exemple, ont été réalisées avec des méthodes qui nécessitent un observateur humain. Outre la sensibilité très relative de cette mesure, il va de soi que la fluorescence ultraviolette des protéines notamment, tout comme celle dans le rouge lointain des porphyrines, ne pouvait pas être détectée. Dans ces conditions, la virtuosité des expérimentateurs est une donnée plus que nécessaire, ce qui permet d'apprécier la précision des mesures (la durée de vie de la fluorescéine et son rendement de fluorescence ont été estimés, dans les articles cités ci-dessus, à 4,5 ± 0,5 nsec et 0,8). Il faut noter, d'ailleurs, que les montages utilisés par ces expérimentateurs sont basés sur les même principes physiques que les appareils modernes, dans lesquels ils sont devenus des « boites noires » qui échappent souvent à l'utilisateur.

Dans les années 1950, l'introduction des compteurs de photons augmente considérablement la fiabilité des mesures de fluorescence, et simplifie donc fortement les procédures expérimentales. Dès lors, la pratique de la spectroscopie de fluorescence se développe. Entre 1950 et 1960, l'intérêt se porte plus particulièrement sur les relations entre les propriétés de fluorescence des molécules et leurs caractéristiques moléculaires et structurales, qui en sont à l'origine. L'idée qui se développe alors est que les interactions entre un fluorophore et son solvant conduisent, par répartition de charges, à des changements des niveaux d'énergie, et donc à un déplacement des spectres d'absorption et d'émission [21-23]. La notion de

« universal red shift » dans les milieux apolaires est associée à la polarisabilité plus importante des niveaux excités d'une molécule par rapport au niveau fondamental.

Les interactions polaires du chromophore n'interviennent pas que dans ses relations avec le solvant. En 1949, Förster avait caractérisé très précisément le FRET (Fluorescence Resonnance Energy Transfer), processus par lequel une molécule donneuse, dans un état excité, transfère son énergie à une molécule acceptrice non excitée par un couplage dipôle-dipôle. L'efficacité du transfert dépend de la distance entre les deux molécules, de leurs propriétés spectrales et de leurs orientations relatives. L'utilisation de ce processus est depuis devenu un classique pour mettre en évidence des relations de proximité dans les systèmes moléculaires en biologie [24-26].

Cette sensibilité de la fluorescence d'une molécule biologique à son environnement est utilisée, *in vitro* et plus récemment *in vivo* [27], pour étudier les interactions moléculaires. Dans le cadre d'une interaction macromolécule-ligand, deux cas de figure se présentent. Il est en effet possible d'observer - il s'agit d'ailleurs là de la méthodologie la plus classique - les changements de fluorescence du ligand. Dans ce cas, les données obtenues sont le plus souvent analysées par des méthodes de type Scatchard ou assimilées [28-32], issues de la physico-chimie américaine des années 1940-50. La seconde possibilité, plus originale et plus récente, se base sur les changements de la fluorescence intrinsèque de la macromolécule (par exemple dans le cas où celle-ci est une protéine). Des méthodes d'analyse alternatives sont développées sur des bases qui restent cependant relativement proches [33-35].

Parallèlement aux développements des techniques spectroscopiques, les physico-chimistes ont mis en place des méthodes permettant d'étudier des réactions de plus en plus rapides. Dans les années 1920, en effet, plusieurs groupes mettent au point des stratégies originales permettant de suivre l'évolution d'un mélange de deux solutions en phase liquide et donc de mesurer la rapidité de la réaction. Avec les méthodes classiques, le délais minimum de mesure est de quelques dizaines de secondes. Le temps de demi-réaction étant fréquemment de l'ordre de la milliseconde, la rapidité de ces phénomènes en solution rend impossible leur étude par ces techniques classiques. Une première réponse appropriée a été proposée en 1923 par l'équipe de J.W. Roughton [36]. C'est le début des *cinétiques rapides*. Le principe de la méthode repose sur le fait que les deux solutions de réactif sont placées dans des récipients séparés puis introduites simultanément dans un tube de mélange. La composition de la solution évolue le long de ce tube, et est déterminée grâce à des capteurs placés à des distances d variables de la zone de convergence des fluides. Plus d est grande, plus la réaction est avancée. Il est ainsi possible, connaissant la vitesse du liquide, de reconstituer son évolution dans le temps. Il est de plus possible

de jouer sur cette vitesse, ou sur le diamètre des tubes utilisés, pour étudier des réactions plus ou moins rapides. D'autre part, l'utilisation d'espaces morts dans le circuit permet de faire le lien avec les mesures sur des échelles de temps longues, par les méthodes classiques [37].

Un peu plus tard, dans les années 1930, un second type de méthodologie a été mis au point : le *stopped-flow*, littéralement flux arrêté [38]. Comme son nom l'indique, cette méthode consiste à subitement arrêter le flux des deux liquides réactionnels et à détecter immédiatement, par exemple par des méthodes optiques, la progression des réactions chimiques dans la cellule d'observation de l'appareil de stopped-flow. Le fonctionnement d'un appareil de stopped-flow est détaillé dans le chapitre « Matériel et méthodes ». Cette méthode permet non seulement d'obtenir un enregistrement permanent au cours de la réaction après un temps court nécessaire au mélange (quelques millisecondes), mais également de s'affranchir des problèmes liés aux turbulences dans la solution du fait de son frottement sur les parois des tubes. Cette méthode permet de plus de travailler avec de très petits volumes.

Les propriétés optiques de certains constituants biologiques étant, comme nous l'avons vu, sensibles à leur environnement, cette méthode est depuis devenue une méthode classique d'étude de réactions biologiques, notamment des interactions macromolécule-ligand. L'analyse des données consiste la plupart du temps à déterminer les constantes de vitesses, i.e. à résoudre les équations de vitesse de réaction. Le modèle de Michaelis-Menten, pour l'étude des réactions enzymatiques, est en la matière un grand classique [39]. D'autres méthodes, plus générales [40], basées sur la linéarité de la représentation de la constante de vitesse expérimentale en fonction de la concentration ($1/\tau = k_a.[R_1+R_2]+k_d$) ont été développées et sont mises en œuvre par exemple dans ce travail.

PROBLEMATIQUE BIOMEDICALE

La photochimiothérapie

L'ensemble des études présentées dans ce manuscrit, abordées selon des concepts biophysiques tant au niveau moléculaire que cellulaire, a été effectué dans le cadre de l'amélioration d'une thérapie anti-cancéreuse : la thérapie photo-dynamique (PDT) ou photochimiothérapie. La PDT est une technique thérapeutique utilisant des médicaments photo-activables et est particulièrement adaptée au traitement de maladies associées à la croissance rapide d'un tissu. Elle constitue donc une approche intéressante dans le traitement de certains cancers. Elle est également utilisée en dermatologie pour traiter les psoriasis et vient de trouver une application en ophtalmologie dans le traitement symptomatique de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).

Principe de la PDT

L'irradiation par la lumière d'un colorant (photosensibilisateur) génère, par l'intermédiaire de l'état triplet du photosensibilisateur, des espèces cytotoxiques comme l'oxygène singulet, forme réactive de l'oxygène, ou des oxyradicaux. La durée de vie de ces espèces moléculaires est très courte, et ces dernières ne peuvent pas diffuser très loin [41]. Ces espèces provoquent, dans une zone limitée à la zone à la fois irradiée et marquée par le photosensibilisateur, des altérations moléculaires irréversibles qui peuvent conduirent à la mort cellulaire [42]. Ce mécanisme d'action de la PDT est traditionnellement décrit à l'aide du diagramme de Jablonsky (figure *P*.1) qui schématise les principaux niveaux d'énergie du photosensibilisateur ainsi que les processus par lesquels il peut passer d'un niveau à un autre.

A l'état fondamental (S_0), les électrons sont appariés et arrangés de façon à minimiser l'énergie. L'absorption d'un photon d'énergie appropriée fait passer un des électrons sur une orbitale d'énergie supérieure, sans changer son spin. La molécule se retrouve alors dans les états excités singulets (S_1, S_2, …). Le plus souvent, les états singulets supérieurs à S_1 sont instables. La molécule redescend donc à son premier état excité singulet par conversion interne (*C.I.*). A partir de cet état, le photosensibilisateur peut subir deux processus particulièrement importants :

- La molécule retourne à l'état fondamental par émission d'un photon. Ce processus est appelé fluorescence, son temps caractéristique pour les porphyrines est de 10^{-9} à 10^{-8} s.

- Le retournement du spin de l'électron excité conduit, par conversion inter-système (*C.I.S.*), à un état excité plus stable, l'état triplet (T_1). La durée de vie de cet état est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} s [43].

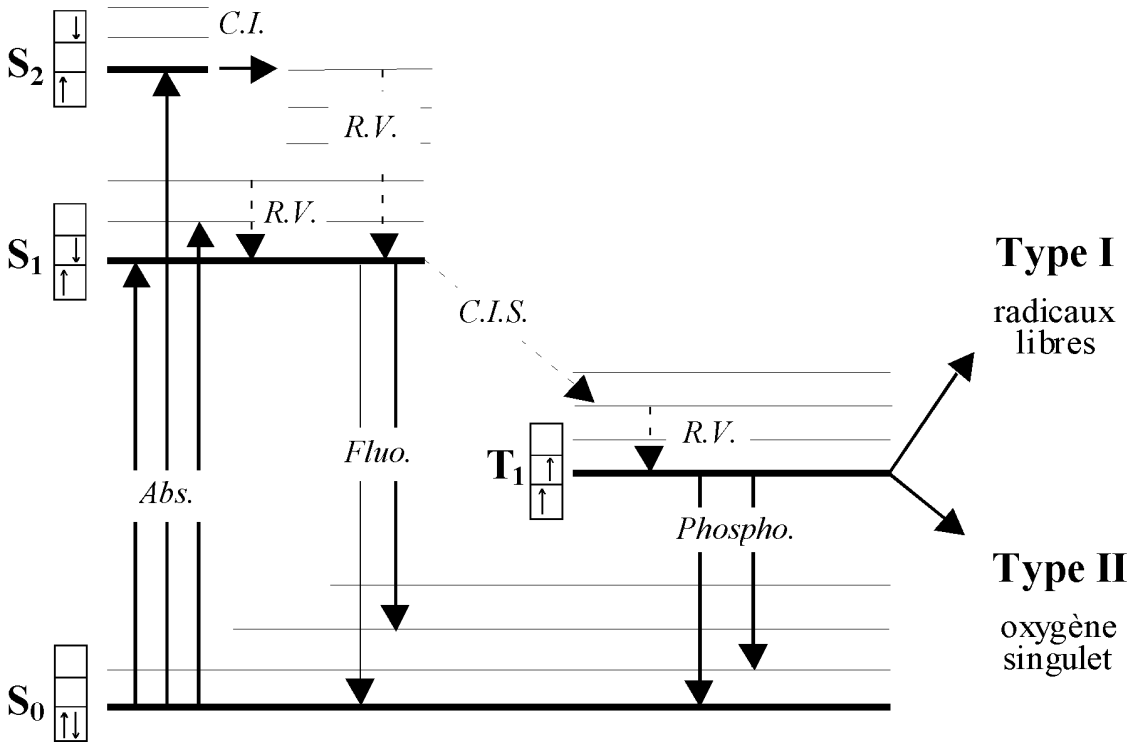


Figure *P.1* : Représentation schématique des niveaux d'énergie d'un photosensibilisateur (Diagramme de Jablonsky) et de la formation des espèces cytotoxiques. Processus représentés : *Abs.*, absorption ; *C.I.*, conversion interne ; *R.V.*, relaxation vibrationnelle ; *Fluo.*, fluorescence ; *C.I.S.*, conversion inter-système ; *Phospho.*, phosphorescence.

C'est cet état triplet qui est à l'origine de la photo-toxicité du colorant. Deux principaux mécanismes d'action peuvent intervenir :

(1) Processus de photosensibilisation de type I : Par transfert d'électron ou d'hydrogène impliquant une molécule avoisinante, l'état triplet peut donner naissance à différentes espèces radicalaires. Les radicaux ainsi formés peuvent réagir avec d'autres molécules et, de proche en proche, induire des réactions d'oxydoréduction en chaîne. L'oxygène est fréquemment impliqué dans ces phénomènes qui peuvent, par exemple, conduire à la peroxydation des lipides membranaires ou conduire à la formation du radical superoxyde, O_2^-.

(2) Processus de photosensibilisation de type II : L'état triplet du photosensibilisateur peut également transférer son énergie à l'oxygène moléculaire, qui a la particularité d'avoir un état fondamental triplet. Le

photosensibilisateur revient alors à son état fondamental S_0, l'oxygène étant porté à un état singulet, $^1O_2$. Cet oxygène singulet est un oxydant puissant. Il est donc létal pour les cellules.

Ces deux types de photosensibilisation coexistent lors des processus de photo-cytotoxicité impliqués dans la PDT. Leur importance relative dépend du colorant, de sa localisation intracellulaire, de la concentration en oxygène. Néanmoins, bien qu'il soit impossible de détecter sa présence dans les tissus à cause de sa très forte réactivité, l'oxygène singulet est généralement considéré comme l'espèce toxique majeure en PDT. Tous les photosensibilisateurs commercialisés ou en phase d'essai clinique ont un taux de production d'$^1O_2$ important.

Les différentes étapes du traitement

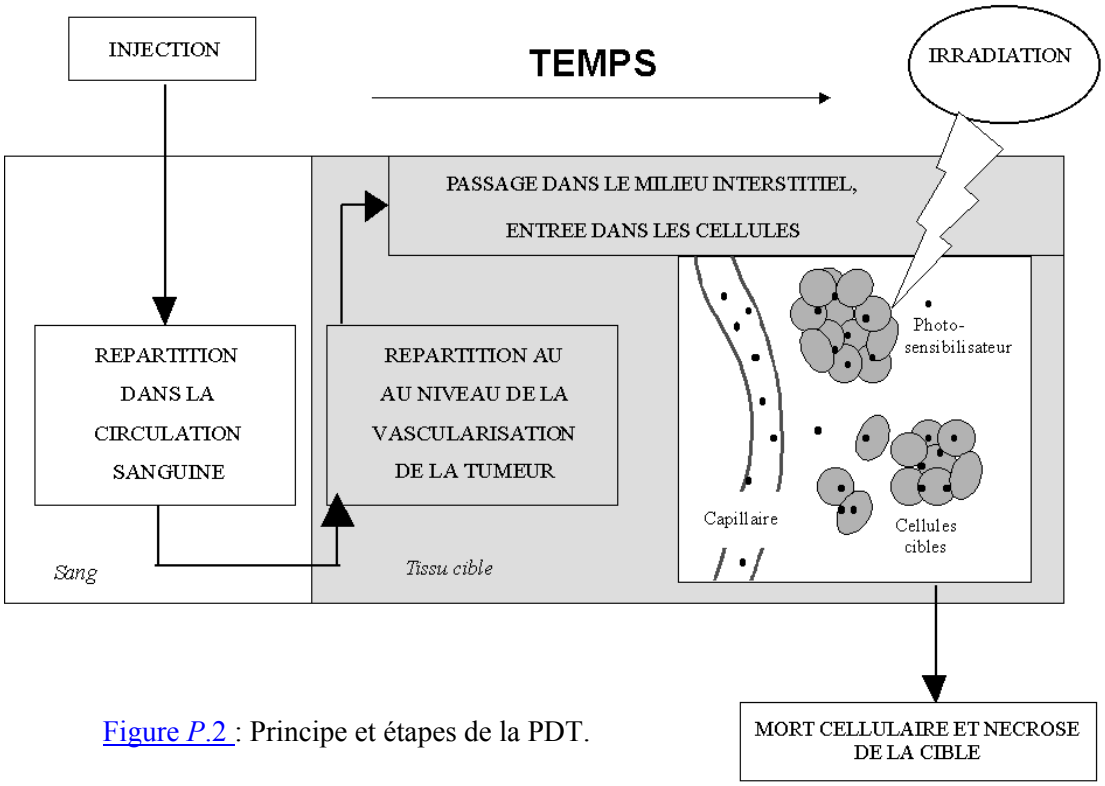


Figure *P*.2 : Principe et étapes de la PDT.

La PDT se déroule en deux temps. D'abord, le photosensibilisant est injecté au patient par voie intraveineuse puis s'accumule dans le tissu hyperproliférative ciblé. Dans un second temps, le tissu est irradié, ce qui conduit à la production des espèces toxiques qui vont conduire à la mort cellulaire (figure *P*.2). Cette irradiation intervient après un délai nécessaire à l'incorporation du colorant dans le tissu néo-plastique. Quel que soit le type de mécanisme engagé dans les processus photo-dynamiques, les espèces toxiques ont une très faible possibilité de diffusion du fait de leur réactivité importante. La sélectivité de la PDT dépend donc de deux facteurs, l'un lié au fait que les dommages se limitent aux structures marquées par le colorant, l'autre lié à la possibilité de définir précisément la zone d'irradiation.

Traitement des cancers

Dès 1903, Tappeiner et Jesionek montrent que l'action combinée de la lumière et de l'éosine conduit à la nécrose de tumeurs cutanées [44], démontrant ainsi l'intérêt thérapeutique de la photosensibilisation induite par de tels produits. Dans les années 20, Policard observe une fluorescence rouge de certaines tumeurs et l'attribue à une accumulation naturelle des porphyrines endogènes dans les tissus tumoraux [6]. A partir de cette observation, les porphyrines deviennent les composés les plus étudiés dans le but d'une application thérapeutique de la photosensibilisation. En 1942, Auler et Branzer injectent une hematoporphyrine à des rats porteurs de greffes de tissus cancéreux et constatent qu'en effet cette molécule est plus concentrée dans la tumeur que dans les tissus sains [45]. Une préparation appelée « hematoporphyrin derivative » devient, dans les années 60, la clé d'une nouvelle méthode de détection des tumeurs : le photodiagnostic. Ce mélange de porphyrines présente une affinité pour les tumeurs plus grande encore que l'hematoporphyrine seule. En 1966, Lipson - qui est à l'origine de la préparation « hematoporphyrin derivative » [46] - remarque, en collaboration avec Gray et Blades, que les tumeurs ainsi marquées se nécrosent sous l'effet de la lumière [47]. Dans le milieu des années 70, ces découvertes donnent lieu aux premières expérimentations sur une nouvelle thérapie des cancers : la photochimiothérapie antitumorale [48-52].

Depuis, des autorisations ont été obtenues dans différents pays pour le traitement des tumeurs des bronches, de l'œsophage ou de la vessie. Le premier produit à avoir été approuvé pour la PDT anti-cancéreuse est Photofrin®, un mélange hétérogène de porphyrines (figure *P*.3).

Ces dernières années, le développement des techniques lasers, de fibres optiques et des systèmes diffusant la lumière a fortement accru le champ d'application de la photochimiothérapie antitumorale en permettant d'atteindre, par endoscopie, des tumeurs internes et de les irradier de façon appropriée à la géométrie de l'organe considéré. A l'heure actuelle, la PDT anti-cancéreuse est un traitement alternatif efficace pour bon nombre de tumeurs localisées [53, 54]. Par rapport aux chimiothérapies conventionnelles, la PDT se caractérise par une absence remarquable de toxicité systémique, mise à par une photosensibilité cutanée rémanente qui pourra sans doute être réduite par l'introduction de nouveaux photosensibilisateurs rapidement éliminés et par un meilleur ciblage de la tumeur, par exemple par une meilleure vectorisation des agents photosensibilisants.

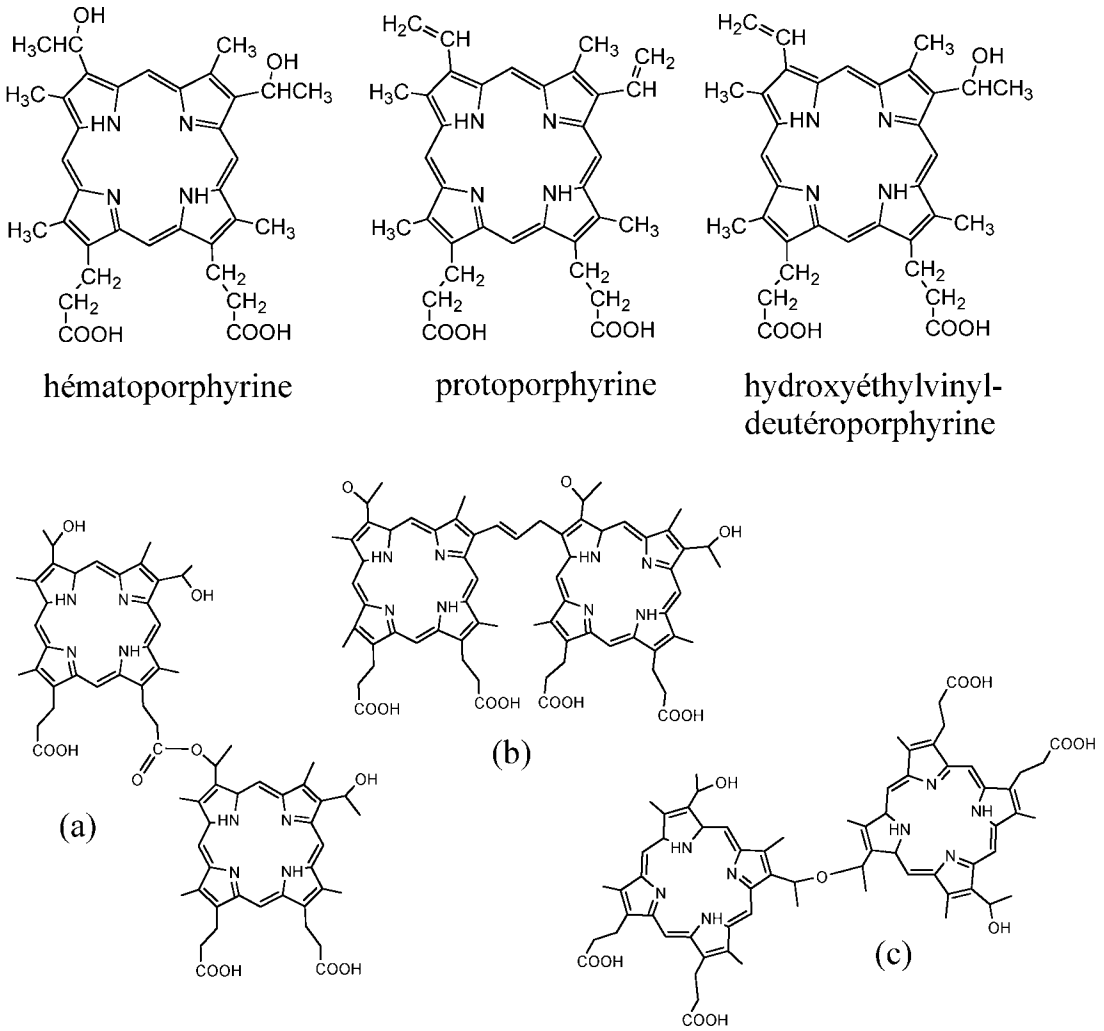


Figure *P.3* : Structure des composants de Photofrin®. Un seul isomère de l'hydroxyéthylvinyldeutéroporphyrine est représenté, l'autre est obtenu par permutation des substituant en position 3 et 8. La préparation contient majoritairement des dimères et des agrégats. La structure de dimères de l'hématoporphyrine est représentée : (a) pont ester, (b) carbone-carbone et (c) éther.

De nouvelles molécules photo-activables appartenant aux familles des chlorines ou des phtalocyanines [55] sont actuellement engagées dans des études pré-cliniques ou cliniques et pourraient recevoir très bientôt une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour leur utilisation en PDT. Absorbant fortement dans le rouge lointain (≈ 660 nm), ces photosensibilisateurs de seconde génération peuvent être excités par une lumière que par les tissus ou le sang atténuent moins que celle utilisée pour le Photofrin®. Ils devraient ainsi permettre de traiter des tumeurs plus volumineuses et/ou fortement vascularisées ou pigmentées.

Traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)

Outre ses nombreuses applications anti-cancéreuses, la PDT vient d'obtenir une AMM pour le traitement des formes humides de la DMLA en France (2000) ainsi que dans de nombreux autres pays, notamment aux Etats Unis.

La dégénérescence maculaire liée à l'âge est la principale cause de dégradation irréversible de la vue chez les personnes âgées. La macula est une zone de la rétine, située au pôle postérieur de l'œil (voir figure *P*.4). C'est dans cette zone que l'acuité visuelle est normalement la plus intense, puisque c'est le lieu de plus forte concentration des cellules sensorielles rétiniennes. De ce fait, la macula a besoin d'un apport constant et important en nutriments. Or, avec l'âge, certains troubles du métabolisme peuvent survenir avec une plus grande fréquence, ce qui peut conduire à une dégradation de la vision pouvant aller jusqu'à une perte de l'acuité visuelle.

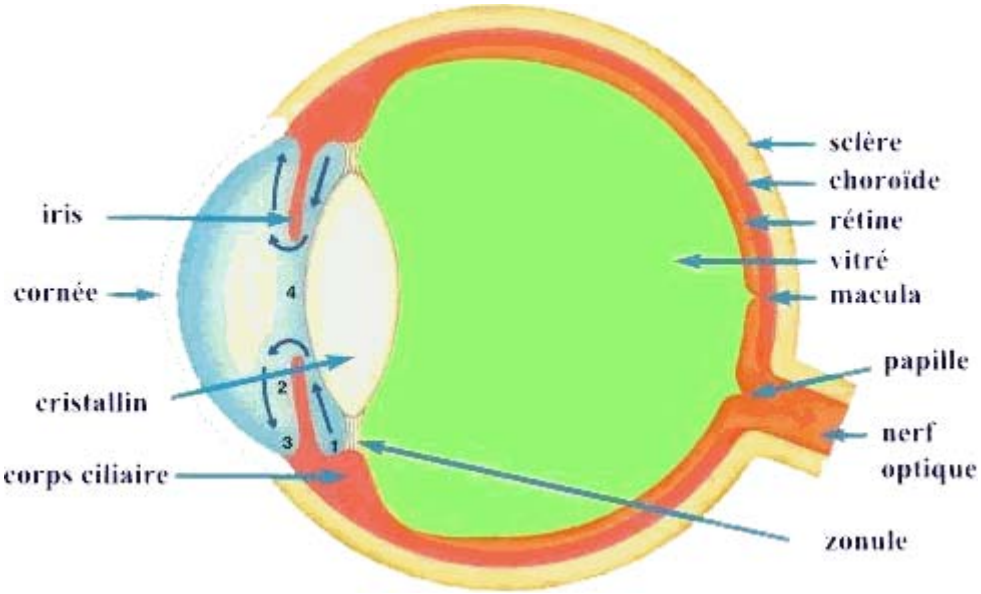


Figure *P*.4 : Schéma d'une coupe transversale d'œil, reproduite du site Internet du Syndicat des Ophtalmologistes de France : http://www.snof.org/comiteglauc/anatphyclg.html

Dans plus de 80% des cas, cette dégradation est lente, et due à l'accumulation de dépôts adipeux (drussen) au fond de l'œil conduisant à des lésions des cellules photosensibles ou des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien adjacent. Ces phénomènes constituent la forme atrophique (ou forme « sèche ») de la DMLA. Les lésions évoluent vers la formation de taches aveugles dans le champ visuel du patient.

Dans quelques 20% des cas, une néo-vascularisation choroïdienne se produit, entraînant des saignements et/ou une accumulation de liquide dans et sous la rétine.

Les cicatrices disciformes qui en résultent provoquent des lésions des cellules rétiniennes et, de fait, des taches aveugles irréversibles. Dans cette forme de la maladie, dite forme néo-vasculaire (ou « humide »), la dégradation de la vue est beaucoup plus rapide. Cette forme de la DMLA peut apparaître dès les premiers signes liés à la maladie, ou être secondaire à la forme « sèche ».

A l'heure actuelle, aucun traitement n'a prouvé son efficacité en terme de prévention de la DMLA. Notamment, il n'existe aucun traitement permettant de prévenir la formation des néo-vaisseaux choroïdiens. La seule solution thérapeutique consiste donc à bloquer leur progression avant qu'ils n'aient atteint la macula. Le seul traitement, reconnu depuis 1983, est la coagulation thermique au laser des zones néo-vascularisées [56, 57]. Ces zones sont d'abord repérées par angiographie par fluorescence (à la fluorescéine ou au vert d'indocyanine, plus sensible [58]). Le traitement par laser conduit, dans la zone traitée, à la coagulation des néo-vaisseaux, mais détruit aussi les cellules visuelles. Il conduit donc à l'apparition d'un scotome définitif. Si la fermeture des vaisseaux a été obtenue, le patient s'adapte et peu à peu le scotome s'efface. Mais si la maladie continue sa progression, le patient verra sa vue diminuer à chaque séance de traitement ! Ce type de traitement pose donc certains problèmes, d'autant que seuls 20% des cas sont accessibles au laser et que les récidives deviennent dans 50% des cas inaccessibles au traitement.

Tout ceci permet d'affirmer la nécessité de trouver de nouvelles formes thérapeutiques. Parmi celles qui donnent des résultats, citons la chirurgie maculaire ainsi que les implants (microchips) rétiniens et la Thérapie Photo-Dynamique.

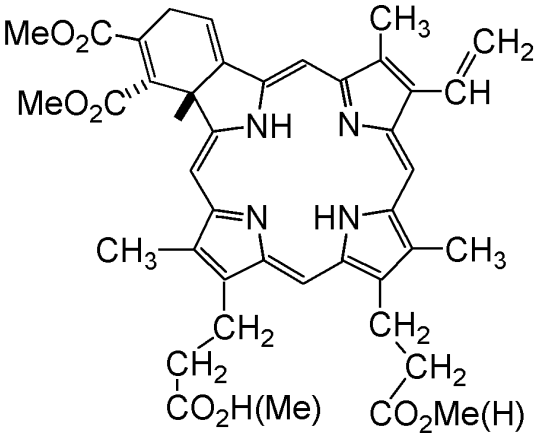


Figure *P*.5 : Structure de l'un des isomères de la benzoporphyrine dérivée monoacide A, connue sous le nom commercial de vertéporfine, composant de la préparation Visudyne®.

La mise en œuvre d'un traitement par PDT de la néo-vascularisation associée à la forme humide de la DMLA se compose des mêmes étapes que pour le traitement des cancers. La molécule injectée, la vertéporfine (figure *P*.5, Visudyne®), présente une forte affinité pour les néo-vaisseaux de la macula et se concentre donc dans ces tissus pathologiques [59]. Le fond de l'œil est irradié quelques secondes par un laser

émettant une couleur rouge (689 nm) qui n'affecte pas les tissus et va activer la vertéporfine [60]. Les altérations physiologiques qui s'en suivent conduisent à la mort cellulaire [61] par une microembolie au niveau de la rétine. Par rapport aux traitements conventionnels, la PDT se caractérise par la « haute définition » de la zone atteinte [62, 63]. Avec ce traitement, une stabilisation de l'acuité visuelle a été obtenue après 12 mois pour 67 % des patients traités, contre seulement 39 % dans le groupe traité avec un placebo [64, 65].

Le ciblage du tissu pathogène par les photosensibilisants

Cibler un tissu ou un organe par un médicament consiste à transporter ce dernier dans l'organisme jusqu'à sa cible et, le plus souvent, à le faire pénétrer dans les cellules. Les procédés mis en œuvre dans ce but consistent, la plupart du temps, à trouver une formulation et un mode de transport. Les problématiques biologiques qui se posent recouvrent donc assez bien celles évoquées dans l'introduction : quels liens peut-on établir entre mode de transport et traversée des membranes ?

Ciblage via le transport par les LDL

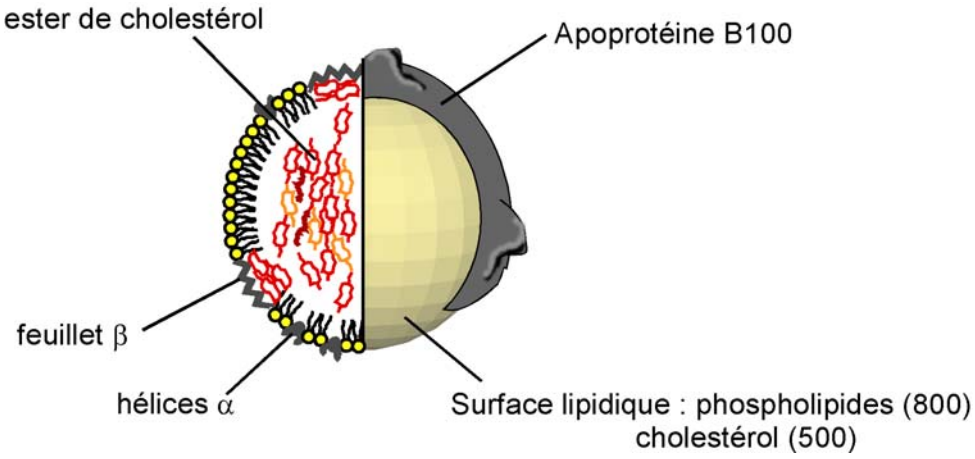


Figure *P*.6 : Représentation schématique d'un LDL et de ses constituants.

Le ciblage des tissus pathogènes est, nous y reviendrons, particulièrement important dans le cadre de la PDT. Cependant, de façon générale, la vectorisation des médicaments par des systèmes de transport exogènes et/ou leur association aux transporteurs endogènes que sont les protéines plasmatiques est un facteur essentiel de leur activité. Comme nous l'avons vu, les LDL (figure *P*.6) sont les transporteurs naturels des molécules hydrophobes comme les carotènes ou la vitamine E. Ils ont depuis quelques années retenu l'attention comme transporteurs endogènes d'agents thérapeutiques hydrophobes (notamment les agents anti-tumoraux, [66, 67]). En

effet, leur rôle physiologique étant le transport du cholestérol du foie vers les tissus, ils libèrent leurs composants et les molécules qu'ils transportent dans les lysosomes.

Les cellules en hyperprolifération, qu'il s'agisse de cellules cancéreuses ou de cellules néo-vasculaires dans le cas de la DMLA, sur-expriment les récepteurs spécifiques des LDL (les récepteurs « B/E »). Les complexes LDL-médicaments, qui constituent une forme intéressante de transport de composés non solubles dans l'eau, sont donc très préférentiellement incorporés dans ces tissus cibles [10]. Ce rôle de transporteur-cibleur des LDL est un facteur important de la sélectivité, de la pharmacocinétique et donc de l'efficacité pharmacologique de certains produits thérapeutiques [68]. Endogènes, les LDL ne provoquent aucune réaction immunitaire, et ne sont pas reconnues par le système réticulo-endothélial. Notons également que, dans l'optique d'une utilisation pharmaceutique à grande échelle, des vecteurs lipidiques synthétiques « LDL-like » sont à l'étude [69].

La structure aromatique des photosensibiliateurs, essentielle à leur activité photosensibilisatrice (cf. figure *P*.1), leur confère également un fort caractère lipophile. Après leur injection, ils se répartissent donc sur l'ensemble des protéines du sérum. En fonction de leur relative hydrophilie, certains vont s'associer à l'albumine ou aux globulines, comme par exemple les phtalocyanines tétrasulfonées alors que les préparations plus hydrophobes ont une affinité importante pour les lipoprotéines [70, 71]. Il semble qu'une fois dans la circulation sanguine, Photofrin®, Visudyne®, mais aussi beaucoup d'autres composés photosensibilisateurs s'associent avec les LDL, ce qui expliquerait leur forte rétention dans le tissu pathogène [72-74]. Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont confirmé le rôle important des récepteurs « B/E » dans l'accumulation des photosensibilisateurs hydrophobes dans les tumeurs ou les cellules endothéliales [75, 76]. Il a par ailleurs été démontré que la fixation de photosensibilisateur par les LDL n'affecte pas les interactions avec leurs récepteurs spécifique [74] et que la distribution des photosensibilisateurs peut être corrélée au nombre relatif de récepteurs dans les différents tissus [73].

Ciblage grâce aux caractéristiques physico-chimiques des différents compartiments

Malgré l'importance accordée aux LDL dans les mécanismes de ciblage des tissus hyperprolifératifs, il ne faut pas oublier que les photosensibilisateurs hydrophobes ou amphiphiles peuvent également entrer dans les cellules directement en diffusant au travers de la membrane plasmique [77-79]. Les caractéristiques du transport de certains de ces colorants semblent même être incompatibles avec la voie d'internalisation par association avec les lipoprotéines [80]. Dans ce cas, la rétention de ces molécules dans les tissus en croissance peut s'expliquer, nous l'avons vu, par l'augmentation du métabolisme anaérobie du glucose dans la grande majorité de tels tissus. Dans les tumeurs, par exemple, le pH du liquide interstitiel est notablement

plus faible que le pH physiologique normal [81]. Il varie entre 6,4 et 7,4, la valeur moyenne se situant autour de 6,9. En revanche, le pH du cytoplasme des cellules néoplastiques est maintenu, comme dans toute cellule, autour de 7,4. Le pH modifiant l'affinité de certains photosensibilisateurs pour les membranes, comme c'est le cas pour les porphyrines (cf. Introduction), ce gradient de pH entre les phases aqueuses extra et intracellulaires pourrait favoriser ainsi leur pénétration dans la cellule [17].

D'autres voies de pénétration dans les cellules sont cependant également possibles, comme par exemple l'endocytose non spécifique dans les cellules tumorales ou endothéliales ou encore la phagocytose dans le cas des macrophages associés aux tumeurs. Mais une fois entrée dans la cellule, la molécule peut se redistribuer parmi les différentes structures cellulaires par diffusion. Cette redistribution pourrait donc dépendre également du pH. En effet, le pH intralysosomial est autour de 5 et le gradient de pH qui en découle peut, semble-il, influencer la sortie des porphyrines vers le cytoplasme.

Dynamique de transport et ciblage des tissus pathogènes dans le cadre de la PDT

Une des caractéristiques de la PDT, qui la distingue encore des thérapies conventionnelles, est le caractère transitoire de la génération d'espèces toxiques produites par l'irradiation lumineuse et la brièveté de cette dernière (figure *P.*7).

L'action du photosensibilisateur étant limitée à la durée de l'irradiation, il est possible de profiter de sa dynamique de transport dans les différents compartiments du tissu pathologique. Il est ainsi théoriquement possible d'affecter essentiellement l'un des compartiments cibles [82]. Ainsi, dans le traitement de la DMLA, le ciblage de la lumière vasculaire, qui serait obtenue pour un délai court entre l'injection et l'irradiation, conduirait à une obstruction et une nécrose par anoxie des néo-vaisseaux. Le ciblage des cellules endothéliales conduit directement à leur atteinte irréversible. Dans le cas de l'utilisation anti-cancéreuse de la PDT, la nécrose de la tumeur est, le plus souvent, obtenue par anoxie en optimisant la brièveté du délai entre l'injection et l'irradiation pour endommager la vascularisation. Le temps écoulé entre l'injection du photosensibilisateur et l'irradiation lumineuse est un facteur important dans l'efficacité et la non-réversibilité du traitement [83, 84]. Cependant, les protocoles cliniques dépendent des photosensibilisateurs utilisés. Le délai est par exemple de 48h dans le cas de Photofrin®, suggérant une action combinée sur la vascularisation et les cellules cancéreuses.

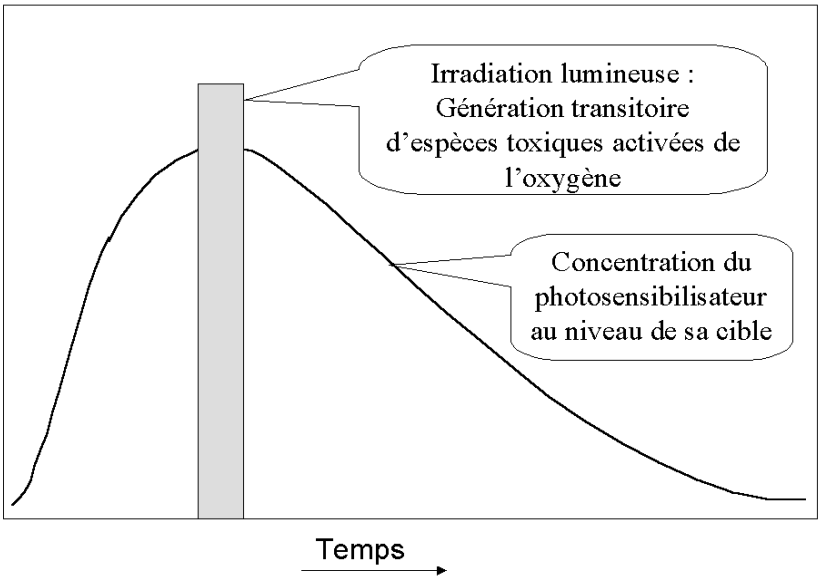


Figure *P.7* : Mode d'action et pharmacocinétique d'un photosensibilisateur.

De plus, les phototoxines produites par l'irradiation ont, comme cela a déjà été dit, une très courte durée de vie et leur action n'affecte donc que les structures sub-cellulaires marquées par le photosensibilisateur. Ainsi la distribution intracellulaire du colorant entre les différents organites va avoir un effet conséquent sur l'efficacité des mécanismes photodynamiques [85] et la nature des processus conduisant à la mort cellulaire (apoptose ou nécrose) [86-88]. L'activité photobiologique ainsi que la localisation intracellulaire des photosensibilisateurs sont liées à leurs paramètres structuraux, en particulier à leur hydrophobie [77, 89]. Rappelons que des observations du même type ont été faites au sujet de l'entrée des porphyrines naturelles dans les cellules, en lien avec leur mode de transport et leur capacité à diffuser, sous certaines conditions physico-chimiques, dans les lipides membranaires (cf. Introduction). Cependant, des changements très fins de la structure peuvent avoir des effets importants sur le comportement, la distribution et l'efficacité des photosensibilisateurs porphyriques [90, 91]. La finesse de ces mécanismes gouvernant en grande partie l'efficacité de la PDT en font un sujet d'étude à la fois complexe et prometteur [55, 92]. Néanmoins, un optimum d'hydrophobie semble exister quant à l'efficacité cytotoxique des porphyrines.

Objectifs du travail

Les mécanismes gouvernant l'efficacité des traitements par PDT doivent être encore affinés. Une connaissance précise des facteurs régissant la distribution des photosensibilisateurs tant au niveau de l'organisme qu'au niveau cellulaire est essentielle d'une part pour optimiser les différentes étapes du traitement, et d'autre part pour rationaliser le « design » de nouvelles molécules et, conjointement, de vecteurs appropriés. Dans ce travail, notre but a été de corréler l'incorporation et la

localisation cellulaire de porphyrines avec leur affinité pour les membranes et les LDL, précisément avec la dynamique de ces interactions. Nous avions donc plusieurs objectifs :

(1) Déterminer les paramètres physico-chimiques des interactions de composés porphyriques avec les membranes et avec les LDL,

(2) Simuler ces phénomènes dynamiques afin de déterminer un modèle mathématique et de les appréhender au mieux les étapes clés du transport au niveau cellulaire,

(3) Etudier l'incorporation cellulaire, en présence et en absence de LDL, des molécules étudiées afin d'établir une corrélation avec les modèles établis.

En effet, l'efficacité des photosensibilisateurs semble fortement liée à leur localisation subcellulaire, qui dépend elle-même de leur structure, notamment de leur hydrophobie [77, 89]. Cependant, de petites modifications de cette structure conduisent parfois à des comportements, des distributions cellulaires et donc à des efficacités très différentes [90, 91]. Notre approche, bien que relativement complexe, semble donc prometteuse [55, 92].

La diffusion à travers les membranes est vraisemblablement l'un des facteurs parmi les plus significatifs gouvernant la distribution des photosensibilisateurs. Le mécanisme de diffusion est généralement décrit grâce à la première loi de Fick [93]. Pour les molécules non chargées, la perméabilité de la membrane dépend d'une manière linéaire du coefficient de partage huile/eau, c.-à-d. de la facilité avec laquelle la molécule pénètre dans la membrane [94]. Pour les porphyrines amphiphiles, des travaux similaires ont donné des résultats très intéressants [95]. Néanmoins, le pH de part et d'autre de la membrane joue, pour certaines porphyrines, un rôle essentiel : gouvernant l'état d'ionisation des chaînes carboxyliques de la porphyrine, il a un effet drastique sur les constantes de vitesse de traversée (flip-flop) de la membrane [96]. De plus, il a été montré que l'affinité de porphyrines dicarboxyliques pour les bicouches lipidiques (en l'occurrence des liposomes) est favorisée à pH externe acide [97]. Des phénomènes similaires sont-ils impliqués dans les processus dynamiques gouvernant l'entrée dans la membrane ? Afin de répondre à cette question, nous avons étudié les effets du pH sur l'association d'une porphyrine dicarboxylique, la deutéroporphyrine, avec des vésicules lipidiques unilaméllaires utilisées comme modèle de la partie lipidique des membranes biologiques. Nous avons volontairement choisi un système d'étude simple, dont tous les paramètres sont facilement contrôlables et qui peut être aisément décrit par un modèle mathématique. De plus, les petites vésicules lipidiques (SUV), utilisées comme modèles de bicouche lipidique, se prêtent particulièrement bien aux expérimentations de mélange rapide, qui implique des contraintes mécaniques relativement fortes.

Un autre facteur important parmi ceux gouvernant le ciblage, la distribution et l'incorporation cellulaire des molécules anti-cancéreuses est leur transport par les LDL. Dans le cadre de l'optimisation de la PDT, la capacité des LDL à fixer certains photosensibilisateurs, ainsi que la fonctionnalité des lipoprotéines après cette fixation, ont été examinées [71, 74, 75]. Cependant, hormis une étude sur les lipoprotéines de lapin [98], aucune donnée n'est disponible sur l'association de porphyrines avec les LDL. Notamment, il n'existe à notre connaissance aucune information sur la dynamique de ces interactions, alors que la rapidité des échanges entre les différents transporteurs potentiels de ces molécules amphiphiles détermine non seulement leur répartition plasmatique après l'injection systémique, mais aussi le mécanisme impliqué dans leur incorporation cellulaire, et donc leur localisation et leur efficacité photodynamique. Nous avons donc étudié l'interaction de la deutéroporphyrine, utilisée comme porphyrine modèle, avec ces lipoprotéines.

Enfin, nous avons étudié les implications de la dynamique de ces interactions sur l'incorporation cellulaire de photosensibilisateurs. Pour cette dernière partie, nous avons choisi de comparer les comportements de deux photosensibilisateurs modèles, choisis pour leur différence de comportement vis à vis des membranes, et ce bien qu'ils aient tous les deux des structures tétrapyrroliques et amphiphiles. La localisation sub-cellulaire de ces molécules a été étudiée par microscopie de fluorescence sur des fibroblastes.

Organisation du manuscrit

Dans le chapitre 1, nous présenterons les principales propriétés structurales et optiques des porphyrines et des LDL, ainsi que quelques caractéristiques des vésicules lipidiques. C'est en effet sur l'ensemble de ces propriétés que sont basées les méthodologies biophysiques mises en œuvre dans ce travail. Le chapitre 2 décrira les techniques utilisées pour la préparation du matériel et pour les mesures. Les chapitres 3 et 4 contiendrons respectivement les résultats expérimentaux permettant de caractériser l'incorporation de la porphyrine dans les membranes (notamment sous l'effet d'un paramètre physico-chimique essentiel, le pH) et son association aux LDL. Les analyses mathématiques théoriques décrivant ces processus sont explicités au cours de l'exposé des résultats. Cependant, pour une plus grande facilité de lecture, ces modèles sont développés en annexe. Ils permettront d'établir des relations entre les paramètres intrinsèques de ces interactions et les cinétiques observées. Dans le chapitre 5, l'interaction des lipoprotéines avec la phtalocyanine d'aluminium disulfonée est décrite et analysée. Enfin, dans le chapitre 6, seront présentés les résultats expérimentaux montrant les implications des résultats énoncés dans les chapitres précédents sur l'incorporation cellulaire et la localisation sub-cellulaire de la porphyrine, en comparaison avec la phtalocyanine d'aluminium disulfonée. Chaque chapitre expérimental sera précédé d'un bref résumé des résultats obtenus, et l'ensemble de ce travail sera l'objet d'une discussion générale dans le dernier chapitre.

Chapitre 1

PROPRIETES DE BASE DES SYSTEMES ETUDIES

Les méthodes d'étude mises en œuvre lors du travail présenté dans ce mémoire reposent sur un certain nombre de propriétés physiques et physico-chimiques des systèmes étudiés. Notamment, notre travail étant centré sur des études spectroscopiques, leurs propriétés optiques sont développées dans ce chapitre pour permettre d'appréhender les résultats et leurs interprétations. De plus, certaines caractéristiques structurales et dynamiques de ces systèmes, susceptibles d'intervenir fortement dans les interactions étudiées, sont développées ici.

1.1 Les porphyrines dicarboxyliques et la deutéro-porphyrine

1.1.1 Structure

La deutéroporphyrine (DP, masse molaire 512 Da) est constituée du noyau porphyrique sur lequel sont greffés, du même côté et en position β, deux groupes carboxyliques (figure 1.1). Selon la nomenclature internationale, il s'agit en fait du « 2,7,12,18 tetramethylporphyrin –13,17 dipropionic acid ». Cette molécule présente un fort caractère amphiphile, avec une répartition asymétrique des zones hydrophobes et polaires. Elle peut être considérée comme l'archétype des porphyrines dicarboxyliques.

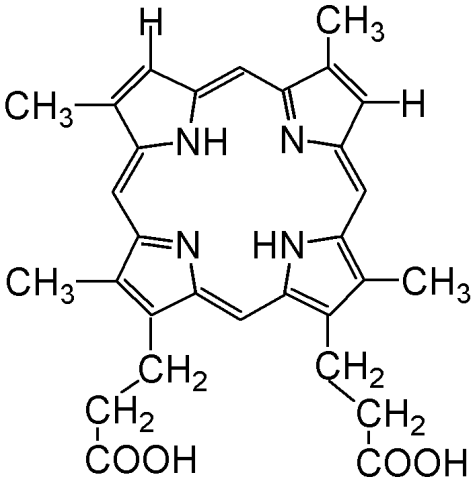


Figure 1.1 : Structure de la deutéroporphyrine, considérée comme archétype de la structure des porphyrines. Cette molécule est ici utilisée en tant que photosensibilisateur modèle.

La deutéroporphyrine peut présenter divers états d'ionisation. En effet, le pH joue sur l'état de protonation des cycles pyrroles et des groupes périphériques. Ainsi,

à pH acide, un ou deux protons peuvent se fixer aux azotes centraux et donner respectivement les formes monocationiques et dicationiques. A contrario, la déprotonation des groupes carboxyliques conduit aux formes monoanionique et dianionique (figure 1.2). Les pK des différents groupes ont été déterminés ([13] et tableau 1.1). Cependant, la précision des valeurs est assez faible, surtout concernant les groupes carboxyliques pour lesquels les phénomènes observés sont vraisemblablement dus en partie à la formation d'agrégats. Une partie de ce travail de thèse a donc consisté en la détermination précise de ces pK, notamment par des mesures dynamiques au stopped-flow. Notons enfin que les azotes pyrroliques ne peuvent se déprotoner qu'à des pH extrêmement forts (pK>16), incompatibles avec les systèmes biologiques que nous étudions.

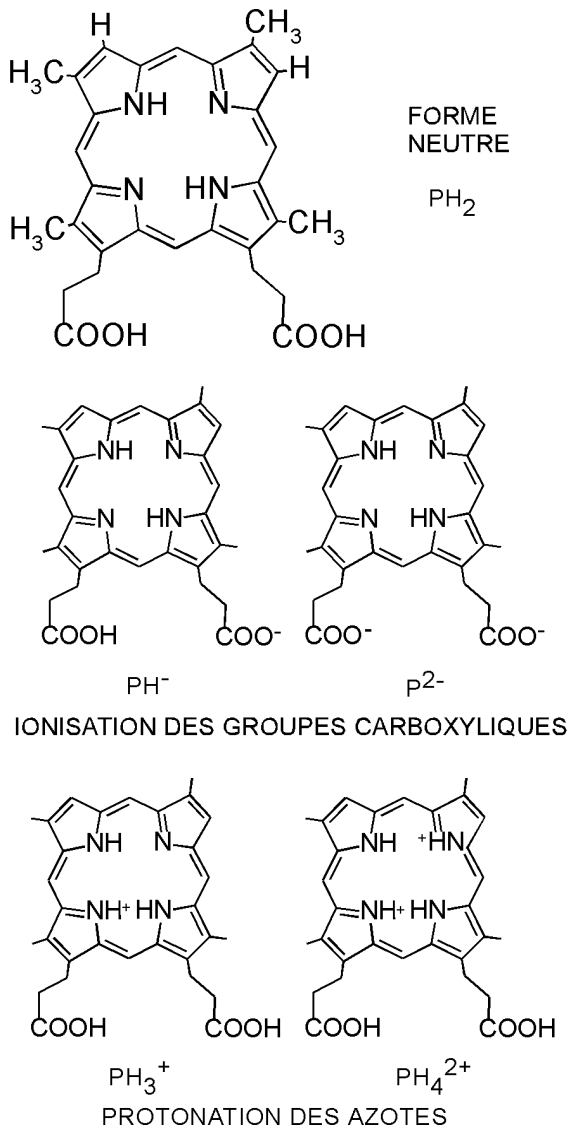


Figure 1.2 : Structure de la deutéroporphyrine dans ses différents états d'ionisation.

deutéroporphyrine		
Groupes carboxyliques	5,4 ± 0,2	6,0 ± 0,2
Azotes centraux	2,7 ± 0,1	4,4 ± 0,1
hématoporphyrine		
Groupes carboxyliques	4,95 ± 0,15	5,45 ± 0,15
Azotes centraux	2,9 ± 0,1	4,7 ± 0,1

Tableau 1.1 : Valeurs des pK de la deutéroporphyrine et de l'hématoporphyrine d'après [13].

Enfin, les solutions aqueuses de porphyrines sont relativement instables. En outre, des phénomènes d'autoassociation des molécules sont responsables de la formation de dimères ou éventuellement d'agrégats à des concentrations en porphyrine plus importantes. Par exemple, la constante de dimérisation de la deutéroporphyrine à 25°C dans du tampon phosphate à pH 7,2 est de $2{,}3\times10^{6}$ M^{-1} [99]. Cette valeur est modifiée par différents facteurs, notamment par le pH, la forme neutre de la molécule étant la plus apte à se dimériser. Dans les solvants organiques, les porphyrines sont, par contre, toujours sous forme monomérique.

1.1.2 Propriétés optiques

La conjugaison du macrocycle des porphyrines laisse prévoir une forte absorption de la lumière dans le domaine proche ultraviolet et visible. Le spectre d'absorption présente de fait une bande autour de 400 nm, dite bande de Soret, qui correspond à la transition de l'état électronique fondamental au second état électronique singulet ($S_0 \rightarrow S_2$). La transition $S_0 \rightarrow S_1$ conduit à une série de bandes dans le rouge (500 à 600 nm) appelées bandes Q. Le spectre correspondant est donné, pour une solution de deutéroporphyrine dans un solvant organique (THF), figure 1.3. Cependant, la forme de ce spectre peut varier de façon très significative lorsque la molécule est en solution aqueuse : à de fortes concentrations, la bande de Soret peut subir une translation de quelques dizaines de nanomètres vers le bleu, accompagnée d'une diminution du coefficient d'extinction (figure 1.4). Ces modifications s'expliquent par la formation de dimères.

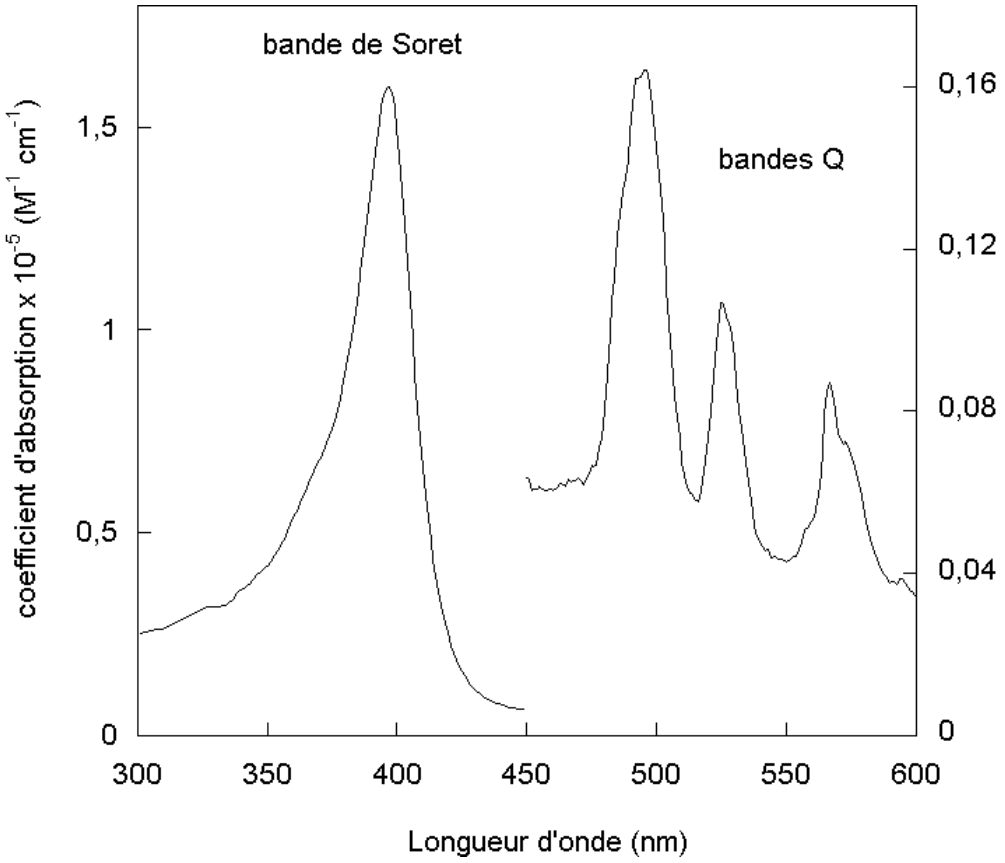


Figure 1.3 : Spectre d'absorption de la deutéroporphyrine dans du tétrahydrofurane.

Pour de faibles concentrations en porphyrine, (inférieures à 10^{-7} M), le spectre d'absorption est superposable au spectre d'excitation de fluorescence. Ce spectre est très sensible à l'environnement de la porphyrine. Lorsque la molécule est associée aux protéines plasmatiques, aux lipoprotéines ou incorporée dans des vésicules lipidiques, la bande de Soret est décalée vers le rouge. En effet, plus la molécule se trouve dans un environnement hydrophobe, plus le « red shift » est important. Les bandes Q sont elles aussi modifiées par ces changements d'environnement. Un exemple de spectre d'excitation dans différents environnements est donné chapitre 4 (figure 4.2).

Tout comme le spectre d'absorption, le spectre d'émission de fluorescence est sensible à l'environnement. La bande principale se décale d'une dizaine de nanomètres vers le rouge lorsque la porphyrine est incorporée dans des vésicules lipidiques ou associée à des protéines du sérum ou à des lipoprotéines, comme cela sera montré ultérieurement (figure 4.3).

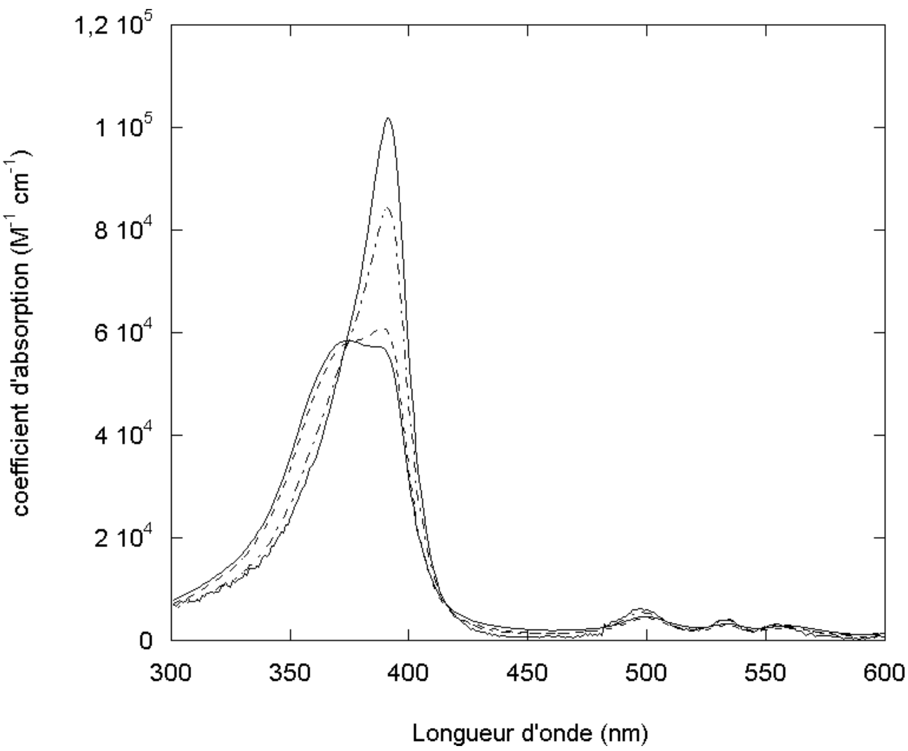


Figure 1.4 : Spectres d'absorption de la deutéroporphyrine dans du tampon phosphate pH 7,5. La proportion de dimères dans la solution varie en fonction de la concentration en porphyrine :

(—) 10^{-7} M, (-·-·-·-·-·) 5×10^{-7} M, (- - - -) 10^{-6} M et (—) $1,5\times10^{-6}$ M.

Enfin, les spectres d'absorption et d'émission sont également modifiés par le pH. Ainsi, à pH acide, une bande d'absorption apparaît autour de 400 nm, ainsi qu'un pic de fluorescence à 592 nm [13]. Les formes mono et dicationiques ont en effet des propriétés optiques sensiblement différentes de la forme neutre. La figure 1.5 montre quelques exemples, à divers pH, de l'émission de la deutéroporphyrine en solution aqueuse. Autour de pH 5, la porphyrine existe essentiellement sous sa forme neutre favorisant l'autoassociation. Les dimères et agrégats n'étant pas fluorescents, l'intensité de l'émission de fluorescence est sensiblement plus faible dans cette zone. Le spectre d'émission de fluorescence à pH 4,7 présente des bandes caractéristiques à 592, 610, 650 et 670 nm. A pH plus acide, l'intensité de fluorescence à 592 et 650 nm est exaltée. Ces modifications signent la protonation successive des azotes centraux des molécules de porphyrines. Au contraire, à pH plus basique, ce sont les pics à 610 et 670 nm qui prennent de l'importance, correspondant à la prédominance de la forme dianionique monomérique de la molécule.

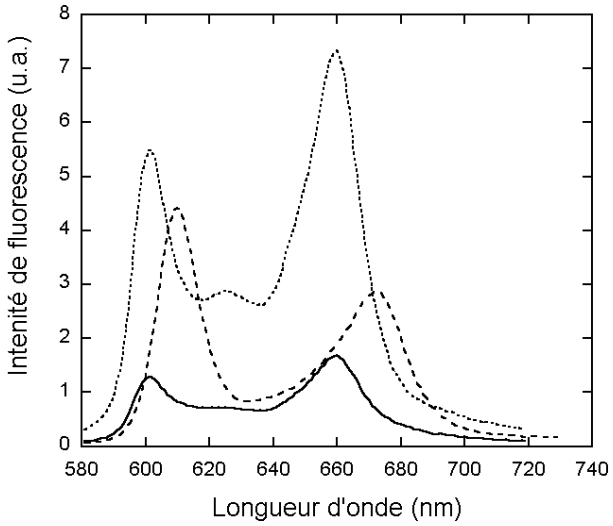


Figure 1.5 : Spectres d'émission de fluorescence de la deutéroporphyrine ($3{,}6\times10^{-7}$ M) en solution aqueuse (PBS) à pH :

8,4 (- - -)

4,7 (——)

2,4 (·····)

Excitation : 395 nm

1.1.3 Phtalocyanine d'aluminium disulfonée

La phtalocyanine d'aluminium disulfonée ($AlPcS_2$, masse molaire 779 Da, figure 1.6) a été utilisée, en comparaison avec la deutéroporphyrine, comme modèle de référence lors des expériences d'incorporation cellulaire. Cette molécule photosensibilisatrice n'est pourtant pas une porphyrine. Elle est cependant constituée d'un noyau tétrapyrrolique et est, elle aussi, amphiphile avec une asymétrie de répartition des zones polaires et hydrophobes. Sa vitesse de traversée membranaire est extrêmement lente [100], ce qui fait d'elle la « molécule contrôle » idéale dans des expériences visant à corréler les paramètres cinétiques des interactions étudiées avec l'incorporation et la localisation cellulaire du colorant. De plus, les propriétés spectrales de la $AlPcS_2$ sont, elles aussi, influencées par l'environnement de la molécule [100].

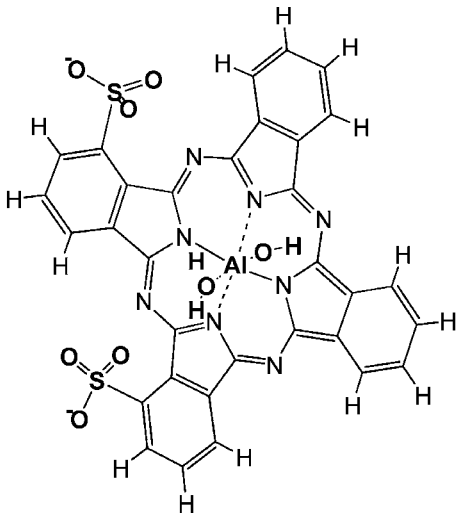


Figure 1.6 : Structure de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée. Cette molécule est utilisée comme modèle de référence par rapport à la deutéroporphyrine dans les expériences de microscopie.

1.2 Les bicouches lipidiques et liposomes

Les principales propriétés des lipides et des vésicules lipidiques sont aujourd'hui bien connues et ont été l'objet de nombreuses publications comme [93] et [101] par exemple.

1.2.1 Propriétés physico-chimiques des phospholipides

Les phospholipides dérivent du glycérol par estérification des groupements hydroxyles en position 1 et 2. Ce sont des molécules amphiphiles constituées d'une tête polaire et de chaînes aliphatiques hydrophobes (figure 1.7). Les plus abondants ont des chaînes hydrocarbonées ayant un nombre pair de carbones compris entre 14 et 22. Parmi les phospholipides des membranes plasmiques, les phosphatidylcholines sont prépondérantes.

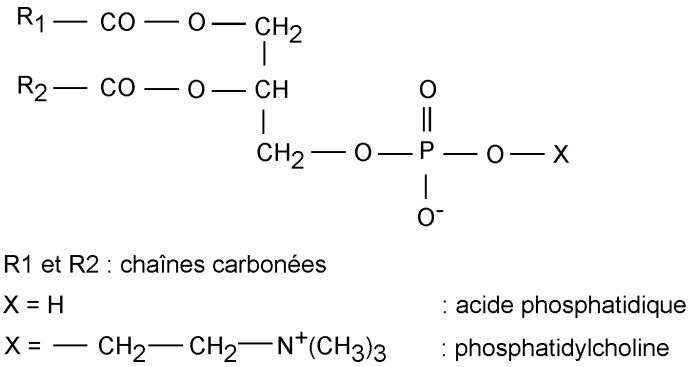


Figure 1.7 : Formule chimique générale des phospholipides, et notamment des phosphatidylcholines.

La partie apolaire de ces molécules limite fortement leur solubilité dans l'eau. Au-delà de concentrations de l'ordre de 10^{-10} M, les phospholipides ne se solubilisent plus sous forme de monomères. Les molécules en excès s'associent de façon à minimiser les contacts de leurs chaînes hydrophobes avec l'eau. Le type de structure adoptée dépend des tailles relatives des parties polaires et apolaires. Principalement, les phospholipides se structurent en bicouche sous forme de vésicules, parties apolaires en contact à l'intérieur de la bicouche où l'eau n'a pas accès, et parties polaires réparties de part et d'autre de la bicouche, en contact avec le milieu aqueux (figure 1.8). Cette structuration spontanée des phospholipides est à l'origine des membranes biologiques.

1.2.2 Les vésicules lipidiques

Les propriétés des bicouches lipidiques sont fortement influencées par la température. Plusieurs transitions de phases sont observées au cours des variations de température. La plus importante, appelée « fusion des chaînes », correspond à la transition, à une température Tc, de la phase « gel » à la phase « cristal liquide ».

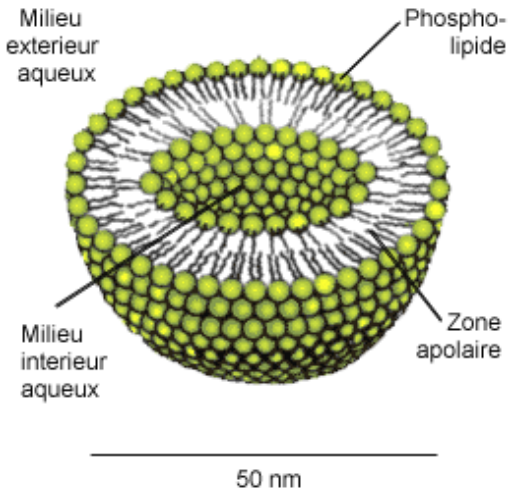


Figure 1.8 : Représentation d'un petit liposome (i.e. vésicule lipidique) unilamellaire (SUV, small unilamellar vesicle).

La phase gel, au-dessous de Tc, correspond à une disposition ordonnée des chaînes en conformation *trans*. Entre elles, des interactions de van der Waals maintiennent un empilement maximum, limitant les mouvements moléculaires à des vibrations et des mouvements de basses fréquences. Au-dessus de Tc, les lipides sont en phase cristal liquide où les mouvements des chaînes aliphatiques sont beaucoup plus rapides et de plus grande amplitude. De nombreuses conformations *gauche* apparaissent. Les molécules lipidiques peuvent aussi se déplacer dans la bicouche par des mouvements de rotation autour de leur grand axe et de diffusion latérale. Les coefficients de diffusions expérimentaux sont de l'ordre de 10^{-12} m^2/s [102]. La fréquence d'échange est donc de 10^7 par seconde [93]. Les lipides peuvent également passer d'un feuillet à l'autre de la bicouche. Ce mouvement, appelé flip-flop, nécessite que la tête polaire du lipide passe par la partie hydrophobe de la bicouche. Son temps caractéristique est généralement de plusieurs heures, voire de plusieurs jours. Cette mobilité transversale limitée participe du maintien, dans les membranes biologiques, de l'asymétrie des constituants membranaires. Tous ces mouvements peuvent êtres mis en évidence en utilisant des sondes lipidiques fluorescences comme le 1-oeoyl-2-[12-[(7-nitro-1,2,3- benzoxadiazol-4-yl) amino] dodecanoyl] phosphatidylcholine (NBD-PC) [103].

Les vésicules sont classées en fonction de leur taille et du nombre de compartiments qu'elles comportent. Les vésicules multilamellaires (MLV) présentent plusieurs compartiments aqueux concentriques et peuvent mesurer jusqu'à 1 à 2µm de diamètre. Ces MLV peuvent être obtenues très facilement, par dispersion dans une solution tamponnée. Les grosses vésicules unilamellaires (LUV) sont constituées d'une seule bicouche lipidique et d'un seul compartiment aqueux et mesurent 0,1 à 1µm de diamètre. Les SUV, petites vésicules monolamellaires, que nous avons utilisées pour ce travail, ont un diamètre de 25 à 50 nm. Ces vésicules peuvent être préparées selon différentes méthodes (sonication, évaporation d'une

solution éthanolique, évaporation en phase inverse ou, comme ce fut notre cas, par extrusion, voir chapitre « Matériel et méthodes »).

1.2.3 Les transports membranaires

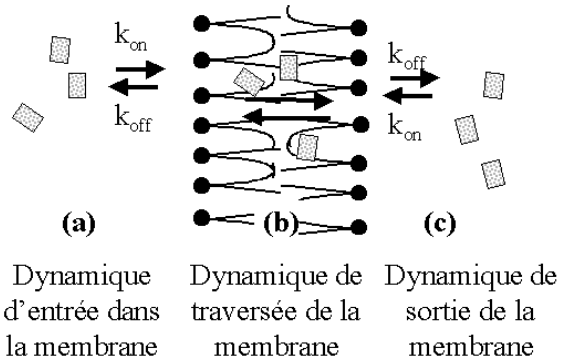


Figure 1.9 : Modèle d'interaction d'une molécule avec une bicouche lipidique, voir le texte pour les explications dynamiques. L'entrée dans la bicouche, ainsi que la sortie (du même côté ou de l'autre), sont gouvernées par les paramètres cinétiques k_{on} et k_{off}.

En fonction de la taille, de la nature et des propriétés de la molécule, chacune des étapes peut devenir limitante. Le sens du déplacement peut être influencé par les conditions de part et d'autre de la membrane.

Les vésicules lipidiques sont utilisées comme modèles de la partie lipidique des membranes biologiques pour étudier les propriétés membranaires, les fonctions des protéines membranaires et les interactions molécules-membranes. *In vivo*, le passage membranaire d'une molécule peut se faire, nous l'avons vu, par diffusion passive, diffusion facilité, transport actif ou endocytose. Dans le cas d'une vésicule qui ne contient ni transporteurs ni pompes à protons, seuls les phénomènes de diffusion peuvent être observés. Trois étapes décrivent le processus (figure 1.9) : l'entrée dans la phase lipidique (a), la traversée de la zone apolaire (b) et enfin la sortie de la membrane (c). Selon la nature de la molécule et les conditions physico-chimiques du système, chacune de ces étapes peut devenir limitante. Dans le cas des porphyrines amphiphiles carboxyliques, la traversée du cœur lipidique (b) peut être facilitée, dans un sens donné, par un gradient de pH entre les deux compartiments aqueux délimités par la bicouche. Le franchissement des interfaces pourra être caractérisé par les constantes cinétiques d'entrée (k_{on}) et de sortie (k_{off}).

1.3 Les lipoprotéines de basse densité

1.3.1 Structure

Les LDL sont de grosses particules d'environ 2 500 000 Da constituées de phospholipides, de cholestérol (éventuellement sous forme estérifiée), de triglycérides et d'une apoprotéine B100 qui comporte, entre autre, 37 tryptophanes et 151 tyrosines [104]. Un modèle consensus a récemment été proposé [105] : une

monocouche de phospholipides et de cholestérol entoure un noyau de lipide constitué de triglycérides et d'esters de cholestérol. L'apoprotéine, organisée autour de la particule, est constituée par une alternance de feuillets β et d'hélices α (NH_3-$\beta\alpha_1$-α_2-β_2-α_3-COOH). Les feuillets forment des ponts avec des lipides associés de façon irréversible, impliquant probablement du cholestérol en phase smectique*. Les hélices α sont associées aux phospholipides extérieurs. Hormis le domaine globulaire N-terminal, homologue à la lipovitelline, la majeure partie de l'apoprotéine se situe dans un environnement hydrophobe. Bien que la forme exacte des LDL soit encore discutée, ils sont le plus souvent considérés comme des particules sphériques de 22 nm de diamètre [105, 106]. Il faut cependant noter que des observations par microscopie cryoélectronique ont suggéré une forme plutôt discoïdale, d'un diamètre d'environ 215 Å et d'une épaisseur de 120 Å, voir même ellipsoïde (250 Å × 210 Å × 175 Å) [107, 108]. Une tentative de représentation a déjà été donnée en figure *P*.6.

1.3.2 Propriétés spectrales

En les excitant à 280 nm, les LDL fluorescent. Leur spectre d'émission de fluorescence intrinsèque présente une bande autour de 330 nm, due aux résidus tyrosine et tryptophane (figure 1.10). A pH neutre, les maximums d'absorption de ces résidus sont respectivement d'environ 275 nm et 280 nm. Ils sont donc généralement excités simultanément. Cependant, le maximum d'émission des tyrosines se trouvant à 305 nm, leur énergie de fluorescence est transmise aux tryptophanes. C'est donc l'émission de fluorescence des tryptophanes qui est observée. Cette dernière est très sensible à la nature de l'environnement. Dans l'eau, le maximum d'émission est à 350 nm. Dans l'éthanol, la bande se décale vers 340 nm et, dans un solvant totalement apolaire comme le dioxanne, elle est à 325 nm. Ce shift s'accompagne d'une exaltation de fluorescence, le rendement étant de 0,14 dans l'eau, de 0,2 dans l'éthanol et de 0,3 dans le dioxanne. Les tryptophanes des LDL ont un maximum d'émission autour de 330 nm. Ils sont donc dans un environnement hydrophobe. Comme nous venons de le mentionner, l'apoprotéine se trouve en effet directement en contact avec la surface lipidique de ces particules [105]. D'ores et déjà, nous pouvons remarquer que la longueur d'onde d'émission des LDL est proche du maximum d'absorption des porphyrines. Dans des conditions de proximité et d'orientation favorables, un transfert de la fluorescence des LDL vers la porphyrine devrait donc être possible, permettant de mettre en évidence l'interaction du fluorophore avec (ou à proximité de) l'apoprotéine.

* Empilement périodique de couches moléculaires fluides, en phase cristal liquide.

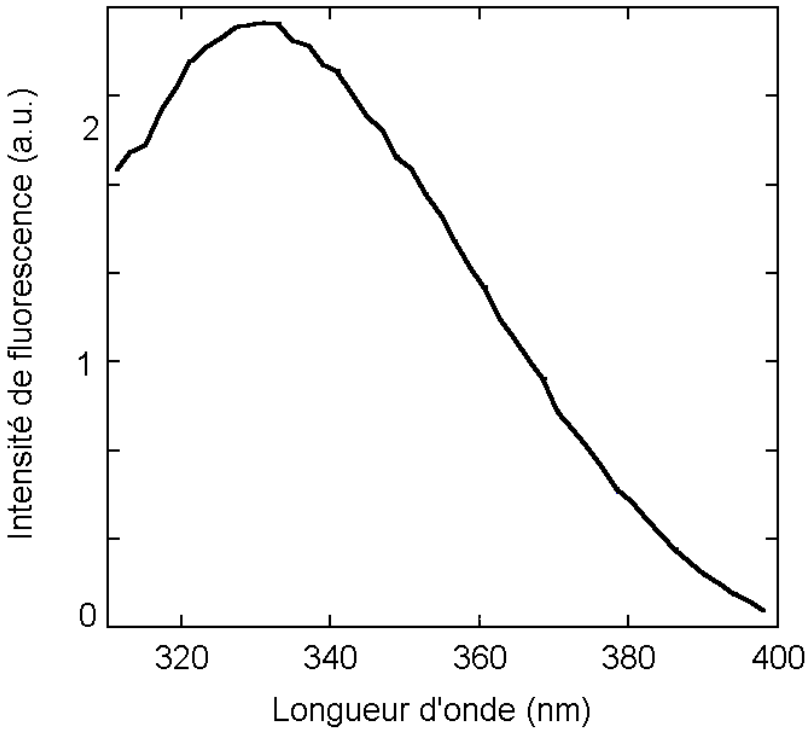


Figure 1.10 : Spectre d'émission de fluorescence des LDL (excitation à 280 nm).

Chapitre 2

MATERIEL ET METHODES

2.1 Produits

2.1.1 Solvants, tampons

Du tetrahydrofurane a été utilisé pour solubiliser la deutéroporphyrine. Il a été distillé sur hydroquinone et l'absence de peroxydes a été contrôlée avant utilisation.

La plupart des expériences de physico-chimie ont été effectuées à pH 7,4 dans du tampon phosphate salin (PBS, Na2HPO4/KH2PO4, phosphate total $9{,}57\times10^{-3}$ M, NaCl 0,15 M et KCl $2{,}68\times10^{-3}$ M), hormis celles visant à déterminer le rôle du pH. Celui-ci a alors été ajusté à des valeurs comprises entre 2 et 9,5.

Les incubations des cellules ont été faites dans du tampon Hanks Hepès (HBBS, $CaCl_2/2H_2O$ 0,185 gL^{-1} ; KCl 0,4 gL^{-1} ; KH_2PO_4 0,6 gL^{-1} ; $MgCl_2$ $6H_2O$ 0,1 gL^{-1} ; $MgSO_4$ $7H_2O$ 0,1 gL^{-1} ; NaCl 8 gL^{-1} ; $NaHCO_3$ 0,35 gL^{-1} ; Na_2HPO_4 0,048 gL^{-1} ; glucose 1 gL^{-1} ; Hepès 5‰ ; pH 7,4).

2.1.2 Porphyrine et phtalocyanine

La deuteroporphyrine, dont la structure est donnée figure 1.1 (masse molaire 512 Da), a été préparée selon le protocole décrit précédemment [13]. Sa pureté, déterminée par HPLC, est supérieure à 99%. Une solution stock (10^{-3} M) a été préparée dans du tétrahydrofurane distillé et conservée à -18°C. Les solutions expérimentales ont été obtenues en évaporant un aliquot de la solution stock de façon à faire un film sur la paroi du récipient. Ce film a ensuite été dissout dans du PBS. Ces solutions ont été employées sans tarder et ont été fréquemment renouvelées afin de minimiser les phénomènes dus à l'agrégation de la porphyrine et à son adsorption sur le verre. De plus, afin d'éviter tout photoblanchiment, les solutions de porphyrine ont été manipulées à l'obscurité.

La phtalocyanine d'aluminium disulfonée ($AlPcS_2$, masse molaire 779 Da, voir figure 1.6) a été préparée par l'équipe de D. Phillips [109, 110]. L'isomère *cis* a été isolé par HPLC en phase reverse. Les solutions stock sont préparées dans de l'eau bidistillée et conservées à -18°C. Les concentrations sont déterminées par absorption, le coefficient d'extinction molaire à 672 nm étant de $1{,}15\times10^{5}$ $M^{-1}cm^{-1}$.

2.1.3 Lipoprotéines

Les lipoprotéines de basse densité (LDL, masse molaire de l'apoprotéine 500 000 Da) humaines ont été achetées chez Calbiochem (San Diego, CA, Etats-Unis), ou ont été préparées par ultracentrifugation séquentielle [111] au laboratoire de biochimie de l'hôpital Nord d'Amiens. Les LDL commerciaux étaient conditionnés dans une solution aqueuse à 0,15 mM de NaCl à pH 7,4 additionnée de 0,01% d'EDTA. Les teneurs en protéines des solutions de LDL préparées par le laboratoire de biochimie d'Amiens ont été déterminées par la méthode de Lowry comme décrit par ailleurs [112]. L'intégrité des LDL après stockage et après mélange dans l'appareil de stopped-flow a été évaluée par électrophorèse SDS-page sur gel d'acrylamide (7,5%) et par électrophorèse en conditions natives sur gel d'agarose Tris-Glycine (agarose de 1%, tampon 25 mM de Tris et 192 mM de glycine, pH 8,4) [113]. Stockées à 4°C, les solutions stock se sont avérées stables pendant environ un mois.

2.1.4 Albumine

L'albumine de sérum humain (HSA, masse molaire 68 000 g/mol) débarrassée de toute contamination d'acides gras a été achetée chez Sigma (Saint Louis, Missouri, Etats-Unis), et stocké à 4°C. A 390 nm, son coefficient d'extinction molaire est d'environ 700 $M^{-1}cm^{-1}$.

2.1.5 Phospholipides et liposomes

Le lipide utilisé pour la préparation des liposomes est la dioleoylphosphatidylcholine (C18 :1, masse molaire 786 Da, obtenu chez Avanti Polar-Lipids). Dans sa forme commerciale, ce produit est en solution dans du chloroforme.

De petites vésicules lipidiques unilamellaires (SUV) ont été préparées par extrusion dans des solutions salines (0,15 M) tamponnées à différents pH grâce à 20 mM de phosphate, à partir de cette solution commerciale. Le chloroforme a été évaporé sous argon, le film ainsi obtenu est soigneusement séché. Du tampon phosphate a été ajouté, puis les lipides dispersés grâce à un vortex. A l'aide d'un appareil à extrusion (Lipex Biomembranes, Vancouver, CA), la suspension de liposome ainsi obtenue a été passée sous pression 8 à 10 fois au travers de deux membranes filtrantes de polycarbonate (Poretics, Livermare, CA) superposées dont les pores étaient de 50 nm. Pendant cette opération, la température doit être maintenue au dessus de la température de transition Tc [114]. En l'occurrence, l'appareil a été thermostaté à 25°C. Le diamètre des liposomes ainsi obtenus, déterminé par diffusion quasiélastique [115] de la lumière, est d'environ 75 nm, et la déviation standard sur ce diamètre est d'environ 20 nm.

2.2 Appareillages et techniques physico-chimiques

2.2.1 Mesures statiques

Les spectres d'absorbance ont été enregistrés avec un spectromètre UVIKON 923. Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence ont, eux, été enregistrés en utilisant un spectrofluorimètre SPEX (Edison, NJ) thermostaté à 20°C et, par la suite, un spectrofluorimètre AMINCO-Bowman série 2. L'enregistrement a commencé 2 minutes environ après la préparation des solutions expérimentales. Les données ont été traitées en employant le logiciel Kaleidagraph (Synergie Software, PA).

L'interaction LDL-porphyrine a pu être étudiée en suivant les changements de fluorescence de la porphyrine d'une part et, d'autre part, les modifications de la fluorescence intrinsèque des LDL induites par la fixation du colorant. La fluorescence intrinsèque des lipoprotéines leur étant conférée par leur apoprotéine, seules les molécules de porphyrines se fixant à proximité de celle-ci vont a priori pouvoir modifier sa fluorescence. Les données obtenues ainsi ont été traitées selon les méthodes de Nishida [35, 116, 117]. Les données obtenues à partir de la fluorescence de la porphyrine concernent, quant à elles, aussi bien la fixation apoprotéique que lipidique de cette dernière. Deux procédés expérimentaux ont été mis en œuvre, les variations de fluorescence du colorant étant obtenues soit en faisant varier la concentration en LDL [13, 118], soit à concentration en LDL fixe en faisant varier la quantité de porphyrine. Le logiciel Mathcad (Mathsoft, Inc., Cambridge, MA) a été employé pour des simulations numériques de l'association de la porphyrine aux LDL.

2.2.2 Cinétiques rapides et mesures résolues en temps

Les cinétiques expérimentales correspondant aux interactions étudiées ont été suivies à l'aide d'un appareil stopped-flow de Applied Photophysics (Leatherhead, UK). Cet appareil permet de mettre en contact très rapidement deux produits en solution et de suivre dans le temps leur réaction éventuelle en mesurant soit l'absorption soit la fluorescence du mélange (figure 2.1). Le mélange 1/1 (v/v) des solutions se fait en 1,2 ms : les solutions, contenues dans les seringues de travail, sont expulsées par la poussée simultanée de deux pistons actionnés par un système de gaz (azote) sous une pression de 8 bars. Cette poussée est gouvernée par un ordinateur. Le très faible diamètre des tubes et les petits volumes mis en jeu permettent la rapidité et l'homogénéité du mélange. Les solutions passent ainsi dans la chambre de mélange puis dans la cellule de détection. L'entrée du mélange dans cette dernière en expulse dans une troisième seringue la solution correspondant à l'observation précédente. Le (faible) déplacement de cette seringue d'arrêt déclenche, via l'ordinateur de commande, l'acquisition du signal dans la cellule de

détection où se trouve le mélange « frais ». Cette cellule de détection est organisée de façon à pouvoir choisir des chemins optiques de 2 ou 10 mm. Afin de limiter l'effet d'écran dû aux LDL, nous avons utilisé la configuration donnant le chemin optique le plus court.

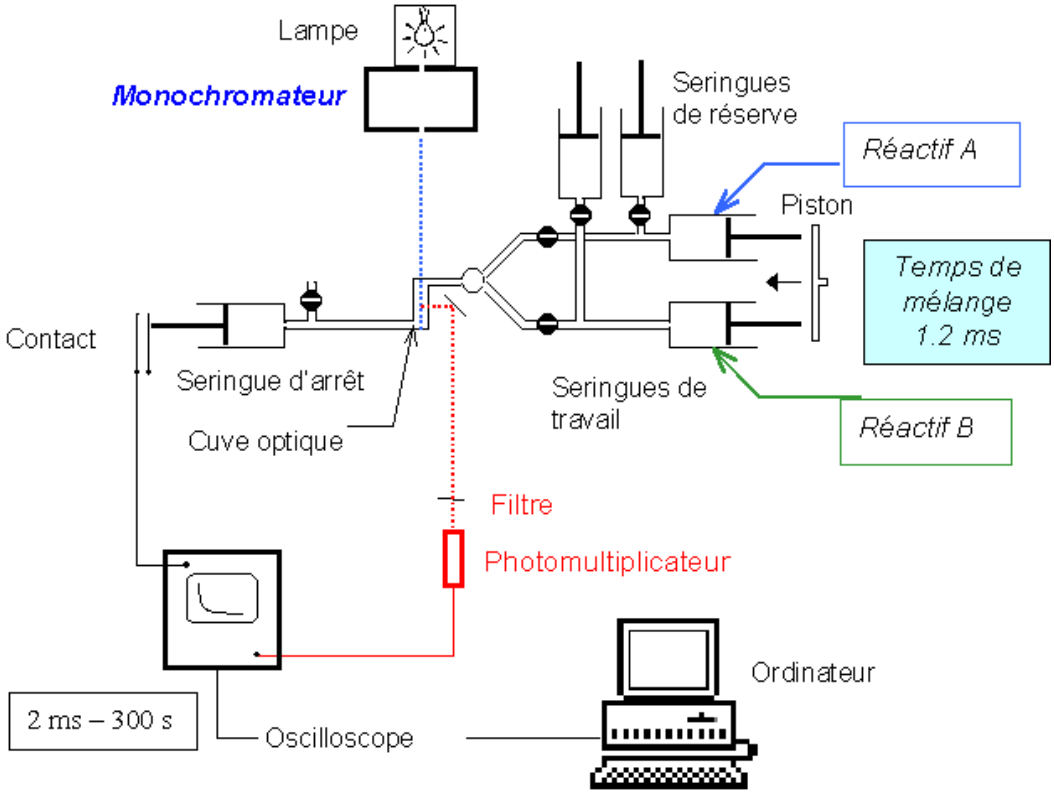


Figure 2.1 : Principe schématique du fonctionnement d'un appareil de stopped-flow, ici en détection par fluorescence. Pour la détection par absorbance, le même montage est conservé, mais une barrette de diode est placée en sortie de la cellule de détection sur le chemin du faisceau provenant du monochromateur.

Lors de nos expériences, l'appareil était thermostaté à 20°C. La lumière d'excitation est fournie par une lampe à arc au xénon de 150 W. D'autre part, des spectres d'absorbance à temps très courts ont été enregistrés sur le même appareil grâce à une barrette de diode couvrant les longueurs d'ondes de 200 à 750 nm avec une séparation de 2,17 nm. La vitesse maximale d'enregistrement, correspondant au temps nécessaire pour l'acquisition du signal par la barrette de diode est de 2,56 ms. Les spectres sont donc enregistrés au mieux 3,76 ms après le début du mélange.

Pour les enregistrements de cinétiques rapides, la lumière d'excitation passe par un monochromateur dont les fentes ont généralement été réglées pour donner une

largeur de bande de 4,65 nm. La fluorescence a été collectée au dessus de 610 nm (590 nm pour les expériences sur les pK de la deutéroporphyrine) à l'aide d'un filtre passe-haut (Oriel, France) situé en sortie, devant le photomultiplicateur. Le signal de fluorescence a été observé et traité sur un poste de travail d'architecture RISC (Acorn Computers, UK) et analysé en utilisant le logiciel fourni par le fabricant. Les constantes obtenues ont ensuite été affinées par simulation sous Mathcad (Mathsoft, Inc., Cambridge, MA).

2.2.3. Expériences de saut de pH

Notre appareil de stopped-flow permet également de réaliser des expériences nécessitant deux mélanges consécutifs. Pour cela, deux seringues complémentaires sont ajoutées au montage décrit précédemment. Elles permettent le pré-mélange de deux solutions dans un tube, appelé boucle de vieillissement, dont le diamètre est légèrement plus important que les autres. La réaction correspondant à ce premier mélange a donc lieu dans cette boucle, pendant un délai choisi par l'expérimentateur et compris entre 10 ms et 1000 ms. Après ce « vieillissement », cette solution est mélangée à un volume équivalent d'une troisième solution se trouvant dans une des seringues de travail du montage précédemment décrit. La quatrième seringue, correspondant à la seconde seringue de travail de ce premier montage, contient du solvant qui est, ici, simplement utilisé pour pousser la solution de pré-mélange vers la cellule de mélange. Ces deux seringues étant, comme nous l'avons décrit pour le montage précédent, synchronisées et reliées au déclenchement de l'acquisition, la réaction correspondant à cette seconde étape est suivie selon le même principe que celui décrit dans le paragraphe précédent.

Afin d'éviter les problèmes de stabilité de la solution de porphyrine à bas pH [119, 120], le système de pré-mélange du stopped-flow a été employé pour étudier l'association de la porphyrine avec les vésicules lipidiques. Il nous a en effet permis de réaliser deux mélanges consécutifs, séparé de 10 ms. La première étape de mélange concerne une solution de porphyrine à un pH suffisamment basique pour que la porphyrine soit sous forme monomérique et une solution phosphate à pH acide (pH_1), de sorte que le mélange des deux solutions donne le pH final désiré (pH_2). Pour ce pré-mélange, les molarités de phosphate utilisées sont telles que la concentration finale en phosphate est de 20 mM. Puis la deuxième étape du stopped-flow mélange cette solution à une suspension de liposomes au même pH (pH_2). Ce procédé, ne laissant que peu de temps à la porphyrine pour se dimériser, devrait donner un accès aux caractéristiques du monomère. Il sera plus amplement discuté dans le chapitre « Résultats 1 - Association d'une porphyrine avec les membranes».

2.3 Appareils et techniques de biologie cellulaire

2.3.1 Cultures cellulaires et entretien des cellules

Nous avons utilisé une lignée de fibroblastes humains de type HS68.

Milieu utilisé

DMEM (Minimum Eagle Medium de Dulbecco) complété par 10% SVF (sérum de veau fœtal) et 100 UI/mL de Pénicilline / Streptomycine .

Culture

Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture de 75 cm^2, dans une étuve à 37°C enrichie à 5% de CO_2. Les fibroblastes, adhésifs, se multiplient en monocouche jusqu'à ce qu'une inhibition de contact freine la division cellulaire. Il leur faut pour cela environ six jours. A ce stade, on compte environ 1 000 000 cellules par flacon. Elles sont alors rincées et trypsinées (trypsine 0,005% v :v) puis réparties (« passées ») dans deux nouveaux flacons. Elles sont remises en culture dans les mêmes conditions. Afin d'éviter tout effet lié au vieillissement, les fibroblastes sont utilisés entre les 13^{è} et 19^{è} passages.

Pour les expériences de microscopie, les cellules sont ensemencées à 10000 cellules par mL 48h avant l'observation, cultivées et traitées sur une lamelle de verre de 0,17 mm d'épaisseur préalablement déposée au fond de la boite. Juste avant l'observation, les cellules sont rincées trois fois avec du HBBS, puis incubées dans le même tampon avec la deutéroporphyrine ou la phtalocyanine d'aluminium disulfonée, avec ou sans LDL. Le choix de ce tampon a permis d'exclure la possibilité de fixation des produits sur les composants biologiques du milieu de culture, le sérum de veau contenant des transporteurs protéiques tels que, par exemple, l'albumine.

2.3.2 Microscopie

Les images des cellules ont été obtenues grâce à un microscope inversé (Nikon Eclipse TE300) équipé d'un objectif à huile 60x dont l'ouverture numérique est de 1,4 (Nikon France). L'excitation des cellules était réalisée grâce à une lampe à mercure (Osram HBO 100 W) dont les raies sont isolées à l'aide de filtres passe-bande (ici, 330-380 nm) montés sur une roue placée sur le chemin optique (lambda 10-2, Sutter Instrument Company). L'intensité de cette excitation a été optimisée grâce à l'utilisation de filtres neutres (NDx8). Les images ont été acquises grâce à une caméra CCD (Roper Scientific France) avec un grandissement de 2,25x. Le temps d'intégration était de 1000 ms. L'acquisition, le traitement et l'analyse de données ont été réalisés avec le logiciel de Metamorph, tous les deux fournis par Universal Imaging Corporation (Cordier France Scientifique).

2.3.3 Localisation sub-cellulaire

Après les incubations cellulaires, les cellules sont excitées dans l'UV (filtre d'excitation à 330-380 nm, miroir dichroïque à 400 nm). L'émission de fluorescence rouge des colorants a été collectée grâce à un filtre passe-bande (645 +/- 75 nm, Omega). La longueur d'onde d'excitation a été choisie de façon à ce qu'il soit possible d'exciter la molécule étudiée (deutéroporphyrine ou phtalocyanine d'aluminium disulfonée) et le marqueur spécifique d'organelles éventuellement utilisé (en l'occurrence, le LysoTracker® green) de la même façon, et ainsi d'avoir la même excitation pour toutes les observations.

En effet, dans le cas de la phtalocyanine, la localisation subcellulaire a été déterminée par colocalisation avec un marqueur spécifique. Avant l'incubation avec le photosensibilisateur, les préparations ont été rincées trois fois avant d'être incubées 30 min avec du LysoTracker® green (200 nM). Le protocole utilisé est celui indiqué par le fournisseur (Molecular Probes) pour le marquage des lysosomes. Sous excitation dans l'UV, la fluorescence verte de ce marqueur a été isolée grâce à un filtre passe-bande (535 +/- 45 nm, Omega). La gamme d'émission de fluorescence des deux fluorophores en présence, la fluorescence rouge de la $AlPcS_2$ et celle, verte, du LysoTracker® sont suffisamment différentes pour permettre une séparation parfaite des signaux en utilisant successivement les deux filtres passe-bande.

CHAPITRE 3 : RESULTATS 1 – Association d'une porphyrine avec les membranes

Résumé

La traversée membranaire par diffusion passive est sans nul doute l'un des phénomènes majeurs impliqués dans l'entrée des porphyrines dans les cellules. La pénétration de ces molécules dans les cellules cancéreuses est favorisée par l'acidification du milieu extracellulaire dans la tumeur. Afin de déterminer clairement de quelle façon ce pH peut modifier le comportement de la deutéroporphyrine, archétype des porphyrines dicarboxyliques, dans les membranes, nous avons d'abord déterminé les pK en solution aqueuse de cette molécule : pK_{A2} = 6,6 ; pK_{A1} = 5,3 ; pK_{N1} = 4,1 ; pK_{N2} = 2,3. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'interaction de cette porphyrine avec des vésicules lipidiques unilamellaires utilisées comme modèle de membranes en faisant varier le pH du milieu. Ces processus ont été appréhendés du point de vue cinétique, en suivant les changements de fluorescence de la porphyrine lorsqu'elle s'insère dans les liposomes. Les constantes de vitesse d'entrée dans les vésicules (k_{on}) et de sortie (k_{off}) de la porphyrine varient de façon sigmoïde en fonction du pH. Cette dépendance indique que plusieurs formes de la molécule sont impliquées dans les phénomènes mesurés. Les valeurs théoriques des k_{on} et k_{off} correspondant à ces différentes formes ont été déterminées. Nos résultats montrent que la neutralisation des azotes centraux est nécessaire à l'entrée dans la bicouche, confirmant que l'association met en jeu des interactions hydrophobes entre le noyau porphyrique et les lipides. Néanmoins, la neutralisation de la porphyrine est également défavorable à son entrée dans les liposomes. Sous cette forme, en effet, la molécule a une très forte tendance à former des dimères, qui ne peuvent pas pénétrer dans les bicouches lipidiques. Un milieu extérieur relativement basique est donc un facteur favorable à l'entrée de la deutéroporphyrine dans les membranes. Par contre, l'interaction se faisant par le noyau hydrophobe, les chaînes polaires orientées vers la phase aqueuse, plus celles-ci sont chargées et moins l'enfouissement de la molécule dans les lipides sera profond, favorisant donc, du point de vue cinétique, la sortie de la deutéroporphyrine des membranes. La fenêtre d'efficacité de l'association de la deutéroporphyrine aux membranes est donc relativement étroite, comprise entre le pK_{A1} et le pK_{A2} de la molécule.

Chapitre 3

ASSOCIATION PORPHYRINE-MEMBRANE

Dans ce chapitre, les résultats présentés portent sur la caractérisation des processus d'incorporation de la deutéroporphyrine dans des vésicules lipidiques en fonction du pH. En effet, comme nous l'avons préalablement spécifié, l'acidification du milieu extracellulaire semble être un facteur favorisant l'entrée de ces molécules dans les cellules hyper-proliératives.

Pour les petites molécules, la perméabilité membranaire peut être correctement analysée par un modèle de solubilité/diffusion [121]. Ce dernier est basé sur le fait que de telles molécules passent facilement de la phase aqueuse à la phase lipidique, du fait de leur petite taille. Le passage des interfaces ne posant pas de problème, l'étape limitante est donc la phase de diffusion à travers la membrane. Le flux de molécules perméantes, qui répond à la première loi de Fick, est donc fonction de l'épaisseur de la membrane et du coefficient de perméabilité de la molécule. Cependant, la taille des porphyrines n'est pas négligeable devant l'épaisseur de la membrane. Pour de telles molécules, le passage des interfaces lipide/eau est sans aucun doute un phénomène plus difficile, et ce d'autant plus pour les porphyrines dicarboxyliques dont les chaînes latérales peuvent être chargées et réparties autour de la molécule dont elles peuvent briser l'aspect symétrique. Alors que les caractéristiques de diffusion des molécules non chargées sont généralement en corrélation directe avec leur coefficient de partage huile/eau [94], l'intérêt et les limites de l'utilisation de ce type de paramètre pour prédire le comportement des porphyrines vis à vis des membranes est l'objet de discussions [95]. Par exemple pour la deutéroporphyrine, dont les charges sont placées d'un même côté du macrocycle, la pénétration dans la bicouche se fait vraisemblablement par le noyau porphyrique, les chaînes tournées vers la phase aqueuse [122]. Du pH environnant dépend l'état de protonation des groupes carboxyliques et donc vraisemblablement le comportement de la porphyrine par rapport à la barrière hydrophobe que représente la membrane.

L'appréhension des facteurs gouvernant la dynamique de diffusion de la deutéroporphyrine à travers les membranes en fonction du pH est essentielle pour comprendre son entrée dans les cellules et sa répartition sub-cellulaire. Des études basées sur l'étude du transfert de la deutéroporphyrine depuis des modèles de membranes vers la HSA ont été préalablement réalisées au laboratoire et ont montré que le flip-flop de ces molécules entre les deux couches lipidiques de la membrane

est fortement influencé par l'état de protonation des chaînes carbonées [96, 118]. Nous avons donc voulu déterminer de quelle façon ces phénomènes de protonation/déprotonation sont impliqués dans les mécanismes de franchissement des interfaces, i.e. d'entrée et de sortie de la bicouche lipidique, afin de corréler l'état d'ionisation de la molécule avec sa vitesse d'entrée dans les membranes.

3.1 Généralités

Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe 1.1.2, les propriétés de fluorescence des porphyrines sont sensibles à l'environnement. Elles sont notamment modifiées par le pH, comme le montre la figure 1.5. De ce fait, l'enregistrement des modifications des spectres d'absorbance et d'émission de fluorescence de la porphyrine en solution aqueuse pourra nous permettre de déterminer les pK des différents groupes. Les valeurs de ces pK ont déjà été déterminées [13]. Néanmoins, la précision de ces valeurs est sans doute limitée par les phénomènes d'autoassociation des molécules de deutéroporphyrines, favorisés par la neutralisation des groupes carboxyliques. L'appareil de stopped-flow a donc été utilisé afin de réaliser des mesures rapidement après que la solution ait été portée au pH souhaité (« pH-jump »), pour éviter les problèmes liés à l'instabilité des solutions porphyriques à certains pH (voir paragraphe 2.2.3).

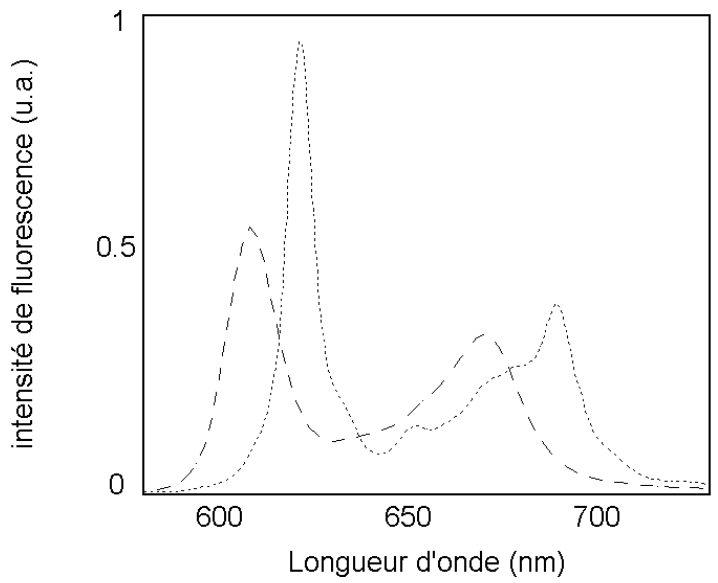


Figure 3.1 : Spectres d'émission de fluorescence de la deutéroporphyrine (5×10^{-8} M) dans du tampon phosphate, PBS (- - -), et en présence de liposomes ([C18:1] = 2×10^{-4} M ; ·····). La longueur d'onde d'excitation était fixée à 396 nm.

La figure 3.1 montre que les spectres d'émission de la deutéroporphyrine en solution aqueuse ou en présence de vésicules lipidiques sont sensiblement différents. Ainsi, pour suivre l'incorporation de cette molécule dans des bicouches lipidiques, il suffit d'observer l'évolution du signal de fluorescence du colorant excité à 396 nm.

3.2 Etats d'ionisation des porphyrines en solution

L'agrégation des molécules de porphyrines s'accompagne, comme cela a déjà été spécifié, d'une perte de fluorescence dans la gamme de longueur d'onde utilisée. De ce fait, ces phénomènes ont pu induire un biais important dans les mesures précédentes des pK des différents groupes de la deutéroporphyrine [13], notamment des chaînes carbonées. Par exemple, dans le cas de l'hématoporphyrine, une autre porphyrine dicarboxylique, les valeurs obtenues par titration à partir de solutions acides ou de solutions basiques sont très nettement différentes [17]. Pour la deutéroporphyrine, nous avons donc, dans un premier temps, réexaminé les valeurs des pK en tenant compte des phénomènes d'autoassociation de la molécule.

3.2.1 Mesures des spectres d'absorption résolus en temps

A des concentrations faibles, l'autoassociation des porphyrines se réduit à la formation de dimères [119]. La constante de dimérisation de la deutéroporphyrine est connue, elle est de $2{,}3\times10^{6}$ M^{-1} dans du tampon phosphate à pH 7,2 [99]. A pH neutre, les formes monomère et dimère peuvent être distinguées sans problème grâce à la bande que présente leur spectre d'absorption dans le proche UV, qui passe de 395 nm pour le monomère à 370 nm pour le dimère.

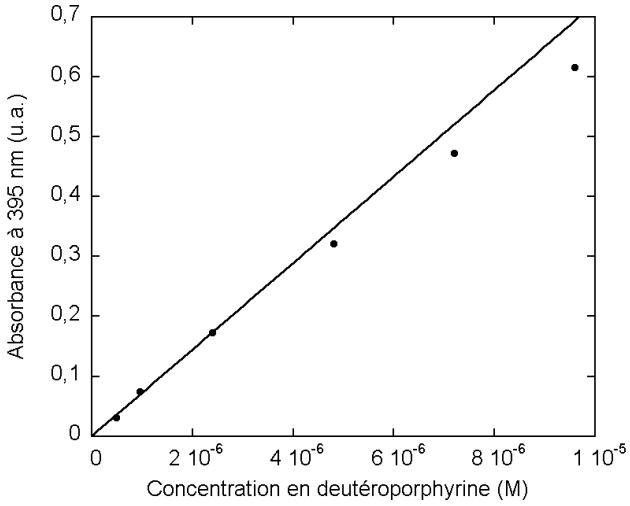


Figure 3.2 : Loi de Beer de la deutéroporphyrine à pH 9,5 (tampon phosphate 1 mM). A ce pH basique, la DP est sous forme monomère jusqu'à environ 3×10^{-6} M.

Les équilibres acido-basiques sont généralement très rapides. La protonation des groupes carboxyliques ne sera donc pas a priori confondue temporellement avec la dimérisation des molécules, qu'elle favorise fortement. Nous avons donc tout

d'abord voulu différencier cinétiquement ces phénomènes. Pour cela, nous avons préparé une solution de porphyrine dans du tampon phosphate 1mM à pH 9,5. A ce pH, en effet, les chaînes carboxyliques sont déprotonées, ce qui empêche l'autoassociation dans la gamme de concentrations utilisées (< 3×10^{-6} M, voir figure 3.2). Cette solution est ensuite mélangée au stopped-flow avec une seconde solution, acide, de tampon phosphate à 39 mM, de façon à ce que la concentration en phosphate après mélange soit de 20 mM. Le pH de cette seconde solution a été choisi de façon à ce que le mélange conduise au pH d'étude désiré. Nous avons utilisé une concentration en phosphate plus importante pour la solution acide de façon à pouvoir amener le pH après mélange à des valeurs très acides, en l'occurrence jusqu'à 1,8. Toutes les solutions contiennent 0,15 M de NaCl. L'acquisition du spectre d'absorption est automatiquement déclenchée 2,56 ms et 1 s après le mélange. Afin de minimiser les phénomènes de dimérisation, nous avons utilisé des concentrations en deutéroporphyrine les plus faibles possible ($5,7\times10^{-7}$M).

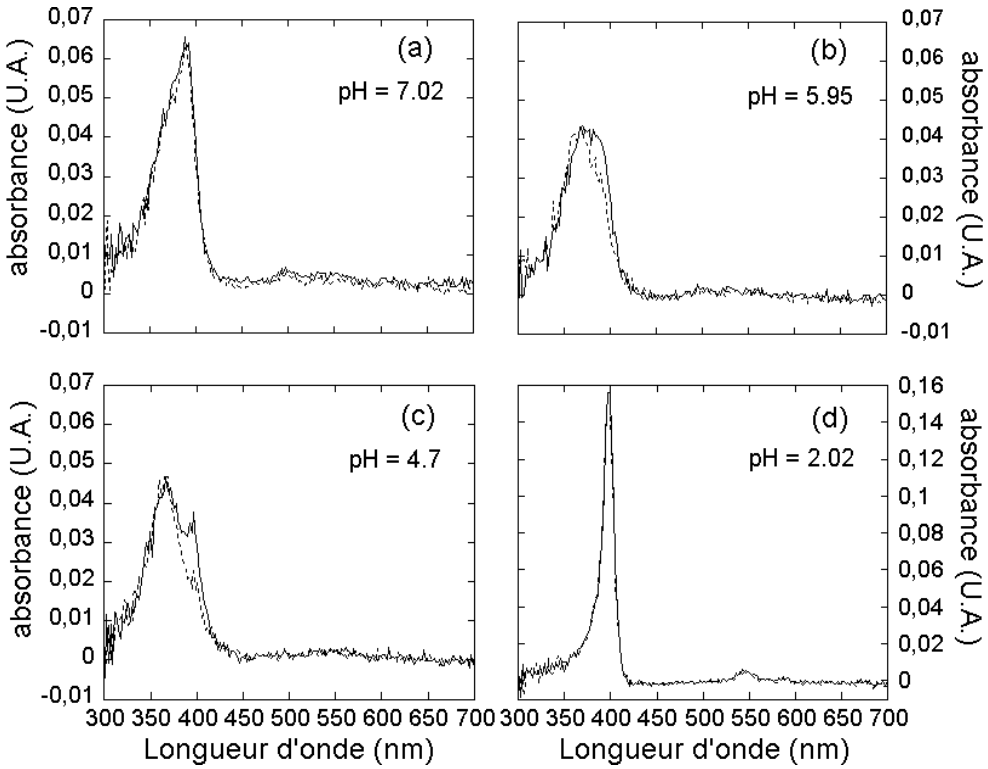


Figure 3.3 : Etudes résolus en temps de la porphyrine en solution. Spectres d'absorption de solutions de deutéroporphyrine ($5,7\times10^{-7}$M) enregistrés 2,56 ms et 1 s après le mélange avec le tampon acide. Le pH final est de 7,02 (a), 5,95 (b), 4,7 (c) et 2,02 (d) dans du tampon phosphate 20 mM 0,15 M NaCl. La résolution de nos expériences ne permet pas l'étude des phénomènes de protonation, compte tenu de la rapidité de la dimérisation (caractérisée par la bande d'absorption à 370 nm), qui se produit en grande partie avant le premier enregistrement.

Les spectres d'absorbance de la solution de porphyrine ont ainsi été enregistrés pour des pH finaux allant de 8,4 à 1,8. Quelques exemples significatifs sont donnés sur la figure 3.3. Pour un pH final de 7,2 ainsi que pour tous les pH plus basiques, les deux spectres à 2,56 ms et 1 s sont identiques. Ils présentent un pic à 395 nm caractéristiques de la forme monomère. Néanmoins, un épaulement autour de 370 nm indique que la forme dimérique a une contribution non négligeable dans ces signaux, y compris pour les temps les plus courts. La constante de dimèrisation à pH 7,4, donnée précédemment, permet de calculer la proportion de monomère à l'équilibre, qui est ici de 46%. A pH 5,95 et 4,7, quelques modifications peuvent être mises en évidence entre les deux spectres enregistrés successivement. Cependant la contribution de la bande des dimères reste importante même sur les spectres à temps très courts. Dans tous ces cas, la dimérisation est donc trop rapide pour permettre l'étude de l'étape de protonation des monomères en utilisant cette méthode, dont la résolution temporelle est du même ordre de grandeur que la durée des réactions d'autoassociation des molécules. Par ailleurs, comme attendu, les deux spectres à pH 2,02 sont identiques et montrent un pic à 400 nm, correspondant au monomère dicationique [123].

Comme l'indiquent les faibles différences observées entre les deux spectres successivement pris au même pH, notamment à pH 5,95 et 4,7, la bande de Soret est très rapidement décalée de 395nm, correspondant à la forme monomère de la porphyrine, à 370 nm. Ce shift vers le bleu correspond à l'autoassociation des molécules (voir figure 1.4). En accord avec la théorie excitonique, il peut s'interpréter comme la formation de dimères par stacking cofacial [124]. En effet, afin de réduire les répulsions, chaque molécule de porphyrine impliquée dans un dimère prend l'orientation opposée à sa partenaire [125]. Dans la gamme de concentrations utilisée lors de nos expériences, ces processus de dimérisation semblent être presque achevés dans le temps correspondant à la durée de nos mesures, c'est à dire en quelques millisecondes.

Afin de limiter encore les phénomènes de dimérisation, nous avons utilisé une concentration en porphyrine encore plus faible ($5{,}5\times10^{-8}$ M) et avons donc travaillé en détection par fluorescence. On peut escompter que les propriétés optiques de la deutéroporphyrine seront en effet modifiées par les phénomènes de solvatation, dépendant eux-mêmes des états de protonation de la molécule. Le même protocole de mélange au stopped-flow a été utilisé, et la fluorescence à été enregistrée au delà de 590 nm en utilisant un filtre passe-haut. L'excitation a été fixée à 395 nm. Les modifications de la fluorescence, reflet des cinétiques réactionnelles, ont été suivies sur 20 ms, 200 ms ou 1s. Comme le montre la figure 3.4, correspondant à un mélange dont le pH final est de 5,95, les signaux sont parfaitement ajustés par des courbes mono-exponentielles. Ces cinétiques n'ont donc pas permis de mettre en évidence les différentes étapes successives attendues (protonation et autoassociation).

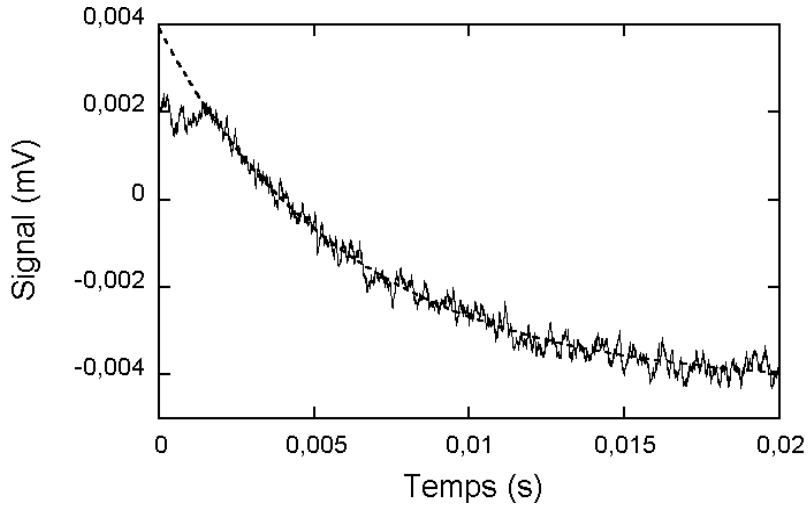


Figure 3.4 : Etudes résolues en temps de la porphyrine en solution. Evolution du signal de fluorescence d'une solution de deutéroporphyrine ($5{,}5\times10^{-8}$ M) après le mélange avec le tampon acide. Le pH final est de 5,95 dans du tampon phosphate 20 mM et 0,15 M de NaCl.

Le signal est mono-exponentiel. Il ne met pas en évidence les deux réactions successives impliquées : la protonation des groupes carboxyliques de la porphyrine puis l'autoassociation des molécules neutralisées. Les phénomènes de protonation ont en effet lieu pendant le temps mort de notre appareil (voir texte).

Néanmoins, l'utilisation de concentrations en porphyrines plus faibles que lors de nos mesures par absorbance a permis de réduire la vitesse des phénomènes de dimérisation, nous permettant ainsi de les mesurer grâce à notre appareil de stopped-flow. Sur la figure 3.4 par exemple, le $t_{½}$ correspondant est de 4,2 ms. La constante de vitesse de l'ajustement mono-exponentiel correspondant est de (164±4) s^{-1}. Cette exponentielle correspond à l'association d'une molécule de porphyrine (partiellement ou totalement neutralisée) à une autre porphyrine en solution. La constante de vitesse bimoléculaire déterminée à partir de ces mesures est donc d'environ 3×10^{9} $M^{-1}s^{-1}$. La valeur limite, correspondant à un processus par diffusion est $k_D = 4\pi.R.(D_P + D_P).N$ où R est la somme des rayons des deux molécules partenaires, D_P le coefficient de diffusion de la deutéroporphyrine et N le nombre d'Avogadro [126]. Nous assumons que R est de l'ordre de 10 Angstroms. Etant donné que $D_P = 3{,}89\times10^{-10}$ m^2s^{-1} [127], nous obtenons $k_D = 5{,}9\times10^{9}$ $M^{-1}s^{-1}$. Etant donné que, pour former un dimère, chaque molécule de porphyrine doit présenter une orientation relative donnée – ce qui diminue sensiblement la valeur théorique – il semble donc que la dimérisation soit un processus contrôlé par diffusion. Sa rapidité ne nous a pas permis d'avoir accès à des mesures spectrales sur les monomères de la porphyrine dans différents états d'ionisation, ce qui nous aurait permis d'avoir un accès direct aux valeurs des pK.

Cependant, il est couramment admis que la neutralisation de la porphyrine, conduisant à la forme PH_2, gouverne sa dimérisation. Les solutions de deutéroporphyrine à pH basiques, utilisées lors de nos expériences, obéissent à la loi de Beer et leurs spectres ne mettent en évidence aucun dimère. L'acidification brutale de ces solutions dans l'appareil de stopped-flow conduit à deux processus : d'abord, les équilibres acido-basiques puis la dimérisation des molécules, d'autant plus marquée que la proportion de porphyrine neutre en solution est importante (pH 6-5).

En effet, la constante de vitesse bimoléculaire typique de protonation de groupes carboxyliques est de 4×10^{10} $M^{-1}s^{-1}$ [128]. A des pH allant de 5 à 6, pour lesquels la dimérisation est importante, la concentration de protons est largement supérieure à celle de la porphyrine, et la constante de vitesse du pseudo-premier ordre de la réaction de neutralisation de la porphyrine est donc de 4×10^4 s^{-1} à 4×10^5 s^{-1}. Les temps caractéristiques de protonation sont donc, dans ces conditions, de l'ordre de la microseconde, c'est à dire bien inférieurs à la durée du mélange dans notre appareil. Ces phénomènes ne sont donc pas visibles sur nos enregistrements cinétiques, qui ne correspondent donc qu'aux processus d'autoassociation.

3.2.2 Titration fluorimétrique en fonction de la concentration en porphyrine

Etant donné que les étapes de protonation et de dimérisation ne peuvent pas être distinguées par les expériences résolues en temps que nous avons réalisées, les effets de la concentration sur les valeurs des pK ont été évalués par des mesures à l'équilibre. La proportion de dimère étant inversement proportionnel à la concentration, la tendance observée en diminuant la concentration de la porphyrine pourra donner accès, en extrapolant à une concentration nulle, aux caractéristiques du monomère [129]. Nous avons donc réalisé une série de titrations acido-basiques à différentes concentrations en deutéroporphyrine ($3,6\times10^{-7}$ M, $1,8\times10^{-7}$ M, $3,6\times10^{-8}$ M et $7,2\times10^{-9}$ M). La figure 3.5 montre l'ensemble des spectres obtenus pour la plus forte concentration, dont la forme est caractéristique de l'ensemble des résultats obtenus.

La fluorescence est très faible pour les essais réalisés dans la zone de pH autour de 4,7. Cette zone correspond au maximum de dimérisation des molécules en solution. La diminution du pH jusqu'à 1,8 conduit à une exaltation des pics à 592 et 650 nm alors que l'augmentation du pH jusqu'à pH 8,4 a pour conséquence une augmentation des pics à 610 et 670 nm. Etant donné ces caractéristiques spectrales et le fait que la dimérisation conduit à une extinction de la fluorescence observée, nous pensons que la forme neutre de la deutéroporphyrine, PH_2, est majoritaire à pH 4,7. En accord avec les équilibres proposés ci-après, l'acidification progressive jusqu'à

pH 1,8 conduit à la formation successive des formes mono- et di-cationiques. A l'inverse, le passage vers les pH basiques permet la formation successive des formes mono- et di-anioniques.

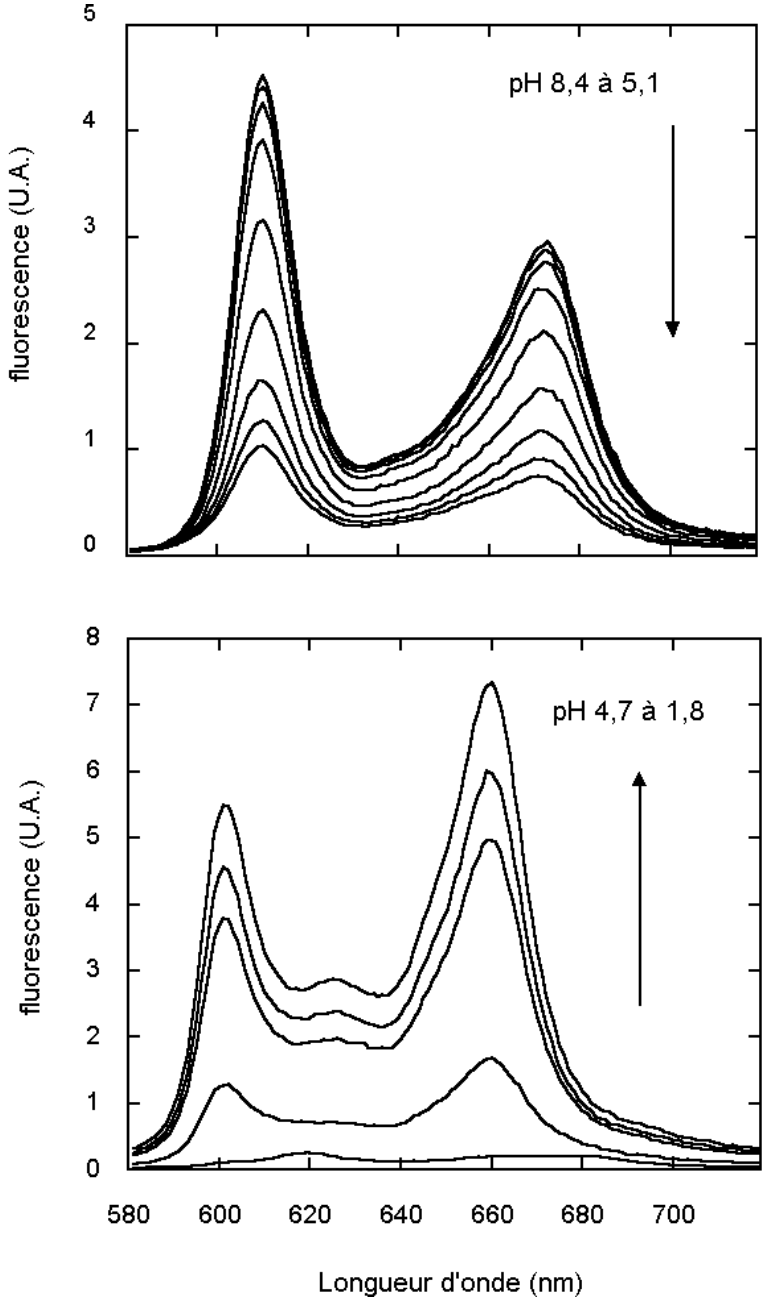


Figure 3.5 : Titration fluorimétrique d'une solution de porphyrine : Ensemble des spectres de fluorescence enregistrés au cours de la titration acido-basique d'une solution de deutéroporphyrine ($3,6\times10^{-7}$ M) dans du tampon phosphate 20 mM à 0,15 M de NaCl. En haut, pour la série à pH basiques, les pH sont 8,4 ; 7,55 ; 7,02 ; 6,7 ; 6,2 ; 5,7 ; 5,5 ; 5,3 et 5,1. En bas, pour la série à pH acides, les pH sont 4,7 ; 3,6 ; 2,95 ; 2,02 et 1,8.

$$PH_4^{2+} \underset{}{\overset{K_{N2}}{\rightleftharpoons}} PH_3^{+} \overset{K_{N1}}{\rightleftharpoons} PH_2 \overset{K_{A1}}{\rightleftharpoons} PH^{-} \overset{K_{A2}}{\rightleftharpoons} P^{2-}$$

A partir des maximums significatifs des spectres pour chacune des séries réalisées, les courbes de titration correspondantes ont été tracées en reportant, en fonction du pH, l'intensité de fluorescence à 592 nm pour les essais à pH acides et à 610 nm pour les essais à pH basiques (figure 3.6).

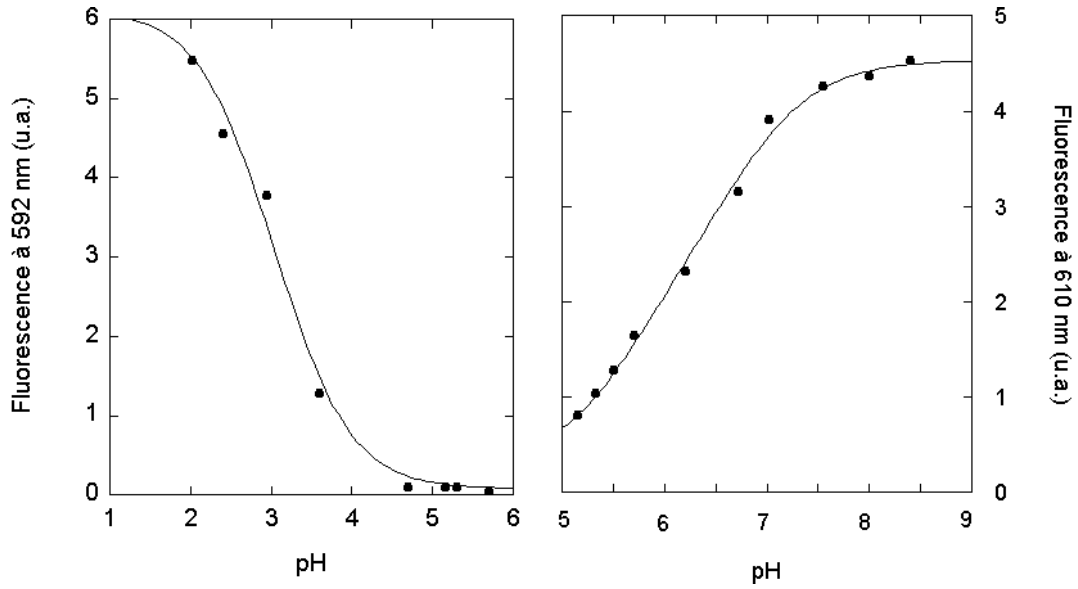


Figure 3.6 : Courbes de titration aux longueurs d'onde les plus significatives (592 nm pour les séries à pH acides et 610 nm pour les séries à pH basiques), correspondant aux spectres donnés figure 3.5. Les points sont ajustés en accord avec les équations (3.1) et (3.2).

Compte tenu des faibles concentrations utilisées et donc de l'absence de tout effet d'écran, la fluorescence émise par chacune des différentes formes de la deutéroporphyrine est directement proportionnelle, via un facteur *f*, à la concentration de l'espèce considérée. Les données de la figure 3.6 ont été ajustées en accord avec l'équation (3.1), de façon cohérente avec le traitement des données de certaines études préalablement réalisées au laboratoire [13].

$$F = \frac{\alpha'}{\alpha} \cdot c \qquad (3.1)$$

où c est la concentration totale en porphyrine et F l'intensité totale de fluorescence à un pH donné et avec :

$$5<pH<8.4 \quad \begin{cases} \alpha = 1 + \dfrac{K_{A1}}{[H^+]} + \dfrac{K_{A1} \cdot K_{A2}}{[H^+]^2} \\ \alpha' = f_{PH2} + f_{PH} \cdot \dfrac{K_{A1}}{[H^+]} + f_P \cdot \dfrac{K_{A1} \cdot K_{A2}}{[H^+]^2} \end{cases} \tag{3.2a}$$

$$1.8<pH<4.7 \quad \begin{cases} \alpha = 1 + \dfrac{[H^+]}{K_{N1}} + \dfrac{[H^+]^2}{K_{N1} \cdot K_{N2}} \\ \alpha' = f_{PH2} + f_{PH3} \cdot \dfrac{[H^+]}{K_{N1}} + f_{PH4} \cdot \dfrac{[H^+]^2}{K_{N1} \cdot K_{N2}} \end{cases} \tag{3.2b}$$

Les valeurs des pK apparents ont été déterminées de la même façon pour les cinq concentrations en porphyrine, et représentées en fonction de celles-ci sur la figure 3.7. Ces résultats montrent bien une variation des valeurs des pK en fonction de la concentration en porphyrine, confirmant le fait qu'elles sont biaisées par les phénomènes de dimérisation. L'extrapolation des courbes à zéro donne des valeurs que l'on peut attribuer aux seuls monomères de deutéroporphyrine. Ces valeurs sont récapitulées dans le tableau 3.1.

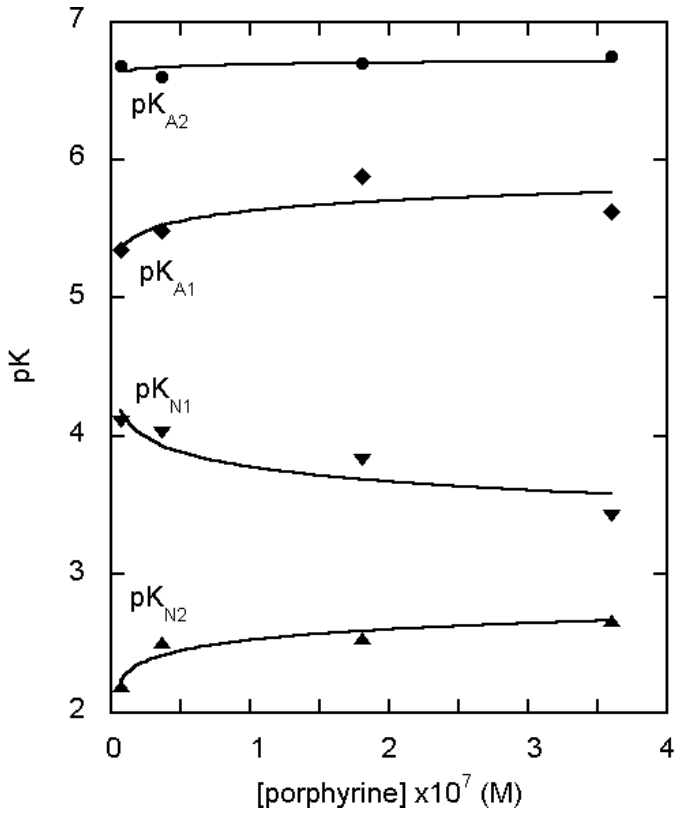


Figure 3.7 : Valeurs des pK apparents de la deutéroporphyrine dans du tampon phosphate 20 mM à 0,15 M de NaCl, en fonction des différentes concentrations en porphyrine auxquelles les titrations ont été réalisées.

L'extrapolation des courbes vers zéro donne accès à des valeurs reflétant les propriétés des monomères. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 3.1.

pK_{A2}	pK_{A1}	pK_{N1}	pK_{N2}
6,6	5,3	4,1	2,3

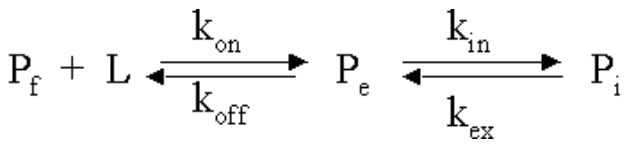
Tableau 3.1 : Tableau récapitulatif des pK attribués à la deutéroporphyrine sous sa forme monomérique.

Les effets de la concentration sont très faibles sur pK_{A2}. Ils sont bien plus sensibles sur pK_{A1} et pK_{N1}, avec des effets opposés. Cela confirme que la forme neutre de la molécule est impliquée dans les processus de dimérisation. En effet, la stabilisation de cette forme due à l'autoassociation des molécules défavorise l'ionisation aussi bien chaînes carboxyliques que des azotes centraux. Ce phénomène se traduit par l'augmentation constatée des valeurs des pK_{A1} et par la diminution de celles de pK_{N1}, lorsque la dimérisation est plus importante (i.e. la concentration augmente).

3.3 Incorporation de la porphyrine dans des vésicules lipidiques

3.3.1 Cinétique de l'association de la porphyrine aux vésicules en fonction du pH du milieu extérieur

Comme cela a été précisé précédemment, l'association des porphyrines aux vésicules lipidiques se fait en deux temps. D'abord, la molécule entre dans le feuillet externe de la bicouche lipidique. Puis, dans un second temps, elle traverse la bicouche. Pour les molécules amphiphiles portant, comme la deutéroporphyrine, des groupements polaires répartis de façon asymétrique, l'incorporation dans la membrane se fait par le noyau hydrophobe, les chaînes polaires étant orientées vers la phase aqueuse pour laquelle elles ont plus d'affinité [118, 122]. Dans ces conditions, la traversée de la membrane nécessite le retournement de la molécule (flip-flop), ce qui lui permet de retrouver le même type d'orientation de l'autre côté de la bicouche (figure 3.8). Ces processus sont décrits et analysés théoriquement dans la référence [118]. Sur le schéma correspondant, P_f, P_e et P_i sont respectivement les concentrations en deutéroporphyrine libre, incorporée dans le feuillet externe et interne des vésicules lipidiques (voir annexe). L est la concentration en vésicules, exprimée en terme de molécules de phospholipides.



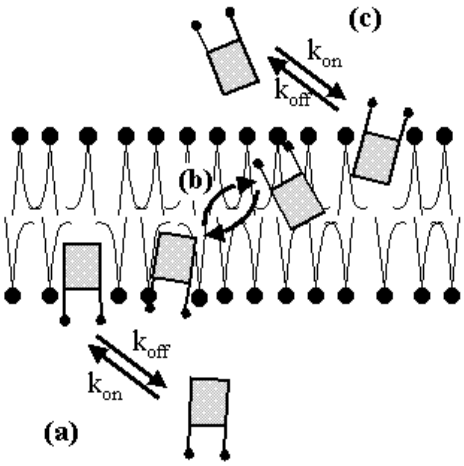


Figure 3.8 : Modèle d'interaction d'une porphyrine avec une bicouche lipidique, voir le texte pour les explications dynamiques. L'entrée de la molécule dans la bicouche, ainsi que sa sortie (du même côté ou de l'autre), sont gouvernées par les paramètres cinétiques k_{on} et k_{off}. Le sens du déplacement est fortement influencé par les conditions de part et d'autre de la membrane.

Expérimentalement, cette association a été étudiée sur une large gamme de pH, allant de 4,5 à 8,5. Pour cela, nous avons utilisé le système de double mélange de notre appareil de stopped-flow, comme nous l'avons décrit dans la section « Matériel et Méthodes ». Ce procédé permet de réaliser deux mélanges successifs, séparés, en l'occurrence, de 10 ms. Ainsi, nous avons pu préparer les solutions de porphyrine à des pH suffisamment basiques pour éviter la dimérisation des molécules, puis porter cette solution au pH d'étude par le premier mélange (avec du tampon acide), avant de réaliser le mélange de la porphyrine avec les vésicules lipidiques. Les changements de fluorescence induit par l'incorporation de la porphyrine (10^{-7} M) dans les liposomes ont été enregistrés, pour chaque pH, pour différentes concentrations en vésicules (5×10^{-6} M, 10^{-5} M, 2×10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 4×10^{-5} M et 5×10^{-5} M). Dans ces conditions expérimentales où les liposomes sont largement en excès par rapport à la porphyrine, l'entrée de celle-ci dans la bicouche lipidique peut être considérée comme un processus de pseudo premier ordre.

Les calculs théoriques, plus largement développés dans la référence [118], prévoient des signaux bi-exponentiels avec les constantes de vitesse k_1 et k_2 :

$$k_1 = k_{on} \times [L] + k_{off} + k_{in} + k_{ex} \quad (3.3a)$$

$$k_2 = k_{in} + k_{ex} \quad (3.3b)$$

Cependant, la vitesse de flip-flop dépend fortement de l'épaisseur de la bicouche. Ici, l'utilisation de molécules phospholipidiques de C18:1 nous permet d'avoir une épaisseur suffisante pour que le flip-flop soit lent, et ce dans toute la gamme de pH à laquelle nous avons travaillé [96]. Nous avons ainsi pu étudier

uniquement la première phase, l'entrée de la molécule dans la bicouche, en négligeant donc k_{in} et k_{ex}. De plus, dans nos conditions expérimentales, les vésicules sont en large excès. La quasi-totalité des molécules de deutéroporphyrine est donc incorporée immédiatement. L'équilibre correspondant à la première étape du schéma ci-dessus est donc fortement déplacé vers P_e. Lorsque ces molécules se répartissent de part et d'autre de la bicouche lipidique par flip-flop, le peu de porphyrine libre restant dans la solution va entrer dans le feuillet externe de la bicouche. Dans ce cas, l'amplitude de la seconde phase est extrêmement faible. De plus, les deux phases étant bien séparées dans le temps, la première peut, dans tous les cas, être analysée grâce à une mono-exponentielle dont la constante de vitesse est :

$$k^{obs} = k_{on}^{obs} \times [L] + k_{off}^{obs} \qquad (3.4)$$

où k_{on}^{obs} et k_{off}^{obs} sont respectivement les constantes de vitesse d'association et de dissociation observées expérimentalement.

L'intensité de fluorescence émise par chaque forme de la porphyrine est directement proportionnelle à sa concentration, en absence d'effet d'écran. L'intensité de fluorescence observée est la somme de toutes les contributions. Son évolution s'écrit théoriquement comme une mono-exponentielle de constante k^{obs}. Un exemple caractéristique de signal expérimental est donné figure 3.9.

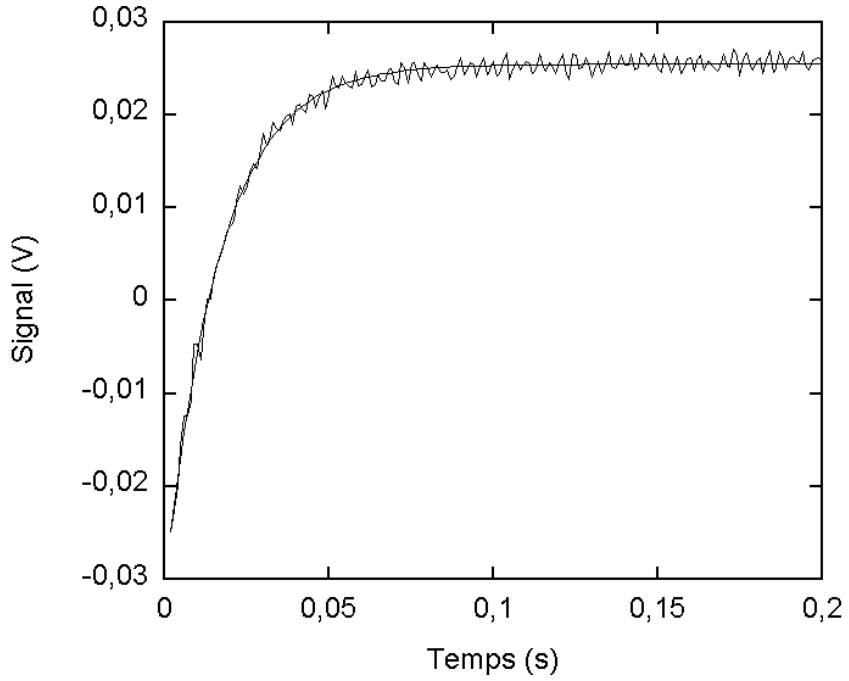


Figure 3.9 : Cinétique de l'association de la deutéroporphyrine avec des vésicules lipidiques : Evolution de l'intensité de fluorescence d'une solution de deutéroporphyrine (10^{-7} M) mélangée avec des liposomes ([C18:1] = 5×10^{-5} M). Le meilleur ajustement mono-exponentiel est superposé au signal expérimental.

Comme les spectres de la figure 3.1 le laissaient prévoir, l'incorporation de la deutéroporphyrine dans les bicouches lipidiques se traduit par une augmentation de l'intensité de fluorescence, et les signaux sont bien ajustés par des mono-exponentielles. Les constantes k^{obs} déduites de ces ajustements ont été représentées sur la figure 3.10 en fonction de la concentration en phospholipides. Les droites obtenues en accord avec l'équation (3.4) donnent accès par leur pente à k_{on}^{obs} et par leur ordonnée à l'origine à k_{off}^{obs}.

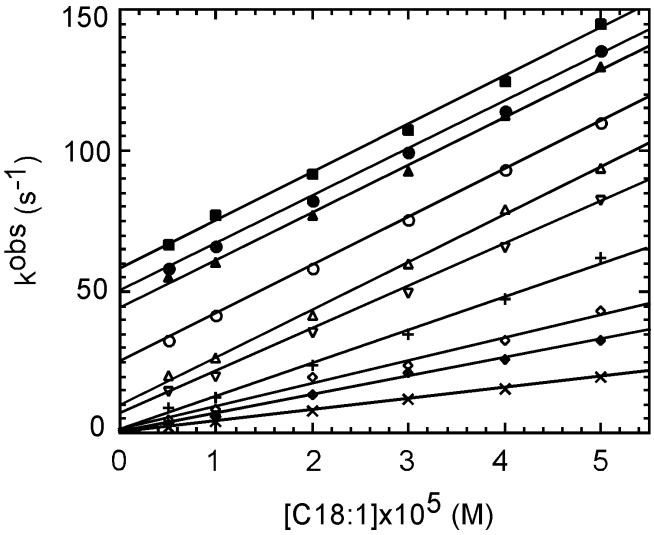


Figure 3.10 : Dépendance linéaire des constantes de vitesse expérimentales de l'association en fonction de la concentration en phospholipides aux différents pH sélectionnés : (■) 8,5 ; (●) 8,0 ; (▲) 7,5 ; (○) 7,15 ; (△) 6,6 ; (▽) 6,3 ; (+) 5,8 ; (✧) 5,2 ; (◆) 5,0 et (×) 4,5.

Les droites donnent accès par leur pente à k_{on}^{obs} et par leur ordonnée à l'origine à k_{off}^{obs}.

La figure 3.11 représente les variations de k_{on}^{obs} et k_{off}^{obs} en fonction du pH et montre à quel point ces valeurs sont influencées par le pH.

3.3.2 Corrélation entre les états d'ionisation de la porphyrine et ses constantes de vitesse d'entrée et de sortie des vésicules

La forme sigmoïde des courbes expérimentales de la figure 3.11 indique que l'interaction de la deutéroporphyrine avec les vésicules lipidiques fait intervenir différentes formes de la molécule, ayant chacune des constantes de vitesse différentes. Cependant, la forme mono-exponentielle des signaux obtenus (figure 3.9) montre clairement que ces différentes espèces ne peuvent pas être différenciées. L'équilibre entre elles est donc atteint avant les phénomènes d'association à la bicouche. En effet, le délai entre les deux mélanges est de 10 ms alors que, comme nous venons de le voir, les phénomènes de protonation/déprotonation sont extrêmement rapides. Les constantes de vitesses observées expérimentalement correspondent donc à une combinaison de celles des différentes formes de la porphyrine impliquées. De plus, l'autoassociation des molécules de porphyrines est également très rapide et il se pourrait qu'en dépit de nos précautions la formation de dimère soit déjà significative lors de la mise en présence des solutions de porphyrine et de liposome. Nous reviendrons sur ce point dans la discussion.

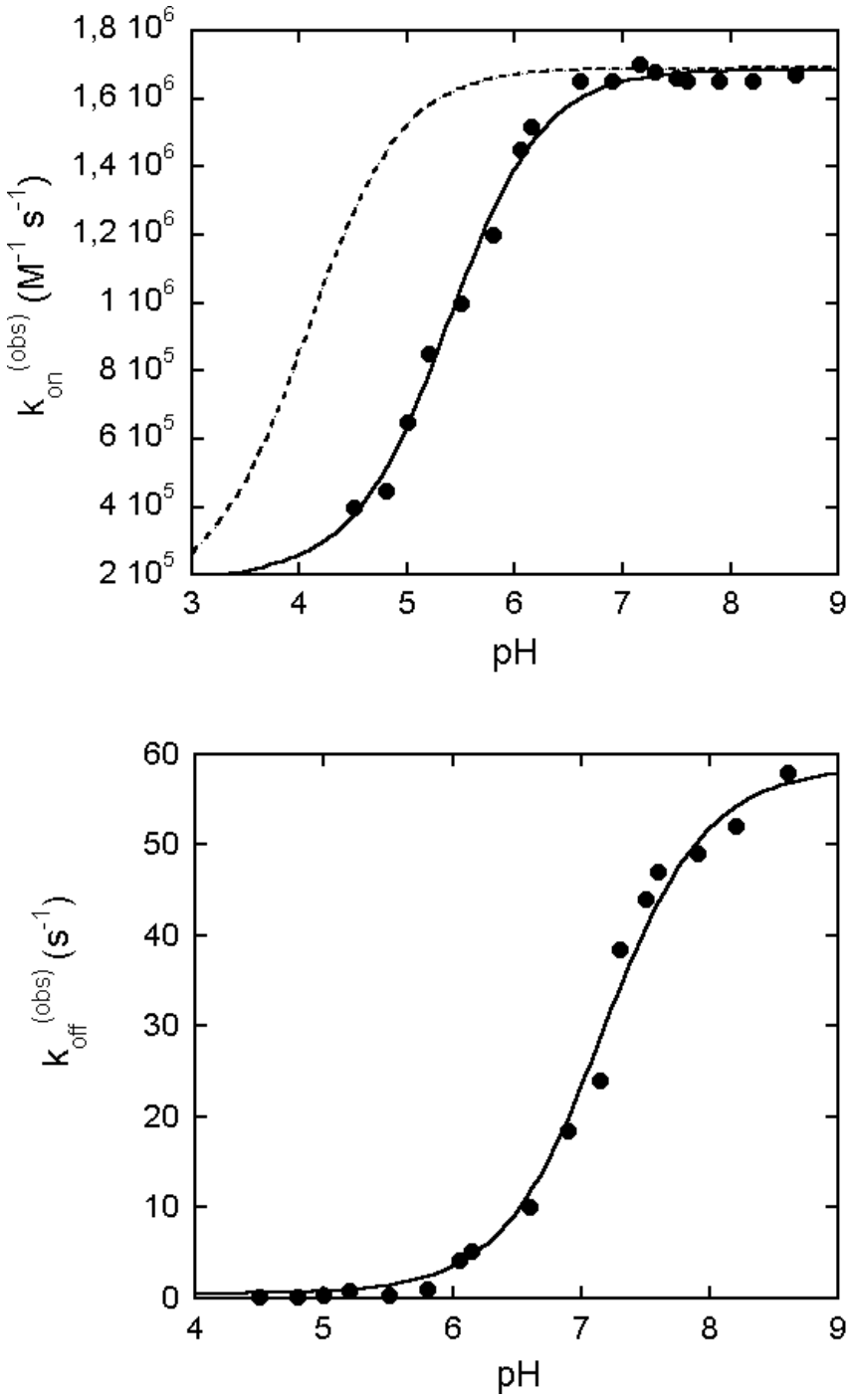


Figure 3.11 : Effet du pH sur les constantes de vitesse expérimentales de l'association (en haut) et de la dissociation (en bas) de la deutéroporphyrine aux liposomes. Les courbes pleines ont été calculées à partir des équations (3.5) et (3.6). La ligne pointillée correspond à la courbe théorique calculée en considérant le pK_a du couple gouvernant l'entrée dans la bicouche dans l'hypothèse où les phénomènes de dimérisation ne seraient pas intervenus (voir texte).

L'analyse des résultats doit donc être faite en considérant la présence, dans la solution, d'espèces différentes dont les paramètres cinétiques d'association aux membranes diffèrent. Le modèle le plus simple considère l'existence de deux espèces, A et B, correspondant à un seul couple acido-basique ayant un pK_a donné.

L'entrée dans la bicouche : La constante de vitesse d'entrée expérimentale, k_{on}^{obs}, est donc une combinaison des constantes de vitesse d'entrée des espèces A et B, c'est à dire leur somme pondérée par leur contribution à la concentration totale en porphyrine. La proportion de A et de B est respectivement de $10^{-pH}/(10^{-pH} + 10^{-pKa})$ et de $10^{-pKa}/(10^{-pH} + 10^{-pKa})$. L'expression théorique de la constante de vitesse d'entrée expérimentale est donc :

$$k_{on}^{obs} = \frac{k_{on}^{A} + k_{on}^{B} \times 10^{(pH-pKa)}}{1+10^{(pH-pKa)}} \qquad (3.5)$$

Les points de la figure 3.11 ont été ajustés par une courbe calculée à partir de l'équation (3.5). L'ajustement se fait très bien, ce qui confirme que seules deux espèces sont impliquées. La vitesse d'incorporation est plus rapide pour la forme basique, ce qui correspond effectivement aux observations cinétiques. Les valeurs déduites du meilleur ajustement sont :

$pK_a = 5{,}39$

$k_{on}^{A} = 2{,}07\times10^{5}\ M^{-1}s^{-1}$

$k_{on}^{B} = 1{,}69\times10^{6}\ M^{-1}s^{-1}$

Cependant, étant donné que les équilibres de protonation et de dimérisation sont, comme nous l'avons vu, fortement interconnectés, l'attribution des différentes formes de la porphyrine correspondant aux espèces A et B ne peut se faire simplement. L'association des molécules porphyriques à la bicouche lipidique se fait, comme nous l'avons déjà précisé, par l'intermédiaire du noyau hydrophobe. Nous pensons donc que la formation de la forme monocationique est très défavorable à l'entrée de la molécule dans la bicouche. D'ailleurs, la protonation des azotes centraux n'a jamais été mise en évidence pour des porphyrines associées à des liposomes, et ce quel que soit le pH utilisé [16]. La valeur de pK_{N1} déterminée en solution aqueuse est de 4,1. Cette valeur diffère très nettement du pK_a du couple A/B. La courbe théorique correspondante, supposant que l'entrée dans la bicouche est gouvernée par le couple PH_3^+/PH_2, est tracée en pointillés sur la figure 3.11. Les vitesses expérimentales observées sont nettement inférieures à celles calculées théoriquement sur la base de cette attribution.

Néanmoins, il faut pour juger de l'importance de cet écart, tenir compte d'une part des effets d'interfaces et d'autre part de la dimérisation. En effet, la proximité de la bicouche semble modifier la répartition des protons, et il est possible de définir un pH local différent de celui de la solution. De plus, dans la gamme de pH

correspondant à la détermination expérimentale de la valeur de pK_a, la deutéroporphyrine a tendance à former facilement des dimères. L'autoassociation fait en effet intervenir la forme neutre de la porphyrine. Le pK correspondant à cette neutralisation de la forme monoanionique, pK_{A1}, est de 5,3 en l'absence de dimères. Aux concentrations auxquelles nous travaillons, il est de 5,5. Dans ces conditions, le pK_a déterminé expérimentalement est inclus dans la « zone de dimérisation ». Or il semble que ne sont incorporés dans les vésicules que des monomères. Du moins, dans la gamme de concentrations explorée, la porphyrine n'existe que sous cette forme dans les vésicules. De plus, la structure même des dimères est très défavorable à l'entrée dans la bicouche. En effet, l'interaction avec la bicouche a lieu par le noyau porphyrique, laissant les groupes carbonés, chargés ou non, à l'extérieur. La formation de dimères par stacking cofacial, qui conduit à une répartition symétrique des chaînes carbonées autour du dimère, ne permet pas ce type d'interaction. La diminution de la vitesse d'entrée expérimentale peut donc être également attribuée, au moins en partie, à la dimérisation de la porphyrine.

La sortie de la bicouche : L'analyse des effets du pH sur le processus de sortie est facilitée par le fait que nous connaissons déjà les espèces impliquées. En effet, lorsque les porphyrines sont incorporées dans les vésicules lipidiques, elles sont sous forme monomérique. Il n'y aura donc, dans ce cas, aucun effet de dimérisation. D'autre part, seules les formes neutre, anionique et dianionique possèdent une affinité notable pour les bicouches [16]. L'influence du pH sur la sortie des molécules de la bicouche se fait donc sentir du fait des équilibres de protonation des chaînes carboxyliques :

$$PH_2(L) \underset{}{\overset{K_{A1}(L)}{\rightleftharpoons}} PH^-(L) \overset{K_{A2}(L)}{\rightleftharpoons} P^{2-}(L)$$

La lettre L indique ici les espèces incorporées dans les lipides. La contribution de chacune de ces formes de la porphyrine a été calculée comme précédemment. L'expression théorique de k_{off}^{obs} est donc :

$$k_{off}^{obs} = \frac{k_{off}^{(2-)} + k_{off}^{(-)} \cdot 10^{(pK_{A2}-pH)} + k_{off}^{(0)} \cdot 10^{(pK_{A1}+pK_{A2}-2pH)}}{1 + 10^{(pK_{A2}-pH)} + 10^{(pK_{A1}+pK_{A2}-2pH)}} \quad (3.6)$$

où $k_{off}^{(2-)}$, $k_{off}^{(-)}$ et $k_{off}^{(0)}$ sont respectivement les constantes de vitesse de sortie de P^{2-}, PH^- et PH_2. Le meilleur ajustement entre les points expérimentaux et la courbe théorique donne $pK_{A1}(L) = 6{,}9$ et $pK_{A2}(L) = 7{,}1$ ainsi que $k_{off}^{(2-)} = 58{,}6\ s^{-1}$, $k_{off}^{(-)} = 23{,}5\ s^{-1}$ et $k_{off}^{(0)} = 0{,}46\ s^{-1}$. Ces valeurs de pK_{A1} et pK_{A2} à l'interface phospholipide/eau sont très proches. Elles sont, en fait, difficiles à distinguer clairement sur la sigmoïde de la figure 3.11. Un tel déplacement des valeurs des pK des porphyrines lorsqu'elles sont associées à des vésicules a cependant déjà été observé [130].

D'autre part, bien que la précision des valeurs attribuées à $k_{off}^{(2-)}$, $k_{off}^{(-)}$ et $k_{off}^{(0)}$ soit sans doute assez faible du fait du grand nombre de paramètres ajustables, il apparaît clairement que la forme dianionique de la porphyrine sort plus facilement de la bicouche. Ce résultat corrobore ceux obtenus auparavant en utilisant la méthode basée sur le transfert à l'albumine [96, 97]. On peut supposer que les charges des chaînes carbonées limitant l'enfoncement de la molécule dans la bicouche, elles en facilitent la sortie.

3.4 Discussion des résultats et du modèle proposé

Malgré nos précautions, les processus de dimérisation étaient notablement avancés lors du prémélange, avant même que le mélange des solutions étudiées ne soit réalisé. L'incorporation des porphyrines dans la bicouche lipidique est donc à la fois influencée par les équilibres de protonation et par les phénomènes de dimérisation.

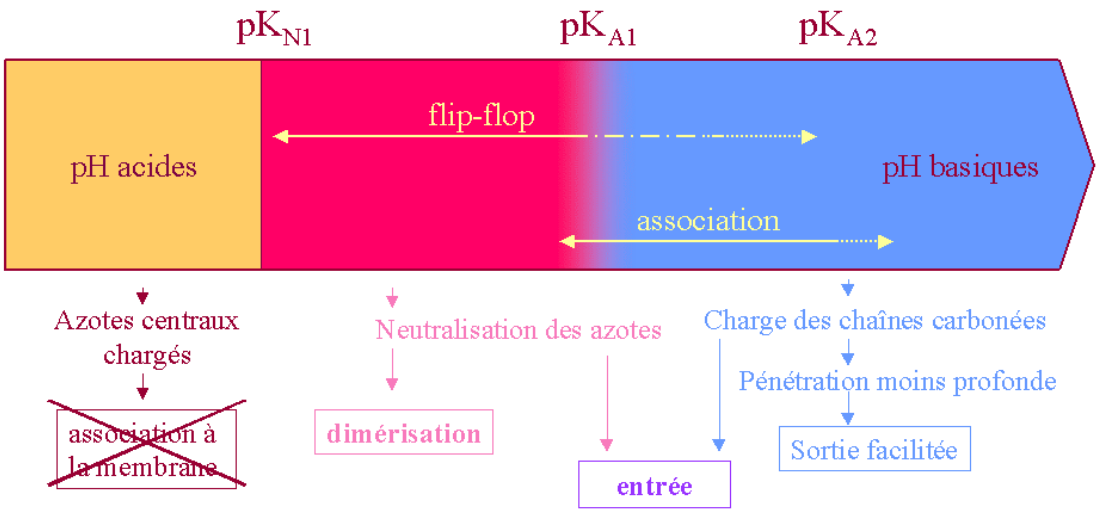
Les mécanismes mis en œuvre lors de cette association de la deutéroporphyrine avec des liposomes peuvent cependant être appréhendés plus facilement si la valeur de k_{on}^{obs} est exprimée non pas en fonction de la concentration en phospholipides constituant les vésicules, mais directement en fonction du nombre de ces dernières. La surface d'une tête choline est d'environ 0,75 nm^2. Le diamètre des liposomes utilisés est de 77 nm, chacun étant constitué de 43500 molécules lipidiques. La valeur expérimentale maximale de k_{on}^{obs}, mesurée à pH 7, est donc de $7{,}4\times10^{10}$ $vésicules^{-1}s^{-1}$. Il nous est, de la sorte, possible de la comparer avec la valeur limitée par diffusion :

$$k_D = 4\pi.(R_V+R_P).(D_V+D_P).N$$

où R_V et R_P sont respectivement les rayons des vésicules et des molécules de porphyrine, D_V et D_P leurs coefficients de diffusion et N le nombre d'Avogadro. k_D peut être déterminée et vaut $1{,}1\times10^{11}$ $M^{-1}s^{-1}$. Cette valeur est très proche de celle déterminée expérimentalement, et la faible différence peut sans conteste être attribuée à un facteur d'orientation. L'association de la deutéroporphyrine aux liposomes est donc un processus par diffusion.

De plus, nos travaux ont montré que la dynamique de cette interaction est fortement influencée par le pH de la solution. Des études précédentes réalisées au laboratoire ont montré, comme nous l'avons déjà souligné, que le flip-flop est favorisé par la neutralisation des chaînes carboxyliques de la porphyrine [96, 97]. Une relative acidité du milieu externe est donc un facteur facilitant la traversée de la membrane. Notre étude montre les limites de cet effet facilitant puisque, au contraire, des pH relativement basiques sont nécessaires pour que la porphyrine, dont le noyau est non chargé dans ces conditions, puisse pénétrer dans la bicouche. Ces phénomènes sont de plus modulés par les mécanismes de dimérisation des molécules

porphyriques. La neutralisation des azotes centraux peut, en effet, faciliter l'entrée des porphyrines dans les vésicules, mais la neutralisation totale des molécules favorise leur autoassociation, ce qui empêche leur association aux lipides. Les charges des groupes carboxyliques limitent la dimérisation et permettent donc l'incorporation de la molécule. De plus, ces chaînes polaires restent, lors de l'interaction avec les membranes, en contact avec le milieu extérieur. Elles contrôlent donc la profondeur de l'enfouissement de la molécule dans la bicouche, et donc la vitesse de sortie. En effet, moins la molécule est enfouie profondément et plus sa sortie sera facile. Il existe donc une gamme de pH correspondant à la « zone d'efficacité » pour le transfert des porphyrines à travers les membranes. Cette fenêtre, relativement étroite, est grossièrement comprise entre la zone de neutralité de la molécule et la zone où les deux chaînes carboxyliques sont chargées.



3.5 Conclusion

In vivo, les conditions physico-chimiques du milieu extracellulaire jouent donc certainement un rôle clé dans les processus d'incorporation des porphyrines dans les cellules. Son acidification relative dans les tumeurs (autour de pH 6,9) est dans la « zone d'efficacité » d'association. De plus, le pH du milieu intracellulaire, légèrement plus basique que le pH externe (7,4), rend la sortie de la molécule plus aisée du côté cytoplasmique que vers le liquide extracellulaire. L'acidification du pH interstitiel dans les tumeurs contribue donc positivement à la rétention des molécules porphyriques dans ces tissus.

D'autre part, la distribution cellulaire des porphyrines, même si l'entrée a eu lieu par endocytose par exemple via les LDL, doit être également sous contrôle de ce type de phénomènes dus aux états d'ionisation de la molécule. Dans ce cas, en effet,

les molécules sont libérées dans les endosomes dont le pH est, au départ, identique à celui du milieu intracellulaire. L'évolution de ces organites consiste notamment en l'acidification progressive de leur phase aqueuse interne, conduisant à la formation de lysosomes. Lorsque le pH atteint la « zone d'efficacité » de l'association des porphyrines aux membranes, ces molécules quittent donc le milieu intralysosomial par simple diffusion. Il faut cependant noter que l'acidification des lysosomes se poursuit, leur pH final étant autour de 5. Si l'évolution de l'organite est suffisante pour qu'il reste encore des molécules lorsque ce pH est atteint, celles-ci se retrouveront retenues dans le lysosome. La probabilité d'un tel événement augment, évidemment, avec la concentration de la porphyrine dans l'organite.

CHAPITRE 4 : RESULTATS 2 – Interaction de la porphyrine avec des LDL

Résumé

Les LDL jouent vraisemblablement un rôle clé dans l'entrée des porphyrines dans les cellules hyperproliférative. L'interaction de la deutéroporphyrine, un archétype des porphyrines dicarboxyliques, avec les LDL a été examinée à l'équilibre et dans des conditions dynamiques. Les changements de la fluorescence da l'apoprotéine et de la porphyrine permettent l'identification de deux classes de fixation. La première classe, nommée *classe P*, est caractérisée par l'extinction de la fluorescence du tryptophane et implique 4 sites bien définis, vraisemblablement près de l'apoprotéine. La constante d'affinité par site est de $8{,}75\times10^{7}$ M^{-1} (affinité cumulée $3{,}5\times10^{8}$ M^{-1}). La deuxième classe, *classe L*, correspond à l'incorporation d'environ 50 molécules de porphyrine dans la couche lipidique externe des LDL, avec une constante globale d'affinité de 2×10^{8} M^{-1}. Deux types d'expériences de stopped-flow ont permis de mieux caractériser les paramètres cinétiques de ces fixations : d'une part le mélange direct des LDL avec la porphyrine et, d'autre part, le transfert de la porphyrine à partir des LDL préchargés vers la HSA. Les constantes de vitesse de dissociation pour les fixations de classes P et L sont respectivement de 5,8 et 15 s^{-1} alors que les constantes de vitesse d'association sont de 5×10^{8} $M^{-1}s^{-1}$ par site de *classe P* et de 3×10^{9} $M^{-1}s^{-1}$ pour la fixation dans les lipides. La fluorescence de la porphyrine, caractéristique d'un environnement lipidique, et la comparaison de la valeur des constantes de vitesse d'association avec la limite par diffusion indiquent que la *classe P* implique des régions à la frontière entre l'apoprotéine et la phase de lipidique des LDL. La rapidité des interactions porphyrine-LDL est très clairement mise en évidence.

Chapitre 4

INTERACTION LDL-PORPHYRINE

Dans la première partie de notre étude, nous avons déterminé l'influence du pH sur l'association de la deutéroporphyrine aux vésicules lipidiques. Nous avons notamment montré de quelle façon l'existence de différents états d'ionisation de la molécule permet d'expliquer comment un gradient de pH entre milieu extra- et intra-vésiculaire favorise l'incorporation de la deutéroporphyrine dans les liposomes. Ce type de processus permet notamment aux cellules néoplastiques d'incorporer préférentiellement les porphyrines, qui pénètrent par diffusion passive. Cependant, nous avons souligné lors de l'introduction que les porphyrines sont transportées, dans l'organisme, par les LDL. Cette association influence sans doute leur entrée dans les cellules. De nombreux auteurs estiment même que les LDL jouent un rôle important dans le ciblage des photosensibilisateurs vers les cellules en hyperprolifération comme les cellules tumorales [73-75, 131]. La répartition dans l'organisme d'un certain nombre de porphyrines a même été mise en relation avec le nombre relatif de récepteurs aux LDL (récepteurs « B/E ») dans les différents tissus [132]. De plus, la lovastatine, qui améliore l'efficacité du catabolisme des LDL, augmente l'incorporation cellulaire et l'efficacité photodynamique de ces colorants [133] alors qu'au contraire les cellules tumorales résistantes aux traitements par PDT présentent un très petit nombre de récepteurs « B/E ». Il semble donc que l'incorporation par endocytose spécifique via les LDL soit un facteur essentiel à la sélectivité des agents photosensibilisants pour les tissus néoplastiques, que ce soit pour le traitement des tumeurs [70], de certaines lésions liées à l'artériosclérose [134] ou des néo-vaisseaux choroïdiens associés à la forme humide de la DMLA [76].

4.1 Généralités

Lors de leur association aux LDL, les porphyrines peuvent a priori se répartir entre les trois composants de ces particules : l'apoprotéine, les phospholipides de surface et le cœur hydrophobe de cette structure (figure 4.1). L'efficacité du transport est évidemment liée au nombre total de molécules exogènes que chaque LDL peut fixer. Néanmoins, l'intégrité de la lipoprotéine, et plus particulièrement de sa partie protéique, site de reconnaissance spécifique des récepteurs « B/E », doit être préservée lorsque les porphyrines se fixent.

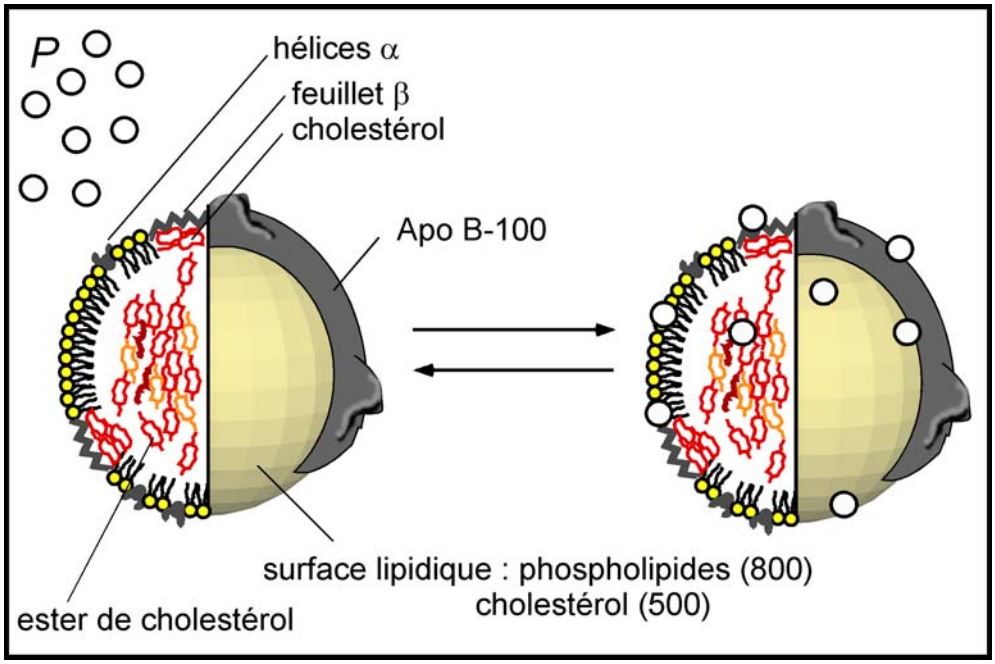


Figure 4.1 : Fixation de la deutéroporphyrine (P) aux LDL. Différents types possibles d'association de cette molécule, correspondant chacun à sa fixation à l'un des différents compartiments du LDL.

D'autre part, l'appréhension des aspects dynamiques de cette interaction vont nous permettre d'évaluer les possibilités d'échanges de porphyrines entre les LDL et les autres transporteurs plasmatiques. En effet, la répartition du photosensibilisateur entre ces protéines pourrait vraisemblablement être modifiée par les changements de l'environnement physico-chimique. En outre, le pH exerçant un effet important sur l'affinité des porphyrines pour les lipides, il parait probable que l'acidification des tissus néoplastiques puisse influencer également l'affinité de ces molécules pour les lipoprotéines, au moins dans la mesure où une part non négligeable de celles-ci peut potentiellement s'associer à la phase lipidique des LDL. Le micro-environnement tumoral, par exemple, pourrait modifier la répartition de la porphyrine entre ses transporteurs potentiels.

Comme nous l'avons spécifié dans le premier chapitre, les propriétés de fluorescence des porphyrines sont sensibles à l'environnement. La figure 4.2 montre clairement la différence entre les spectres d'excitation de fluorescence de la deutéroporphyrine en solution aqueuse, associée aux LDL ou fixée à la HSA. Le spectre d'émission de fluorescence est également modifié par l'environnement de la porphyrine (figure 4.3). La bande principale, à 609 nm en milieu aqueux, se décale d'une douzaine de nanomètres vers le rouge lorsque la deutéroporphyrine est incorporée dans des vésicules lipidiques ou associée aux LDL. Il faut à ce propos noter que les spectres de la porphyrine associée aux LDL sont similaires à ceux obtenus dans les vésicules et sont caractéristiques d'un environnement hydrophobe.

La seule différence, observable dans le spectre d'excitation, est la présence d'une bande à 280 nm lorsque la molécule est associée aux LDL, bande qui est absente du spectre quand la porphyrine est incorporée dans les vésicules. Enfin, lorsqu'elle est associée à l'albumine (HSA), la bande principale du spectre d'émission se situe à 623 nm.

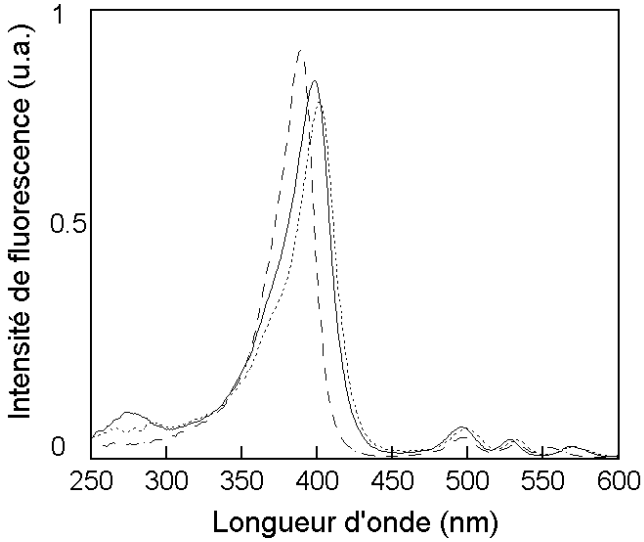


Figure 4.2 : Spectre d'excitation de fluorescence de la deutéroporphyrine (5×10^{-8} M) dans du tampon phosphate, PBS (- -), associée aux LDL (10^{-7} M) (——) et à la HSA, albumine de sérum humain, (5×10^{-6} M) (···). La longueur d'onde d'émission était fixée à 625 nm. Pour les concentrations faibles, comme ici, ce spectre est superposable au spectre d'absorption.

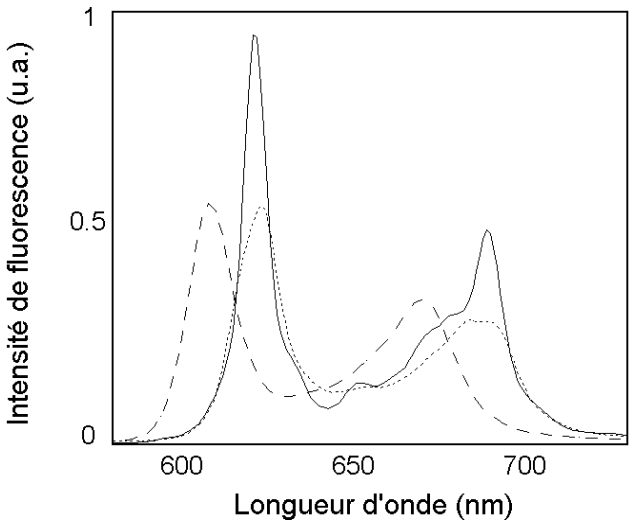


Figure 4.3 : Spectre d'émission de fluorescence de la deutéroporphyrine (5×10^{-8} M) dans du tampon phosphate, PBS (- - -), associée aux LDL (10^{-7} M) (———) et à la l'albumine de sérum humain, HSA (5×10^{-6} M) (·····). La longueur d'onde d'excitation était fixée à 395 nm. Le spectre de la DP incorporée dans des vésicules lipidiques est identique à celui de la DP associée aux LDL.

Pour suivre l'association de la DP aux LDL, tout comme pour suivre son transfert des LDL vers la HSA, il suffit donc d'observer l'évolution du signal de fluorescence du photosensibilisateur. Nous exciterons alors la solution à 395 nm, ce qui correspond à la longueur d'onde pour laquelle la variation des signaux observés est généralement la plus forte.

La fixation de la porphyrine à proximité immédiate de l'apoprotéine, voire directement à celle-ci, sera détectée en suivant non pas les modifications de fluorescence du ligand, mais celles de la fluorescence intrinsèque de l'apoprotéine. En effet, comme le montre la figure 4.4, il existe un recouvrement significatif entre le spectre d'émission des LDL et le spectre d'absorption de la DP. La fluorescence des lipoprotéines est due aux résidus tryptophanes de l'apoB-100. Si les molécules de porphyrine fixées sont suffisamment proches de l'apoprotéine, un transfert d'énergie (FRET) des résidus tryptophanes, excités, vers la porphyrine est donc possible. Selon l'équation de Förster, l'efficacité du transfert dépend en $1/r^6$ de la distance entre les deux molécules. La distance de Förster, correspondant à un transfert de la moitié de l'énergie, est d'environ 1,7 nm pour le couple porphyrine-tryptophane [5]. Ainsi, l'association des molécules de porphyrine à proximité des résidus de tryptophane, c.-à-d. leur fixation à l'apoprotéine B-100 ou à la frontière entre la protéine et les lipides, peut être caractérisée par FRET.

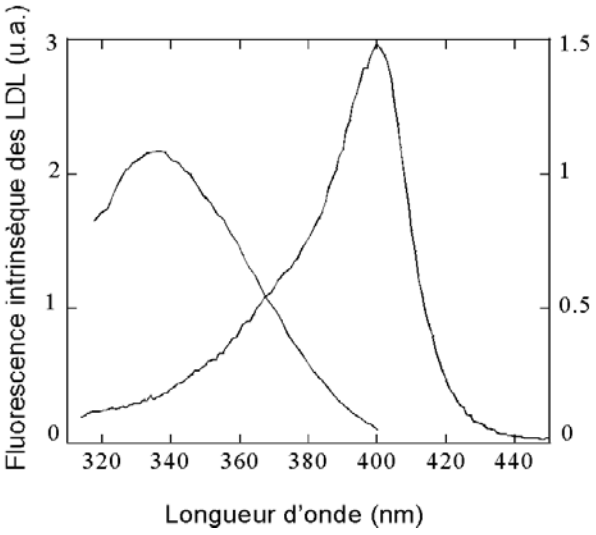


Figure 4.4 : Spectre d'émission de fluorescence des LDL en absence de deutéroporphyrine (excitation à 280 nm, axe de gauche) et spectre d'absorption de la deutéroporphyrine associée aux LDL, corrigé pour l'absorption des LDL (axe de droite). Le recouvrement spectral démontre la faisabilité d'un transfert d'énergie de fluorescence (FRET) entre les deux molécules.

4.2 Etude à l'équilibre : quantification de la fixation de la DP aux LDL

4.2.1 En suivant le « quenching » du tryptophane

Le spectre d'excitation de fluorescence de la deutéroporphyrine dans les LDL présente un pic à 280 nm correspondant au maximum d'excitation du couple tyrosine/tryptophane dans la protéine. Etant donné que la DP seule ne fluoresce pas lorsqu'elle est excitée à cette longueur d'onde, ce pic correspond forcément au transfert de l'énergie de fluorescence de ces deux acides aminés, excités, vers la porphyrine (figure 4.5). Ce phénomène indique clairement qu'il existe des sites de fixation de la porphyrine sur l'apoprotéine ou directement à l'interface protéine-lipides.

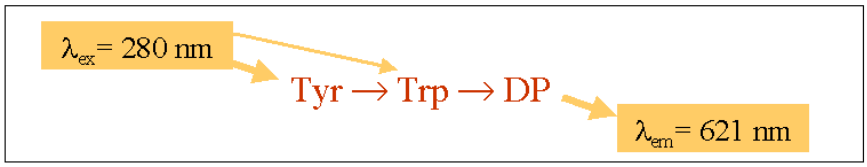


Figure 4.5 : Mise en évidence de la fixation de la DP à proximité des résidus tyrosine ou tryptophane de l'apoprotéine : Transfert d'énergie de fluorescence des tryptophanes de l'apoprotéine à la deutéroporphyrine.

La distance de Förster correspondant au transfert Trp → DP est d'environ 1,7 nm.

Afin de mieux caractériser cette fixation, nous avons ajouté à une solution de LDL des concentrations croissantes de deutéroporphyrine et mesuré les spectres d'émission de fluorescence en excitant l'apoB-100 à 280 nm. Comme le montre la figure 4.6a, l'association de la deutéroporphyrine aux LDL induit effectivement une diminution de l'intensité de la fluorescence intrinsèque de l'apoprotéine et cette diminution est fonction de la concentration en porphyrine ajoutée à la solution de LDL.

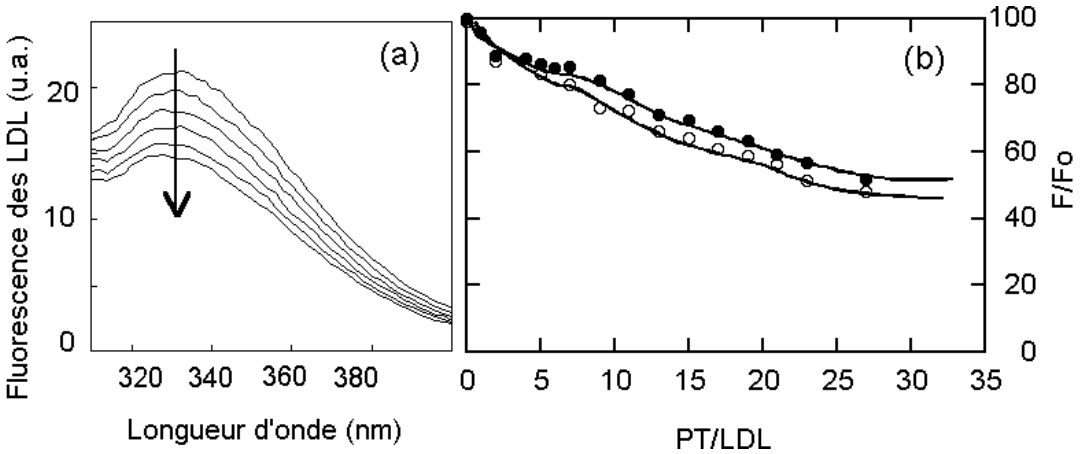


Figure 4.6 : Quenching de la fluorescence intrinsèque des LDL (λ_{ex} = 280 nm) induit par la fixation de la deutéroporphyrine. (a) Spectres de fluorescence des LDL (4×10^{-8} M) en fonction des quantités croissantes de deutéroporphyrine ajoutées, c'est à dire de la concentration totale en porphyrine (P_T). P_T/LDL = 0,5,7,11,15 et 19 dans le sens de la flèche. (b) Intensité relative de la fluorescence (F/F_0, %) à 330 nm en fonction de P_T/LDL. • : [LDL] = 4×10^{-8} M ; ○ : [LDL] = 6×10^{-8} M. L'intensité de fluorescence pour P_T = 0 est normalisée à 100%.

La figure 4.6b montre l'importance de la diminution des valeurs de F/F_0 pour des ajouts en porphyrine relativement faibles et démontre clairement l'existence de sites de fixation de forte affinité, que nous allons déterminer. Le fait que la fixation d'une molécule de porphyrine sur ce type de site conduise à un quenching de la fluorescence de l'apoB-100 nous a permis de définir un premier type de sites, que nous avons dénommés sites de *classe P*. Cependant, la diminution de fluorescence

observée n'est pas nécessairement proportionnelle à la quantité de porphyrines associées aux LDL. En effet, pour chaque molécule fixée, l'efficacité du transfert de l'énergie de fluorescence dépend non seulement de la distance qui sépare cette molécule du résidu tryptophane le plus proche, mais aussi de leur orientation relative. Ces deux paramètres rendent en effet l'établissement d'un couplage dipôle-dipôle, sur lequel repose le FRET, plus ou moins facile.

Les paramètres de cette interaction LDL-deutéroporphyrine de *classe P* ont été déterminés en utilisant la méthode développée par Nishida [35]. Pour cela, nous avons réalisé l'expérience décrite précédemment à deux concentrations de LDL choisies suffisamment proches. En effet, la mesure du quenching de la fluorescence de l'apoB-100 ne donne qu'un accès indirect à la fixation de la porphyrine. Effectuer des mesures à deux concentrations différentes permet, en jouant sur le déplacement d'équilibre que ce changement implique, de s'affranchir de tous les paramètres liés aux propriétés de l'apoprotéine, notamment des effets de l'orientation des sites et de leur distance aux tryptophanes. Cette méthode peut-être résumée comme suit.

Par définition, quelle que soit la concentration en LDL, la conservation de la matière implique :

$$P_F = LDL \times \left(\frac{P_T}{LDL} - \nu \right) \tag{4.1}$$

où ν est le nombre de molécules de porphyrine fixées par LDL, avec LDL représentant, dans cette équation, la concentration en lipoprotéine.

La méthode est basée sur le fait qu'il existe des paires (P_T, LDL) qui conduisent à la même valeur de ν. Pour deux paires notées a et b, l'équation (4.1) permet donc d'écrire que :

$$\nu = \frac{(P_{Ta}/LDL_a) - \frac{LDL_b}{LDL_a}(P_{Tb}/LDL_b)}{1 - \frac{LDL_b}{LDL_a}} \tag{4.2}$$

$$P_F = \frac{LDL_a \times LDL_b}{LDL_a - LDL_b}\left[(P_{Tb}/LDL_b) - (P_{Ta}/LDL_a)\right] \tag{4.3}$$

Si l'on considère que la fixation du même nombre de molécules par LDL (i.e. la même valeur de ν) se traduit par les mêmes changements des propriétés de fluorescence de la protéine, ces deux paires correspondront au même $\Delta(F/F_0)$.

Concrètement, des paires (P_T,LDL) correspondant au même $\Delta(F/F_0)$ sont sélectionnées. Les équations précédentes permettent de calculer les valeurs de ν et P_F correspondantes, et ces données sont représentées selon la méthode de Scatchard :

$$\frac{\nu}{P_F} = nK_i - \nu K_i \qquad (4.4)$$

Cette représentation, donnée en figure 4.7, permet de mettre en évidence l'existence de 4 sites de *classe P* (les ajustements des différentes données expérimentales donnent 3,98±0,5 sites), ayant chacun une affinité intrinsèque très proche, de l'ordre de $(9\pm3{,}0)\times10^7$ M^{-1}. La constante d'affinité globale correspondant à ce premier type de fixation est donc $K_P = (3{,}6\pm1{,}2)\times10^8$ M^{-1}.

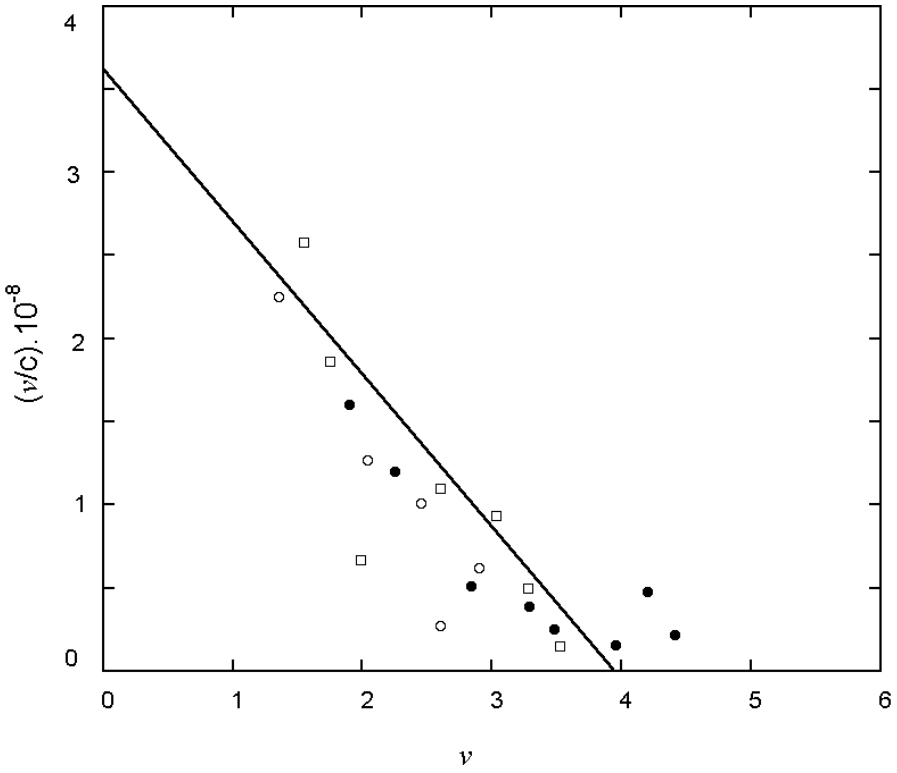


Figure 4.7 : Quantification de l'association de la deutéroporphyrine aux LDL en suivant les changements de la fluorescence à 330 nm, excitée à 280 nm. Les points ont été calculés selon la méthode de Halfman et Nishida, et représentés en accord avec la méthode classique de Scatchard. Les symboles représentent des LDL d'origines différentes : ●,○ : LDL préparés à l'Hôpital Nord d'Amiens, □ : LDL commerciaux.

Il faut remarquer que cette étude a été mise en œuvre sur des LDL de provenances différentes dont certains, provenant de l'hôpital Nord d'Amiens, avaient été prélevés sur un petit nombre de personnes et ne constituaient donc pas un échantillonnage représentatif de la diversité des LDL [105, 106, 135]. La conservation de ces 4 sites sur (ou à proximité de) toutes les apoprotéines est donc un fait particulièrement remarquable. La précision relativement faible des valeurs obtenues pour la constante d'affinité peut en partie être appréhendée au regard de cette diversité. Elle découle toutefois également de façon intrinsèque de la

méthodologie indirecte utilisée. Ces valeurs seront néanmoins confirmées par les études réalisées en suivant directement la fluorescence de la porphyrine.

4.2.2 En suivant les changements de fluorescence de la DP : schéma global de la fixation

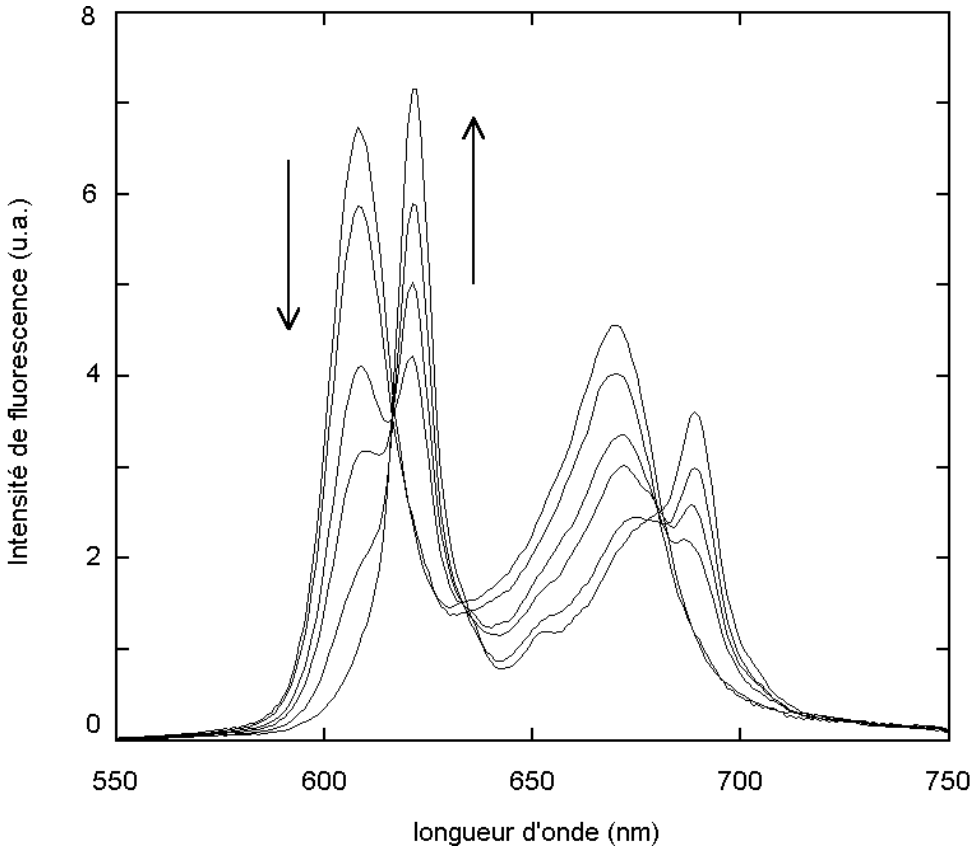


Figure 4.8 : Spectres de fluorescence de la deutéroporphyrine (2×10^{-7} M) en présence de différentes quantités de LDL. Longueur d'onde d'excitation : 395 nm. Concentrations en LDL : 0, 5, 20, 30, 60 et 400 $\times10^{-10}$ M. Les flèches indiquent la direction des changements de spectres pour une augmentation de la quantité de LDL.

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'association de la deutéroporphyrine aux LDL conduit à un changement important de son spectre d'émission de fluorescence sous excitation à 395 nm. Nous avons donc, dans un premier temps, suivi l'évolution de ce spectre en ajoutant des quantités croissantes de LDL à une solution de porphyrine (figure 4.8). Les spectres obtenus sont très similaires aux spectres de la DP dans un environnement lipidique [13, 118]. Nous y reviendrons plus longuement, mais remarquons d'ores et déjà que chaque LDL fixe largement plus de 4 porphyrines. En effet, à la plus forte concentration en lipoprotéine utilisée, toute la porphyrine est incorporée alors que le rapport DP/LDL est d'environ 7. La fixation

de la porphyrine aux lipoprotéines fait donc intervenir au moins un second type de fixation, qui n'induit pas de quenching de la fluorescence à 330 nm de l'apoB-100 et implique la partie lipidique des LDL, soit la surface soit le cœur de cholestérol. De ce fait, nous l'avons défini comme fixation de *classe L*. Néanmoins, lorsque la concentration en LDL est suffisante pour fixer toute la porphyrine, la forme des spectres d'émission et d'excitation ne dépend pas du rapport DP/LDL. Les propriétés de fluorescence de toutes les formes fixées de la porphyrine sont donc similaires, et nous ne les distinguerons donc pas.

La solution de porphyrine utilisée est à une concentration suffisamment faible pour qu'aucun effet d'écran ne se produise. A une longueur d'onde donnée, la fluorescence des solutions correspond donc à la combinaison linéaire de celle de chaque forme de la porphyrine. En ne distinguant que la porphyrine libre (P_F), dont le maximum d'émission est à 609 nm, et la porphyrine liée aux LDL (P_B), qui fluoresce plus dans le rouge (621 nm), la fluorescence à ces deux longueurs d'onde s'écrit :

$$F_{609} = f_{B,609} \times P_B + f_{F,609} \times P_F \qquad (4.5a.)$$

$$F_{621} = f_{B,621} \times P_B + f_{F,621} \times P_F \qquad (4.5b.)$$

Les facteurs $f_{F,609}$, $f_{F,621}$, $f_{B,609}$ et $f_{B,621}$ ont été déterminés grâce à des expériences de calibrage, d'une part sur des solutions de porphyrine seule à différentes concentrations, et d'autre part de la même façon avec de la porphyrine liée à des LDL (en excès). A partir de ces équations, les concentrations P_F et P_B ont été déterminées pour toutes les solutions dont les spectres ont été mesurés et dont certains sont donnés en figure 4.8. La quantité de deutéroporphyrine fixée augmente avec la quantité de LDL ajoutée, et atteint un plateau qui correspond à l'incorporation de toute la porphyrine présente dans la solution (figure 4.9).

L'évolution de P_B obéit à l'équation ci-dessous, définissant la constante d'affinité globale de la porphyrine pour les LDL :

$$K_{LDL} = \frac{P_B}{P_F \cdot LDL} \qquad (4.6)$$

Il s'ensuit que :

$$P_B = \frac{K_{LDL} \cdot LDL}{1 + K_{LDL} \cdot LDL} \cdot P_T \qquad (4.7)$$

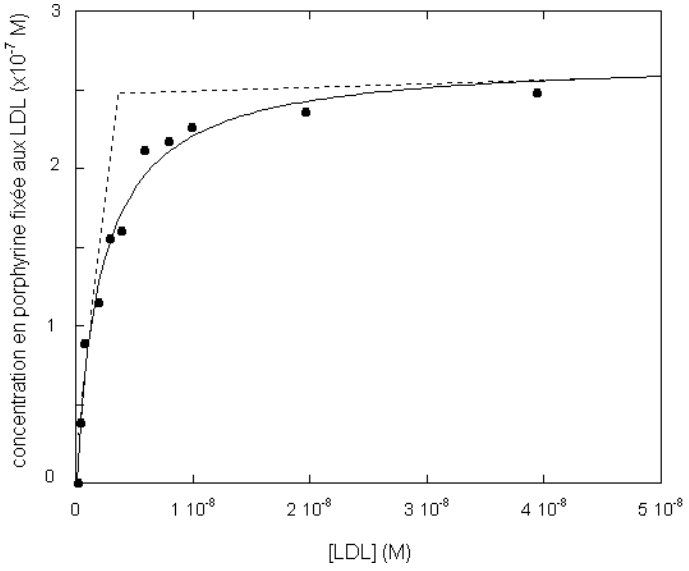


Figure 4.9 : Concentration en deutéroporphyrine fixée (P_B) en fonction de la concentration en LDL dans la solution, calculée comme indiqué dans le texte à partir des mesures correspondant à la figure 4.8. La courbe correspond au meilleur ajustement des valeurs expérimentales par l'équation (4.7). Elle donne ici $K_{LDL} = 4{,}9\times10^{8}\ M^{-1}$.

Sur l'ensemble des expériences réalisées selon le même protocole, la valeur de K_{LDL} déduite à partir de nos données expérimentales est de $(5{,}8\pm1{,}2)\times10^{8}\ M^{-1}$. L'intersection entre le niveau de plateau et la pente initiale de la courbe indique qu'environ 4×10^{-9} M de LDL peut incorporer autour de 2×10^{-7} M de deutéroporphyrine, ce qui signifie que chaque particule peut fixer une cinquantaine de molécules de porphyrine. Ce résultat est en bonne adéquation avec d'autres mesures faites dans les mêmes conditions avec d'autres porphyrines [74, 75].

Dans un second temps, nous avons voulu approfondir ces résultats afin de proposer une vue d'ensemble de ces associations. Il nous fallait donc distinguer la fixation de *classe P* et la fixation de *classe L*. Nous avons pour cela utilisé la méthode de Scatchard qui permet d'établir des modèles de fixation impliquant plusieurs types de sites. Dans ce cadre, la fixation globale est décrite par :

$$\frac{\nu}{P_F} = \frac{n_P \times K_{Pi}}{1 + P_F \times K_{Pi}} + \frac{n_L \times K_{Li}}{1 + P_F \times K_{Li}} \qquad (4.8)$$

où K_{Pi}, K_{Li}, n_P, n_L sont les constantes d'affinité intrinsèques et le nombre de site correspondant respectivement à la fixation de *classe P* et de *classe L*.

Cependant, les interactions de *classe L*, dans les lipides, ne correspondent pas à la fixation des molécules de deutéroporphyrine sur des sites ponctuels et matériels. Cette fixation serait en fait mieux appréhendée en considérant qu'il s'agit d'un phénomène de partage entre phase aqueuse et phase lipidique des LDL. Nous avons donc réécrit l'équation (4.8) en conservant le même formalisme, mais en intégrant le fait que les molécules peuvent s'incorporer en un très grand nombre de localisations

lipidiques, de « sites », ayant donc chacun une très petite affinité intrinsèque ($P_F \times K_{Li} << 1$). Dans l'équation (4.8), on a alors :

$$\frac{n_L \times K_{Li}}{1 + P_F \times K_{Li}} \rightarrow n_L \times K_{Li}$$

Nous pouvons donc définir une constante d'affinité macroscopique pour la fixation de *classe L*, $K_L = n_L \times K_{Li}$. Il s'ensuit que :

$$\frac{\nu}{P_F} = \frac{n_P \times K_{Pi}}{1 + P_F \times K_{Pi}} + K_L \qquad (4.9)$$

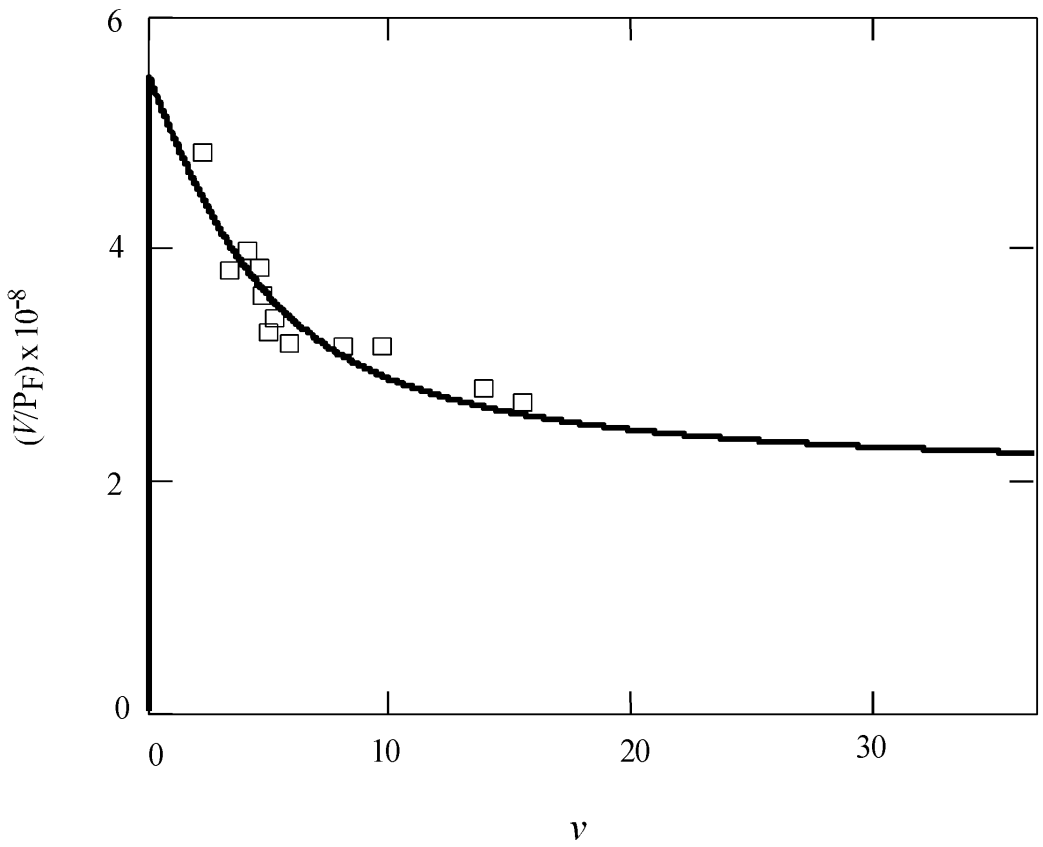


Figure 4.10 : Quantification de la fixation en suivant les changements de la fluorescence de la porphyrine excitée à 395 nm. La courbe a été calculée et simulée par ajustement d'après l'équation (4.9). Les paramètres de fixation obtenus sont donnés dans le tableau 4.1.

A partir des spectres d'émission de fluorescence de solutions contenant toujours la même concentration en LDL, et des quantités croissantes de porphyrine, les équations (4.5) nous ont permis de déduire les concentrations P_F et P_B correspondantes. L'ajout de ces concentrations de plus en plus importantes de porphyrines conduit à la saturation progressive des LDL. La quantité de DP fixée

augmente, et atteint un plateau qui correspond à 55 molécules par lipoprotéine, ce qui est en très bon accord avec nos résultats précédents. Les points de Scatchard obtenus à partir de nos données ont été ajustés, par régression non linéaire, par la relation donnée par l'équation (4.9). Nous avons pour cela utilisé le logiciel MathCad. La figure 4.10 montre bien l'aspect bi-phasique des points de Scatchard expérimentaux et de la courbe théorique correspondante. Les valeurs des paramètres de fixation déduites de cette figure sont données dans le tableau 4.1.

L'équilibre de l'interaction LDL-porphyrine

In fine, les changements de fluorescence de la deutéroporphyrine, ainsi que le quenching du tryptophane associé à la fixation de cette molécule aux LDL, nous a permis de caractériser deux types de fixation. Le premier, impliquant quatre sites discrets, est associé au phénomène de quenching de la fluorescence intrinsèque des lipoprotéines. Nous l'avons défini comme fixation de *classe P*. Le second, par contre, ne met pas en jeu des sites de fixation discrets. Bien qu'un phénomène de saturation du LDL soit observé à partir d'environ 50 molécules de porphyrine fixées, cette association se comprend mieux comme un phénomène de solubilisation, de répartition entre phase aqueuse et phase lipidique.

Les sites de *classe P* sont forcément situés à proximité des tryptophanes quenchés par la fixation de la deutéroporphyrine, la distance de Förster associée étant de 1,7 nm. Ils peuvent être localisés sur l'apoprotéine B-100 ou, plus probablement, à l'interface entre les parties protéique et lipidique des LDL. Deux observations abondent en ce sens. D'une part, le spectre de fluorescence intrinsèque de ces particules présente un maximum à 330 nm. Cette valeur est typique de la fluorescence d'un résidu tryptophane dans un environnement fortement apolaire [136]. D'autre part, les propriétés de fluorescence de la deutéroporphyrine associée à ces sites de *classe P* sont similaires à celles de cette porphyrine dans un environnement lipidique, comme des liposomes.

	Constantes d'équilibre			
n_P	K_{Pi}	K_P	K_L	K_{LDL}
$4^{(a, b)}$	9×10^7 M^{-1} (a) $8{,}75\times10^7$ M^{-1} (b)	$3{,}6\times10^8$ M^{-1} (a) $3{,}5\times10^8$ M^{-1} (b)	2×10^8 M^{-1} (b)	$(5{,}8\pm1{,}2)\times10^8 M^{-1}$

Tableau 4.1 : Tableau récapitulatif des paramètres d'équilibre décrivant l'association de la deutéroporphyrine aux LDL. (a) valeurs calculées à partir des points de Scatchard obtenus en suivant la fluorescence des LDL (figure 4.7). (b) valeurs calculées à partir des points de Scatchard obtenus en suivant la fluorescence de la deutéroporphyrine (figure 4.10).

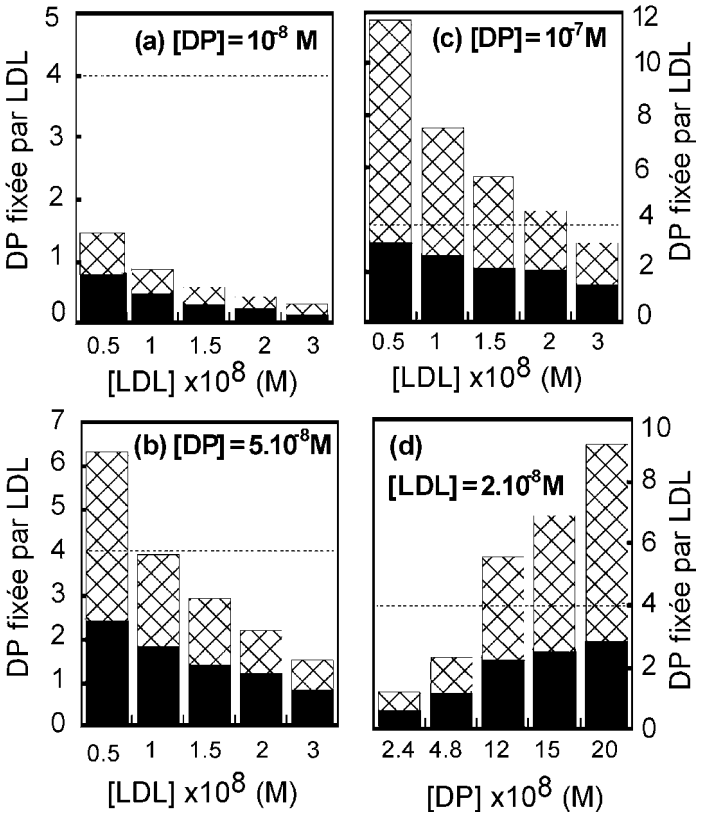


Figure 4.11 : Les histogrammes représentent le nombre de molécules de porphyrine fixées par LDL à l'équilibre dans les différentes conditions de concentration utilisées lors des études dynamiques. Les nombres de porphyrines associées par fixation de *classe P* et de *classe L* sont respectivement représentés par les aires noires et hachurées. Le nombre total de sites de *classe P* accessibles, quatre, est indiqué par la ligne pointillée. La capacité de fixation globale par LDL est d'environ 55 molécules de porphyrine. Les valeurs présentées sur ces histogrammes ont été calculées avec les constantes données dans le tableau 4.1.

4.3 Etude dynamique : cinétiques d'association et de dissociation de la DP aux LDL[*]

Les cinétiques d'association de la deutéroporphyrine aux LDL, ainsi que celles correspondant à son transfert des LDL vers la HSA, ont été suivies par enregistrement des variations, au cours du temps, de la fluorescence de la porphyrine excitée à 395 nm. Elles ne permettent donc pas de différencier les fixations de *classe L* et de *classe P* en fonction de leurs propriétés optiques. Aucune expérimentation basée sur le FRET n'a pu être analysée, les signaux obtenus lors des expériences préliminaires correspondantes ayant malheureusement présenté un rapport signal sur bruit trop médiocre pour pouvoir en déduire des valeurs de constantes de vitesse significatives. Néanmoins, les constantes d'équilibres déterminées précédemment nous ont permis de calculer, pour chacune des conditions expérimentales mises en œuvre dans cette , le nombre de molécules de porphyrine par LDL fixées sur les sites de *classe P* et incorporées dans la partie lipidique (figure 4.11).

4.3.1 L'association DP-LDL

Les résultats à l'équilibre ont conduit à considérer deux types de fixation de la porphyrine aux LDL, définis comme fixation de *classe P* et de *classe L*. En première approximation, et compte tenu des faibles niveaux d'occupation donnés sur la figure 4.11, l'association de chaque molécule de porphyrine est supposée ne pas dépendre de l'état d'occupation des LDL. En d'autres termes, l'association sera considérée comme étant de pseudo premier ordre. En outre, les deux classes de fixation sont considérées comme indépendantes. Le schéma représentant cet équilibre, où k_{aP} et k_{dP} sont les constantes de vitesse d'association et de dissociation pour les sites de *classe P* et k_{aL} et k_{dL} celles pour l'association de la porphyrine à la phase lipidique de la lipoprotéine (*classe L*), est donné figure 4.12. P_F, P_L et P_P sont respectivement les concentrations en porphyrine libre, en porphyrine fixée de *classe L* et de *classe P*.

Le système d'équations différentielles décrivant théoriquement ce système est donc :

$$dP_F/dt = k_{dL} \times P_L + k_{dP} \times P_P - (k'_{aL} + k'_{aP}) \times P_F \qquad (4.10a)$$

$$dP_L/dt = k'_{aL} \times P_F - k_{dL} \times P_L \qquad (4.10b)$$

$$dP_P/dt = k'_{aP} \times P_F - k_{dP} \times P_P \qquad (4.10c)$$

[*] Le modèle cinétique est détaillé en annexe. Pour des raisons de commodité, certaines équations sont reprises dans ces deux chapitres et donc nommées différemment (4.x ici et *a*.x en annexe).

où k'_{aP} et k'_{aL} sont les constantes apparentes de vitesse d'association, incluant la concentration en LDL :

$k'_{aL} = k_{aL} \times [LDL]$ et $k'_{aP} = k_{aP} \times [LDL]$

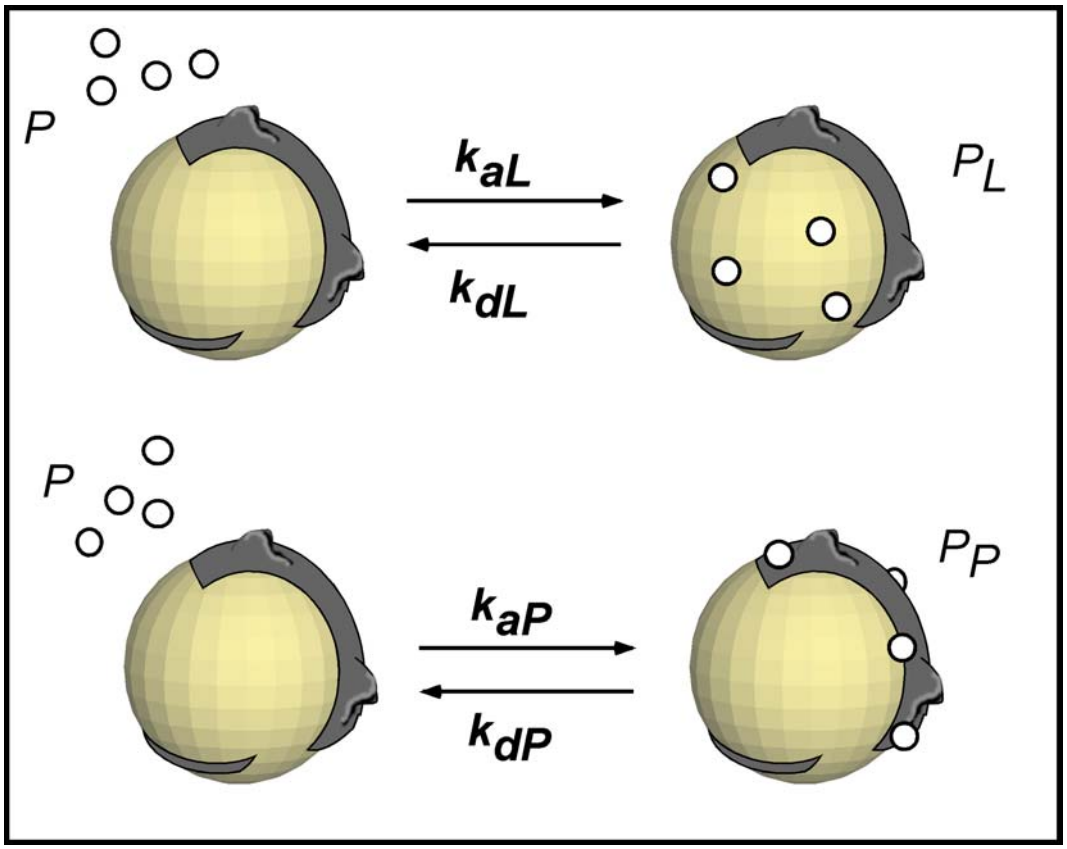


Figure 4.12 : Représentation schématique des équilibres décrivant nos résultats expérimentaux, où k_{aP} et k_{dP} sont les constantes de vitesse d'association et de dissociation pour les sites de *classe P* et k_{aL} et k_{dL} celles pour l'association de la porphyrine à la phase lipidique de la lipoprotéine (*classe L*).

Pour étudier expérimentalement la dynamique de cette association, une solution aqueuse de deutéroporphyrine est mélangée dans l'appareil de stopped-flow avec une solution de LDL dont on fait varier la concentration. Nous avons travaillé à trois concentrations en porphyrine : 1×10^{-8}, 5×10^{-8} et 1×10^{-7} M après mélange. Pour chacune, la cinétique d'association a été enregistrée avec cinq solutions de LDL différentes, conduisant à des concentrations après mélange de 5×10^{-9}, 1×10^{-8}, $1{,}5\times10^{-8}$, 2×10^{-8} et 3×10^{-8} M. Notons que chaque signal enregistré correspond à une moyenne sur dix tirs.

Pour décrire ces expériences, les conditions initiales complétant le système d'équations différentielles (4.10) sont donc :

$P_{F(t=0)} = P_0$

$P_{L(t=0)} = P_{P(t=0)} = 0$

La résolution de ce système d'équations permet de déterminer les variations théoriques en fonction du temps de P_F, P_L et P_P. Il s'agit, pour chacune des trois espèces, de la somme de deux termes exponentiels dont les constantes de vitesse k_1 et k_2 sont :

$$k_{1,2} = \frac{1}{2} \times \left[\Sigma k \pm \sqrt{(\Sigma k)^2 - 4 \times (k_{dP} \times k_{dL} + k'_{aL} \times k_{dP} + k'_{aP} \times k_{dL})} \right] \quad (4.11)$$

Comme, dans nos expériences, les concentrations de porphyrine et de LDL sont toujours faibles, aucun effet d'écran ne se produit et l'intensité de fluorescence émise par chaque forme de la porphyrine est directement proportionnelle à sa concentration. L'intensité de fluorescence observée est donc la somme de toutes les contributions et sera bi-exponentielle. Des exemples de signaux expérimentaux, correspondant à la solution porphyrique la plus diluée utilisée, sont montrés figure 4.13. Ils présentent toutes les caractéristiques des enregistrements que nous avons obtenus par ailleurs. L'intensité de fluorescence de la porphyrine excitée à 395 nm augmente dans le temps. Les changements du signal de fluorescence sont extrêmement rapides et ces signaux sont très bien ajustés par des courbes mono-exponentielles, alors que des signaux bi-exponentiels étaient a priori attendus.

Sur des temps plus longs, le signal de fluorescence reste stable. Du moins aucune autre modification que celles décrites ci-dessus n'a été enregistrée lors des expériences au stopped-flow sur des durées allant jusqu'à quelques minutes. De plus, les mêmes mélanges ont été réalisés manuellement de façon à pouvoir mesurer la fluorescence sur des temps plus longs, allant de quelques dizaines de secondes jusqu'à 2 heures, en utilisant un spectrofluorimètre classique. Là encore, aucune modification de fluorescence n'a été mise en évidence. Les signaux sont bel et bien mono-exponentiels.

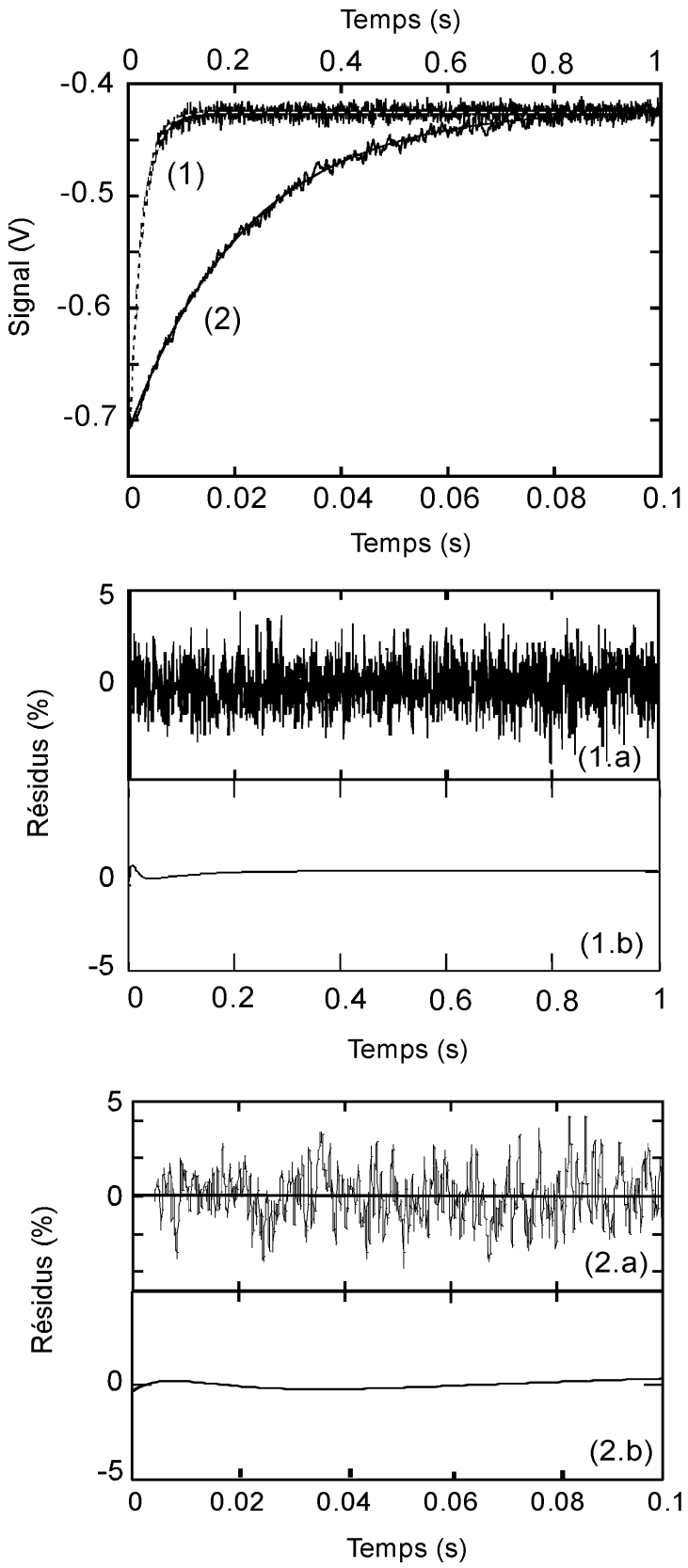


Figure 4.13 :

Cinétique de l'association de la deutéroporphyrine aux LDL :

En haut :

Exemples de signaux de fluorescence enregistrés après le mélange de la deutéroporphyrine (1×10^{-8} M) avec les LDL (2×10^{-8} M). (1) enregistrement long (échelle de temps en haut), (2) enregistrement sur temps court (échelle du bas). Le meilleur ajustement mono-exponentiel est superposé au signal.

Milieu et bas de page :

(a) Résidus normalisés, correspondant à la différence en pourcentage du signal entre les signaux mesurés et les meilleurs ajustement monoexponentiels,

(b) Résidus normalisés simulés correspondant à la différence entre le meilleur ajustement monoexponentiel et un signal biexponentiel simulé en utilisant les valeurs des constantes données dans le tableau 4.2. L'exponentielle lente se perd dans le bruit du signal expérimental. L'amplitude relative de la composante lente est, dans nos mesures, au maximum égale à 2,3 % de l'amplitude totale.

Bien que deux types de fixations différentes soient impliqués, il est donc impossible de distinguer expérimentalement les deux phases correspondantes. Néanmoins, comme nous le précisons en annexe, la résolution du système (4.10) peut être considérablement simplifiée. En effet, dans nos conditions expérimentales, $k_{dP} \approx k_{dL}$ au regard des k_a*. Les valeurs précises de ces constantes sont données dans le développement de ce chapitre (voir tableau 4.2). Nos calculs ont montré que l'amplitude du premier terme exponentiel s'annule. En tenant compte de l'approximation donnée ci-dessus, les signaux enregistrés correspondent donc à l'expression mono-exponentielle théorique ci-après, où $P_B = P_P + P_L$** :

$$P_B = P_{F(t=0)} \times \left[\frac{(k_{aP} + k_{aL}) \times [LDL]}{k_d + (k_{aP} + k_{aL}) \times [LDL]} - \frac{(k_{aP} + k_{aL}) \times [LDL]}{k_d + (k_{aP} + k_{aL}) \times [LDL]} \cdot \exp(-k_2 \cdot t) \right]$$

$$\text{avec } k_2 \cong (k_{aP} + k_{aL}) \cdot [LDL] + k_d \qquad (4.12)$$

Justification de l'approximation du pseudo-premier ordre

Comme nous l'avons dit, les signaux donnés figure 4.13 sont similaires à ceux enregistrés lors des expériences réalisées aux autres concentrations mentionnées. Cependant, la qualité de l'ajustement mono-exponentiel, bien que toujours satisfaisante, diminue lorsque le rapport DP/LDL augmente.

Cet écart s'explique en partie par le fait que le modèle théorique sur lequel nous nous appuyons est basé sur l'hypothèse que l'interaction de chaque molécule de porphyrine n'est pas modifiée par la présence d'autres molécules déjà associées au LDL. L'association est donc considérée comme étant un processus du pseudo-premier ordre. Cette approximation implique que le nombre de sites de fixation est grand devant le nombre de molécules de ligand. Cette condition est remplie aux faibles concentrations en porphyrine ; les sites de *classe P* sont loin d'être saturés, de même que la phase lipidique qui est en large excès par rapport au nombre de porphyrines incorporées. Par contre, l'approximation n'est plus valable pour les concentrations en porphyrine les plus importantes : Si les lipides restent en net excès par rapport à la porphyrine, l'association aux sites de *classe P* s'éloigne des

* La validité de cette remarque sera amplement discutée par la suite, mais signalons déjà que les constantes d'association sont supérieures à celles de dissociation de plus d'un ordre de grandeur.

** L'écart entre le signal expérimental et la mono-exponentielle théorique correspond toujours à moins de 2,3% de l'amplitude totale du signal, voir figure 4.17.

conditions où elle peut être simplement décrite comme un phénomène du pseudo-premier ordre. L'écart au modèle s'accentue alors pour les faibles concentrations en LDL (figure 4.11). Il faut néanmoins remarquer que, dans la gamme de concentrations utilisée, l'écart reste très peu sensible. L'hypothèse associant les phénomènes observés à un processus de pseudo-premier ordre est valide sur la quasi-totalité de la gamme de concentrations que nous avons utilisée.

En première approximation, les données expérimentales ont donc été analysées en considérant que les phénomènes mesurés correspondent à un processus simple et de pseudo-premier ordre. La constante de vitesse expérimentale mesurée, k^{obs}, correspond donc à k_2 dont l'expression est donnée par l'équation (4.12) de notre modèle théorique. La variation de k^{obs} en fonction de la concentration en LDL est donc linéaire et vérifie la relation :

$$k^{obs} = k_a^{obs} \times [LDL] + k_d^{obs} \qquad (4.13)$$

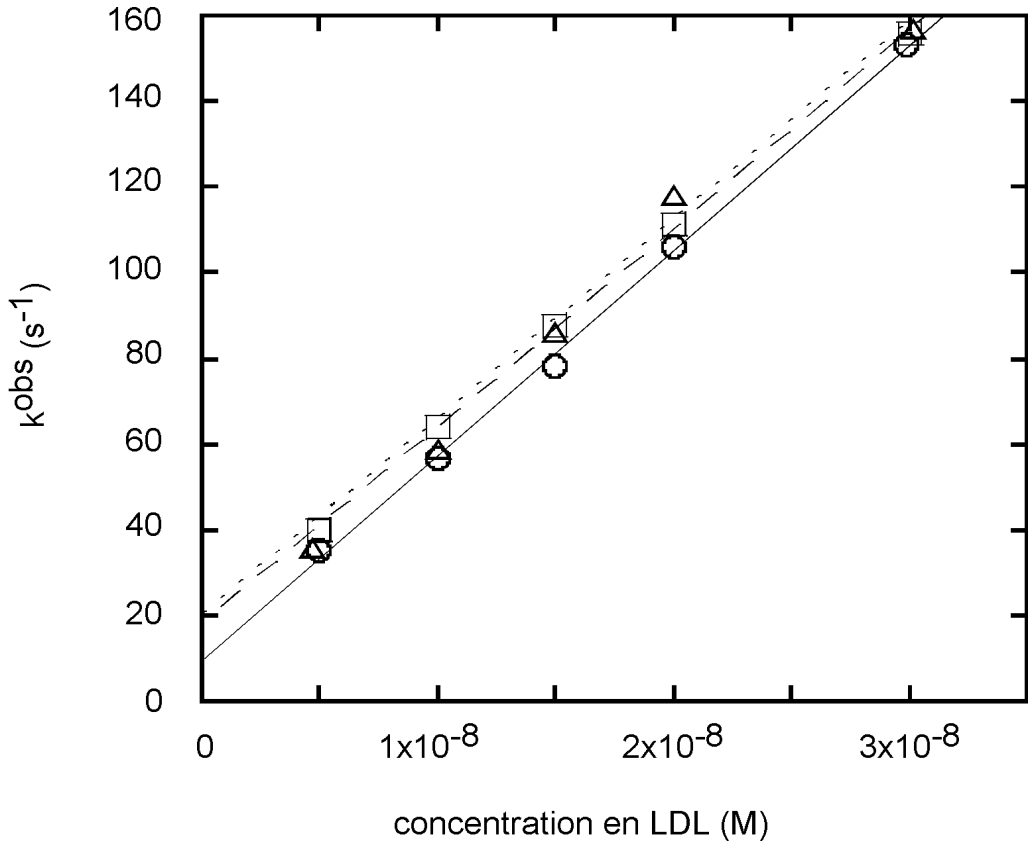


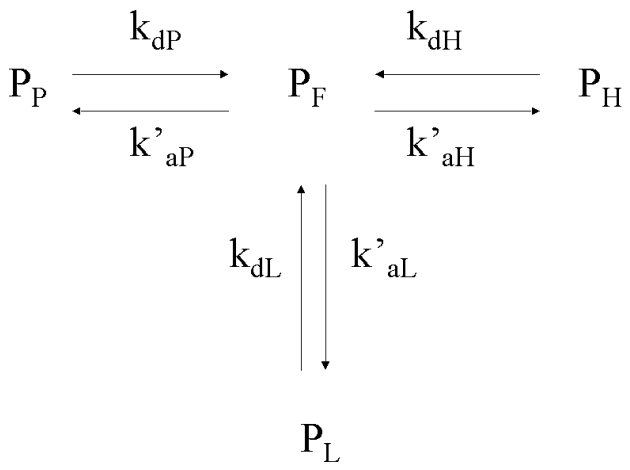
Figure 4.14 : Variation linéaire de la constante de vitesse expérimentale, k^{obs}, en fonction de la concentration en LDL. Les symboles différents correspondent aux trois séries d'expérimentations, à savoir (O) : [DP] = 1×10^{-8} M, (□) : [DP] = 5×10^{-8} M et (Δ) : [DP] = 1×10^{-7} M. Les points expérimentaux sont approchés par la droite théorique donnée par l'équation (4.13) et dont le tracé donne k_d^{obs} et k_a^{obs} respectivement par son ordonnée à l'origine et par sa pente.

La droite obtenue (voir figure 4.14) donne accès par sa pente à la constante de vitesse d'association apparente, par définition égale à la somme des constantes correspondant à chacun des deux types de fixation (voir équation 4.12), et par son ordonnée à l'origine à k_d^{obs}, c'est à dire $k_{dP} \cong k_{dL}$. Sur cette figure, toutes les valeurs de k^{obs} sont représentées. Néanmoins, seules celles correspondant à des conditions de validité de l'approximation du pseudo premier ordre ont été utilisées pour déterminer les ajustements linéaires. Nous avons donc sélectionné, à partir des données de la figure 4.11, les expériences correspondant à des états d'occupation des LDL inférieurs à 10 % du maximum (55 porphyrines par LDL). La constante de vitesse d'association apparente obtenue est $k_a^{obs} = (4{,}65 \pm 0.10) \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$. La valeur de cette constante est la même pour les trois séries de mesures que nous avons réalisées à trois concentrations différentes en deutéroporphyrine. Elle est donc indépendante de nos conditions expérimentales. Par contre, la valeur de la constante de vitesse de dissociation y est plus sensible. Déterminée à partir des mesures effectuées à la plus forte concentration en porphyrine (1×10^{-7} M), l'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées donne $k_d^{obs} = 21\ s^{-1}$. Par contre, les séries de mesures réalisées avec des concentrations en porphyrine plus faibles donnent des valeurs allant jusqu'à $k_d^{obs} = 9\ s^{-1}$. Les plus fortes valeurs sont donc obtenues dans les conditions où le nombre de molécules de porphyrines incorporées dans les lipides est nettement supérieur à la quantité de molécules associées aux sites de *classe P*. Cette observation suggère fortement que les constantes de vitesse de dissociation correspondant aux deux types de fixation ne sont pas égales, et que k_{dL} est sensiblement plus grande que k_{dP}.

4.3.2 Le transfert de la deutéroporphyrine des LDL vers la HSA

L'étude de l'association de la deutéroporphyrine aux LDL décrite dans les paragraphes précédents met clairement en évidence le fait que la dynamique de cette interaction est très rapide. Cependant, elle s'est avérée inopérante pour déterminer précisément les paramètres cinétiques des deux types de fixation de la porphyrine aux LDL : fixation dans les lipides (*classe L*) ou sur les sites de *classe P*. En effet, comme cela a déjà été évoqué, l'amplitude de la seconde phase prévue par la théorie est beaucoup trop faible pour pouvoir être distinguée de la phase rapide, de grande amplitude. Le transfert de la porphyrine vers un récepteur, en l'occurrence vers l'albumine de sérum humain (HSA), a précédemment été utilisé avec succès, au laboratoire, pour déterminer les constantes de vitesse de sortie de la deutéroporphyrine dans le cadre de l'étude de son incorporation dans des vésicules lipidiques. Nous avons donc transposé ici cette méthode pour différencier clairement k_{dP} et k_{dL}.

Dans le modèle théorique développé, le passage est supposé s'effectuer par la phase aqueuse selon le mécanisme décrit par le schéma ci-dessous :



où k'_{aH} est la constante de vitesse d'association et k_{dH} la constante de vitesse de dissociation de la porphyrine à la HSA et P_H la porphyrine associée à cette protéine.

Expérimentalement, la porphyrine est d'abord incubée deux heures avec des LDL dont la concentration est suffisante pour incorporer au moins 90 % de la porphyrine. Les conditions expérimentales retenues pour cette série de manipulations, ainsi que la répartition des molécules de porphyrine associées, sont données sur la figure 4.11d. Chacune de ces solutions de LDL « chargés » est ensuite mélangée dans l'appareil de stopped-flow avec une solution d'albumine en excès (1×10^{-4} M après mélange). La cinétique du transfert est décrite par le système d'équations :

$$dP_F/dt = k_{dL} \times P_L + k_{dP} \times P_P + k_{dH} \times P_H - (k'_{aL} + k'_{aP} + k'_{aH}) \times P_F$$

$$dP_L/dt = k'_{aL} \times P_F - k_{dL} \times P_L$$

$$dP_P/dt = k'_{aP} \times P_F - k_{dP} \times P_P$$

$$dP_H/dt = k'_{aH} \times P_F - k_{dH} \times P_H$$

Nos conditions expérimentales permettent non seulement un transfert complet de la porphyrine, mais également le maintien à un niveau très réduit de la porphyrine libre dans la solution. De plus, la concentration en albumine est nettement supérieure à celle en porphyrine. Les processus d'association à la HSA et aux LDL répondent donc aux conditions du pseudo premier ordre. La cinétique du transfert peut donc être décrite par le système simple :

$$\frac{dP_P}{dt} = \left(\frac{k_{aP} \times k_{dP}}{k_{aH}} - k_{dP} \right) \times P_P + \frac{k_{aP} \times k_{dL}}{k_{aH}} \times P_L + \frac{k_{aP} \times k_{dH}}{k_{aH}} \times P_H \qquad (4.14a)$$

$$\frac{dP_L}{dt} = \frac{k_{aL} \times k_{dP}}{k_{aH}} \times P_P + \left(\frac{k_{aL} \times k_{dL}}{k_{aH}} - k_{dL} \right) \times P_L + \frac{k_{aL} \times k_{dH}}{k_{aH}} \times P_H \qquad (4.14b)$$

$$\frac{dP_H}{dt} = k_{dp} \times P_P + k_{dL} \times P_L \qquad (4.14c)$$

La résolution de ce système d'équations donne accès aux expressions théoriques des concentrations de P_H, P_L et P_P*. En négligeant les petits termes, ces expressions correspondent à la somme de deux exponentielles dont les constantes de vitesse donnent directement accès aux valeurs des constantes de dissociation :

$$k_1 = k_{dP} \qquad (4.15)$$

$$k_2 = k_{dL} \qquad (4.16)$$

Utilisant l'appareil de stopped-flow, le transfert est suivi en mesurant la fluorescence de la porphyrine excitée à 395 nm. En effet, comme le montre la figure 4.3, sous excitation à cette longueur d'onde le transfert de la deutéroporphyrine des LDL vers la HSA se traduit par un déplacement du maximum d'émission de 621 à 623 nm, mais surtout par une diminution importante de l'intensité de fluorescence. Ces changements sont enregistrés et un signal typique, correspondant à une moyenne sur dix tirs, est donné figure 4.15. Le transfert s'accompagne d'une diminution du signal de fluorescence. Les deux phases prédites par notre modèle théorique sont bien observées sur les signaux correspondants. De plus, une troisième apparaît assez clairement sur des temps plus longs. Cette phase est lente et de faible amplitude. Nous allons, dans un premier temps, traiter exclusivement les deux premières phases.

Comme indiqué précédemment, les constantes de vitesse expérimentales, k_1 et k_2, donnent directement accès aux valeurs de k_{dL} et k_{dP}. Comme attendu d'après les spectres donnés figure 4.2, en excitant à 410 nm, les signaux sont croissants et non plus décroissants. Les constantes de vitesse expérimentales sont identiques à celles mesurées sous excitation à 395 nm. La méthodologie employée permet d'avoir des valeurs précises de ces paramètres cinétiques. A l'inverse des signaux obtenus lors de l'incorporation de la deutéroporphyrine dans les LDL, l'ajustement du signal

* Cette résolution ne pose aucune difficulté particulière. Elle est néanmoins détaillée en annexe.

par des courbes bi-exponentielles est nettement meilleur que par une mono-exponentielle. Dans tous les cas, les amplitudes des deux exponentielles sont ici du même ordre de grandeur. Les valeurs des constantes de vitesse obtenues sont respectivement 5 s^{-1} et 15 s^{-1}. Lors de l'étude de l'association DP-LDL, les plus fortes valeurs de k_d^{obs} ont été déterminées dans les conditions où P_L est très supérieur P_P, suggérant que k_{dL} est plus grande que k_{dP}. Nous avons donc attribué la plus forte de ces constantes de vitesse expérimentales à k_{dL}, la plus faible à k_{dP}. Les simulations que nous avons réalisées sous MathCad ont confirmé la validité de cette attribution.

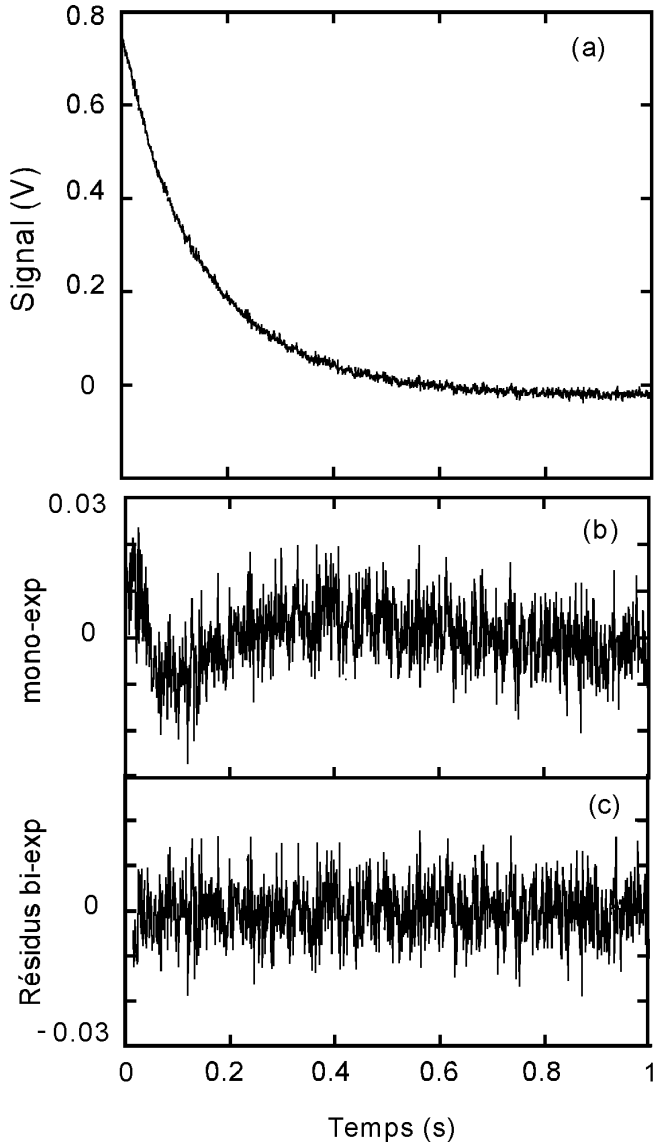


Figure 4.15 : Cinétique du transfert de la deutéroporphyrine des LDL vers la HSA.

(a) Evolution de l'intensité de fluorescence enregistrée après mélange d'une solution de LDL pré-chargés en porphyrine et d'une solution de HSA en excès. Les concentrations après mélange sont :

[DP] = $1{,}5\times10^{-7}$ M,
[LDL] = 2×10^{-8} M,
[HSA] = 10^{-4} M.

Longueur d'onde d'excitation : 395 nm.

(b) Résidus correspondant à la différence entre le signal expérimental et le meilleur ajustement mono-exponentiel. χ^2= 0,093339

(c) Résidus correspondant à la différence entre le signal expérimental et le meilleur ajustement bi-exponentiel. χ^2= 0,078282

Les constantes d'équilibre de l'interaction de la deutéroporphyrine avec les LDL sont données dans le tableau 4.1. Ces constantes d'équilibre peuvent s'écrire comme le rapport des constantes de vitesse d'association et de dissociation correspondantes :

$$K_{LDL} = K_L + K_P = \frac{k_{aL}}{k_{dL}} + \frac{k_{aP}}{k_{dP}} \qquad (4.17)$$

Ayant déterminé les valeurs de k_{dP} et k_{dL} il est donc possible de déduire du tableau 4.1 les valeurs de k_{aP} et k_{aL}. Les valeurs de tous ces paramètres, qui aient été affinés lors de nos simulations mathématiques, sont données dans le tableau 4.2.

La figure 4.16 montre un enregistrement sur quelques dizaines de secondes de l'évolution du signal de fluorescence associé au transfert de la porphyrine étudié dans les paragraphes précédents. Comme nous l'avons évoqué précédemment, en plus des deux phases décrites et prévues par notre modèle théorique, ce signal présente une troisième phase, dont la constante de vitesse expérimentale est, dans toutes les conditions expérimentales testées, de l'ordre de 0,1 s^{-1}. Cette troisième phase est toujours dans la direction opposée au reste du signal : croissante lorsque la porphyrine est excitée à 395 nm, décroissante pour une longueur d'onde d'excitation de 410 nm. L'inversion des signaux correspondant aux deux phases rapides et à cette phase lente a lieu pour la même longueur d'onde d'excitation, autour de 406 nm. L'amplitude des cette troisième phase n'excède jamais 10% du signal.

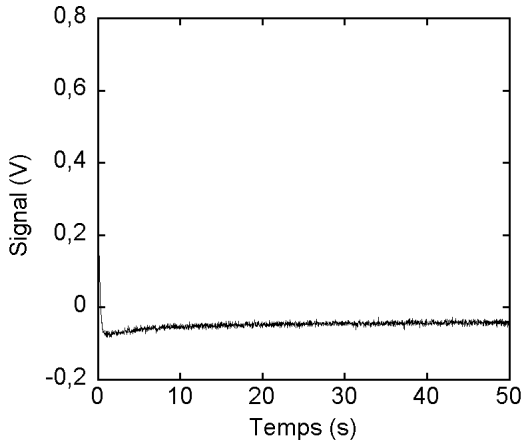


Figure 4.16 : Evolution, sur temps long, de l'intensité de fluorescence enregistrés après mélange d'une solution de LDL pré-chargés en porphyrine et d'une solution de HSA en excès. Cet enregistrement montre clairement la troisième phase. Les concentrations après mélange sont :

[DP] = $1{,}5\times10^{-7}$ M,
[LDL] = 2×10^{-8} M,
[HSA] = 10^{-4} M.

Longueur d'onde d'excitation : 395 nm.

4.3.3 Simulations et synthèse de la dynamique de l'interaction

Afin d'évaluer la validité de notre modèle cinétique, ainsi que celle des approximations faites lors de l'analyse des données, les cinétiques d'association de la deutéroporphyrine aux LDL ainsi que les cinétiques du transfert de cette molécule des LDL vers la HSA ont été simulées sur ordinateur, en utilisant le logiciel MathCad. Notre programme tenait compte des équations (*a*.1a-c) et (*a*.12a-d) données en annexe. Ces simulations ont été réalisées sans aucune supposition ni approximation, sans même faire l'hypothèse que dans nos conditions expérimentales l'association est de pseudo-premier ordre. Les conditions initiales et les valeurs des paramètres de vitesse de l'association déterminées expérimentalement ont été rentrées dans notre programme. Les constantes de vitesse d'association et de dissociation de la deutéroporphyrine par rapport à la HSA ont été fixées à k_{aH} = $6{,}75\times10^{7}$ $M^{-1}s^{-1}$ et k_{dH} = 3,5 s^{-1} [118]. Les courbes ainsi simulées ont été ajustées par des exponentielles dont les paramètres ont été comparés à ceux obtenus en ajustant les signaux expérimentaux. Les valeurs des paramètres cinétiques de l'association ont été affinées jusqu'à obtenir les meilleures simulations de tous les différents types d'expérimentation réalisés, y compris le transfert à l'albumine. En outre, l'attribution des valeurs de k_{dP} et k_{dL} sur la base des observations faites lors de nos expériences d'association LDL-DP a été validée. *En effet, l'inversion de ces deux grandeurs rend impossible l'ajustement aux données expérimentales*.

	Constantes d'équilibre				
n_P	K_{Pi}		K_P	K_L	
4 [a,b]	9×10^{7} M^{-1} [a] $8{,}75 \times 10^{7}$ M^{-1} [b]		$3{,}6 \times 10^{8}$ M^{-1} [a] $3{,}5 \times 10^{8}$ M^{-1} [b]	2×10^{8} M^{-1} [b]	
	Constantes cinétiques				
	k_{aPi}	k_{aP}	k_{dP}	k_{aL}	k_{dL}
	5×10^{8} $M^{-1}s^{-1}$	2×10^{9} $M^{-1}s^{-1}$	5,8 s^{-1}	3×10^{9} $M^{-1}s^{-1}$	15 s^{-1}

Tableau 4.2 : Tableau récapitulatif des paramètres cinétiques et d'équilibre décrivant l'interaction de la deutéroporphyrine aux LDL. (a) valeurs calculées à partir des points de Scatchard obtenus en suivant la fluorescence des LDL. (b) valeurs calculées à partir des points de Scatchard obtenus en suivant la fluorescence de la deutéroporphyrine.

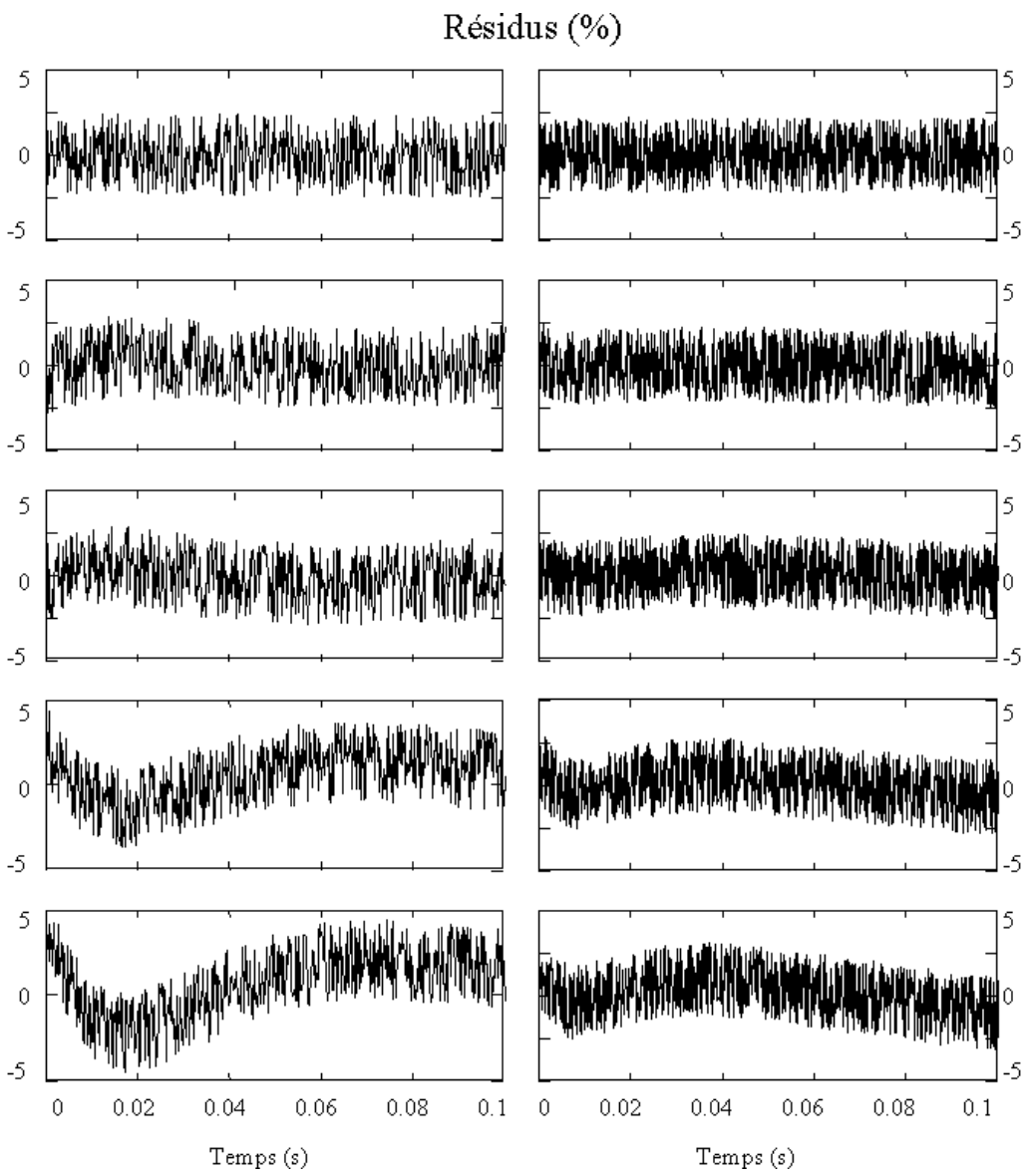


Figure 4.17 : Evolution de l'adéquation du modèle simplifié (équation *a*.11, voir annexe) avec le modèle d'origine (équations *a*.2-6), justifiant nos approximations. Sur la courbe correspondant au modèle non simplifié, un bruit a été simulé à l'aide d'une fonction aléatoire de façon à nous rapprocher le plus possible des signaux expérimentaux correspondant. Les résidus correspondent à la différence, en pourcentage du signal, de la déviation entre les deux courbes. Les calculs ont été faits avec une concentration en porphyrine de $1x10^{-8}$ M, et des concentrations en LDL de $1x10^{-8}$ M (à gauche) et $2x10^{-8}$ M (à droite). Les constantes de vitesse de dissociation ont été choisies de façon à ce que la constante globale reste identique (20,8 s^{-1}) mais que le rapport k_{dL}/k_{dP} soit égal à : 1 ; 2 ; 2,6 ; 5 et 10 (de haut en bas sur la figure). Les valeurs numériques des autres paramètres cinétiques sont :

$k_{aPi} = 5 \times 10^8\ M^{-1}s^{-1}$, $n = 4$, $k_{aP} = 2 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$
$k_{aL} = 3 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$

Justification du modèle simplifié de l'association de la deutéroporphyrine aux LDL décrit par une mono-exponentielle

Lors de l'étude de l'association DP-LDL, les évolutions dans le temps de P_F, P_P et P_L auraient théoriquement dû, dans les conditions permettant l'approximation du pseudo-premier ordre, être décrites par des bi-exponentielles. Cependant, les constantes de vitesse de dissociation des différents types de fixation sont trop proches pour être distingués ($k_{dP} \cong k_{dL} \cong k_d$) et l'amplitude de la seconde exponentielle tend vers zéro (voir annexe). Dans ces conditions, le signal devient mono-exponentiel. De plus, il est important de souligner que même si ces constantes ne sont pas égales, il peut parfois être difficile de distinguer une composante lente et de faible amplitude « camouflée » dans un signal plus rapide et de grande amplitude. Dans notre cas, les simulations numériques réalisées montrent que l'écart entre le modèle non simplifié (équations *a*.2-6) et le modèle simplifié n'est significatif que si les constantes de vitesse de dissociation diffèrent de plus d'un facteur 5 (figure 4.17). Dans nos expériences, ce rapport est inférieur à 2,6 et la déviation du signal par rapport à l'ajustement mono-exponentiel n'est pas perceptible. Comme le montre la figure 4.13 elle se perd dans le bruit du signal expérimental, l'amplitude relative de la composante lente étant, dans nos mesures, au maximum égale à 2,3 % de l'amplitude totale.

Justification du modèle de transfert de la porphyrine des LDL vers la HSA par la phase aqueuse

D'autre part, nous avons essayé de simuler la troisième phase observée. Certaines combinaisons de constantes nous ont permis d'obtenir un phénomène d'aller-retour de la porphyrine entre les deux macromolécules. Il faut, pour cela, que les constantes de dissociation soient très différentes, ce qui conduit à un phénomène de redistribution de la deutéroporphyrine entre les LDL et la HSA. Cependant, avec ces jeux de constantes, la simulation de l'association de la porphyrine aux LDL est très nettement bi-exponentielle, ce qui n'est pas le cas expérimentalement. Notre modèle théorique, basé sur l'hypothèse que le transfert de la deutéroporphyrine se fait via la phase aqueuse, ne permet donc pas de prédire l'existence de cette phase lente. Par contre, il rend parfaitement compte de l'ensemble des phénomènes plus rapides, pour lesquels cette hypothèse est valable. La troisième phase correspond sans doute à un autre phénomène. Elle pourrait notamment s'expliquer par une interaction entre les lipoprotéines et l'albumine, comme cela a été suggéré dans la littérature [137]. Cette hypothèse est également soutenue par le fait que la HSA est capable d'interagir avec des liposomes [138, 139], ce qui laisse penser qu'elle pourrait avoir une certaine affinité pour la phase lipidique des LDL.

L'existence de cette troisième phase pourrait laisser penser que le transfert de la porphyrine a lieu lors des collisions des LDL et des molécules d'albumine. Une

modélisation très simple de ce processus permet néanmoins d'écarter cette possibilité. Les dynamiques d'interactions des porphyrines avec les LDL et la HSA seront, ici aussi, considérées comme des processus de pseudo premier ordre. [HSA] et [LDL] sont respectivement les concentrations en albumine et en lipoprotéine. Le nombre de collisions (N_C) par unité de temps est directement proportionnel à ces concentrations. En notant k_{AL} la constante de proportionnalité, on obtient donc :

$$N_C = k_{AL}.[HSA].[LDL]$$

Lorsqu'une collision se produit, deux cas de figure se présentent :

(1) Soit une molécule de porphyrine passe d'un LDL à la HSA, auquel cas, en supposant qu'il n'y ait pas d'effet coopératif, la probabilité de passage est de $n.q_1$ (n étant le nombre de porphyrine associée à chaque LDL et q_1 la probabilité de passage du LDL vers la HSA pour chaque molécule de porphyrine). P_B étant le nombre de molécules de porphyrine associées aux LDL, le nombre n est égal à P_B/[LDL]. Le nombre de transfert dans le sens LDL → HSA par unité de temps est donc :

$$\left(\frac{dP_B}{dt}\right)_1 = -k_{AL}\cdot[HSA]\cdot[LDL]\cdot\ q_1\cdot\frac{P_B}{[LDL]} = -k_{AL}\cdot q_1\cdot[HSA]\cdot P_B$$

(2) Soit, si l'albumine a déjà fixé une ou plusieurs molécules de porphyrine, une molécule de porphyrine passe de la HSA au LDL. En notant q_2 la probabilité de passage dans ce sens là, le nombre de transfert par unité de temps dans le sens HSA → LDL s'écrit donc :

$$\left(\frac{dP_B}{dt}\right)_2 = k_{AL}\cdot[HSA]\cdot[LDL]\cdot\ q_2\cdot\frac{P_H}{[HSA]} = k_{AL}\cdot q_2\cdot[LDL]\cdot P_H$$

où P_H est la concentration de porphyrine liées à l'albumine. Comme nous l'avons déjà souligné, les concentrations en LDL et, surtout, en HSA sont suffisantes pour considérer que la proportion de porphyrine libre dans la solution est nulle et donc $P_H = P_T - P_B$. On a donc :

$$\left(\frac{dP_B}{dt}\right)_2 = k_{AL}\cdot q_2\cdot[LDL]\cdot(P_T - P_B)$$

Il est alors possible de calculer l'évolution de P_B au cours du temps :

$$\frac{dP_B}{dt} = \left(\frac{dP_B}{dt}\right)_1 + \left(\frac{dP_B}{dt}\right)_2 = k_{AL}\cdot q_2\cdot[LDL]\cdot P_T - k_{AL}\cdot(q_1\cdot[HSA] + q_2\cdot[LDL])\cdot P_B$$

La solution de cette équation est une mono-exponentielle :

$$P_B = A_0 + A.\exp(-k.t) \qquad (4.18)$$

avec $k = k_{AL}\cdot(q_1\cdot[HSA] + q_2\cdot[LDL])$ (4.19)

Or, expérimentalement, le signaux correspondant au transfert sont clairement bi-exponentiels (figure 4.15). Le passage par collision ne semble donc pas rendre compte convenablement de nos observations expérimentales.

De plus, si l'on se fie aux équations (4.18) et (4.19), la diminution de la concentration en LDL devrait conduire à une diminution plus ou moins importante (en fonction de la valeur de q_2) de la constante de vitesse. Afin de pouvoir écarter définitivement ce modèle de transfert par collision, nous avons réalisé une expérience en diminuant de moitié la quantité de LDL. Evidemment, le signal est bi-exponentiel comme lors de nos autres expérimentations, mais de plus, et comme prévu par les équations (4.15) et (4.16), les constantes de vitesse associées à ce transfert ne dépendent pas de la concentration en LDL utilisée et sont les mêmes que celles mesurées lors de l'ensemble de nos cinétiques : elles donnent un accès direct aux valeurs de k_{dP} et k_{dL}. Le passage par collision ne peut donc pas être le mécanisme prépondérant expliquant le transfert de la porphyrine des LDL vers la HSA, qui se fait donc, comme nous l'avons supposé lors de l'analyse de nos résultats, par la phase aqueuse.

4.4 Discussion des résultats et du modèle proposé

Au terme de cette étude, nous avons mis en évidence deux types de fixation de la deutéroporphyrine aux LDL. Le premier, caractérisé par un transfert de l'énergie de fluorescence des résidus tryptophanes de l'apoprotéine vers la porphyrine, met en œuvre quatre sites dits de *classe P* bien définis. Le second type, défini comme fixation de *classe L*, correspond à la répartition des molécules de deutéroporphyrine entre le milieu aqueux et la phase lipidique des LDL.

Afin de mieux appréhender la nature de ces fixations, une comparaison peut être faite entre les constantes de vitesse expérimentales et celles prévues par un processus limité par diffusion. La limite théorique de ce type de mécanisme est donnée par la constante de diffusion, k_D [140] :

$$k_D = 4\,\pi\,(R_{LDL} + R_P)\,(D_{LDL} + D_P)\,N \qquad (4.20)$$

R_{LDL} et R_P sont respectivement les rayons d'un LDL et d'une molécule de porphyrine, D_{LDL} et D_P leurs coefficients de diffusion dans le milieu et N est la constante d'Avogadro. Le coefficient de diffusion de la porphyrine a été estimé à $(2{,}4\pm1{,}0)\times10^{-10}$ m^2/s [127]. La diffusion des LDL, qui sont de grosses particules, est plus lente. Leur coefficient de diffusion est de 2×10^{-11} m^2/s [141]. Les rayons de ces deux molécules sont respectivement de 5×10^{-10} m et 11×10^{-9} m [106]. A partir de l'équation (4.20), la valeur de k_D peut être estimée à $2{,}3\times10^{10}$ $M^{-1}s^{-1}$. Cependant, les lipides ne représentent que la moitié de la surface d'un LDL [105]. Cette limite

théorique est donc divisée par deux et devient 1.2×10^{10} $M^{-1}s^{-1}$. La constante de vitesse d'association de la deutéroporphyrine à la partie lipidique des LDL a été déterminée expérimentalement à $3\times10^{9}M^{-1}s^{-1}$. Cette valeur est très proche de la limite de diffusion, compte tenu de l'implication d'un facteur d'orientation de la porphyrine qui, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, s'insère dans les lipides par son noyau en laissant les chaînes polaires vers la phase aqueuse.

Par contre, pour la fixation de *classe P*, la constante de vitesse d'association par site est nettement plus faible ($5\times10^{8}M^{-1}s^{-1}$), presque cinq fois inférieure à k_D. Sachant que ce second type de fixation implique des sites bien définis dont la taille est vraisemblablement comparable à celle de la porphyrine, cet écart reste cependant plus faible que ce à quoi l'on pouvait s'attendre. En effet, dans le cas où ces sites auraient effectivement eu la taille de la porphyrine, la diminution aurait dû correspondre au rapport des surfaces mises en jeu, c'est à dire 6×10^{3}, ce qui est loin d'être le cas. Il est donc probable que les régions du LDL correspondant à cette fixation de *classe P* aient une surface plus grande. Ceci indique que les sites de *classe P* sont localisés à l'interface lipide-protéine plutôt que directement sur l'apo B-100. De plus, cette grosse protéine est organisée en une alternance d'hélices α et de feuillets β et entoure la particule. Les feuillets β sont en contact avec des lipides associés de façon irréversible, notamment du cholestérol en phase smectique, et les hélices α sont dans la surface lipidique. Hormis le domaine globulaire N-terminal, l'apoprotéine est donc largement en contact avec les lipides, offrant donc beaucoup de possibilité de fixation à l'interface.

Au début de ce travail, nous avons stipulé qu'il était a priori possible que la porphyrine se fixe soit à l'apoprotéine, soit à la surface phospholipidique, soit dans le cœur hydrophobe des LDL. Or, comme nous venons de le voir, seuls deux types de fixation ont été mis en évidence, impliquant pour l'un l'apo B-100 et pour l'autre les lipides. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences qui auraient permis de distinguer les lipides de surface du cœur hydrophobe. A ce sujet, nous pouvons d'abord remarquer que la constante d'affinité globale $K_{LDL} = (5{,}8\pm1{,}2)\times10^{8}$ M^{-1}, déterminée à l'équilibre en mesurant la fluorescence de la porphyrine, est très proche des valeurs, comprises entre $5{,}2\times10^{8}$ et $2{,}2\times10^{8}$ M^{-1}, obtenues en faisant le rapport des constantes de vitesse k_a^{obs}/k_d^{obs} déterminées à partir de la figure 4.14. Enfin, si des molécules de porphyrine avaient pénétré dans le cœur des LDL, elles auraient dû traverser la surface et diffuser dans le LDL. Ce phénomène aurait a priori été détecté dans les cinétiques expérimentales de l'association DP-LDL, sauf si sa rapidité n'en faisait pas une étape limitante. L'incorporation de la deutéroporphyrine dans les LDL a été décrite par une mono-exponentielle, et aucune phase plus lente n'a pu être observée ni avec notre appareil de stopped-flow ni en fluorescence classique. Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence un peuplement du cœur des LDL.

L'interaction de la deutéroporphyrine avec les LDL est donc, selon toute vraisemblance, limitée aux lipides de surface et à l'interface protéo-lipidique.

Nous avons précédemment analysé la fixation de *classe L* comme très proche d'un processus limité par diffusion. L'association de la deutéroporphyrine à des liposomes a été elle aussi analysée de la sorte. Ces deux phénomènes peuvent être comparés sur la base de la valeur de la constante d'affinité rapportée au nombre de phospholipides de la structure impliquée, environ 800 à la surface d'un LDL. La constante d'affinité par phospholipide est donc de $2{,}5\times10^5$ M^{-1} et est donc du même ordre de grandeur que celle déterminée pour les vésicules lipidiques ($1{,}2\times10^5$ M^{-1}) [96, 118]. Là encore, aucune exaltation de l'affinité ne semble indiquer que des molécules de porphyrine aient pénétré dans le cœur des LDL.

4.5 Conclusion

In fine, les LDL apparaissent comme de bons transporteurs de la deutéroporphyrine. En effet, non seulement il ont une forte affinité pour cette molécule et ne saturent pas avant plusieurs dizaines de molécules incorporées, mais en plus cette association n'implique que très peu l'apoprotéine qui est la zone reconnue par les récepteurs « B/E ». La reconnaissance des LDL par ces récepteurs ne semble d'ailleurs pas pâtir de la fixation de porphyrines [71, 74]. Cette interaction est cependant un phénomène très rapide, qui pourra donc facilement être modifié par des changements d'environnement.

CHAPITRE 5 : RESULTATS 3 – Interaction de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée avec les LDL

Résumé

La phtalocyanine d'aluminium disulfonée ($AlPcS_2$) est, comme la deutéroporphyrine, une molécule tetrapyrrolique amphiphile et asymétrique. Elle présente une forte affinité pour les membranes, mais diffère fortement de la DP par sa quasi-incapacité à traverser les membranes, la vitesse de son flip-flop étant très lente [100]. L'interaction de cette molécule avec les LDL a été étudiée par fluorescence à l'équilibre et dans des conditions dynamiques. Comme pour la deutéroporphyrine, la fixation de *classe P* est caractérisée par le transfert de la fluorescence de l'apoprotéine vers la phtalocyanine. Ce processus implique 5 sites bien définis à proximité de l'apoprotéine, dont la constante d'affinité intrinsèque est d'environ 1×10^7 M^{-1} (affinité cumulée d'environ 5×10^7 M^{-1}). La fixation de *classe L* correspond à l'incorporation de quelques molécules (deux à trois) d'$AlPcS_2$ dans les lipides des LDL. La constante d'affinité correspondante est de $5{,}1\times10^6$ M^{-1}. Les paramètres cinétiques de ces fixations ont été déterminés en réalisant deux types d'expériences de stopped-flow : (i) le mélange de la phtalocyanine avec les LDL et (ii) le transfert de la phtalocyanine préchargée dans les LDL vers la HSA. Les constantes de vitesse d'association et de dissociation pour les fixations de *classes P* et *L* sont respectivement $k_{aPi} = 1\times10^7$ $M^{-1}s^{-1}$ (par site, donc globalement $k_{aP} = 5\times10^7$ $M^{-1}s^{-1}$), $k_{dP} = 0{,}8$ s^{-1}, $k_{aL} = 3{,}5\times10^7$ $M^{-1}s^{-1}$ et $k_{dL} = 6{,}8$ s^{-1}. La fluorescence du tryptophane quenché par l'association de la phtalocyanine aux sites de *classe P*, caractéristique d'un environnement très hydrophobe, ainsi que la comparaison de la valeur k_{aL} avec la limite par diffusion semble indiquer que la fixation de *classe P* se produit à l'interface entre l'apoprotéine et les lipides des LDL. La fixation de *classe L* est très limitée. Ces processus d'interactions phtalocyanine-LDL sont rapides, mais néanmoins plus lents que dans le cas de la deutéroporphyrine.

Chapitre 5

INTERACTION DE LA PHTALOCYANINE AVEC LES LDL

Ce chapitre présente les résultats obtenus concernant l'interaction de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée avec les lipoprotéines de basse densité. De plus, il reprend l'ensemble des données dynamiques dont nous disposons au sujet de l'interaction de cette molécule avec les membranes. En effet, l'objectif majeur de notre étude est d'étudier comment nos résultats dynamiques au niveau moléculaire peuvent être corrélés avec la répartition *in vivo* des deux molécules tetrapyrroliques considérées dans les cellules.

La deutéroporphyrine et la phtalocyanine d'aluminium disulfonée ont des structures offrant certaines similitudes. Notamment, elles possèdent toutes les deux des groupements polaires répartis du même côté de la molécule. Ces groupes modulent fortement l'hydrophobie apportée par le macrocycle. Cette asymétrie leur confère un positionnement caractéristique dans les structures membranaires, le macrocycle en contact avec la zone lipidique et les groupes polaires tournés vers la phase aqueuse. La présence des cycles greffés au macrocycle tetrapyrrolique rend les phtalocyanines plus hydrophobes que les porphyrines. Cependant, cette hyodrophobie est contrebalancée, dans le cas d'$AlPcS_2$, par la présence de l'ion aluminium central. Les deux molécules étudiées ont une affinité élevée pour les membranes. Leurs caractéristiques structurales, notamment les charges de leurs groupes polaires (figure 5.1), laissent prévoir une pénétration membranaire différente pour chacune d'elles. Des études préalables réalisées au laboratoire ont montré que pour ces deux molécules présentent :

- de fortes affinités pour les membranes, celle de la phtalocyanine étant même un ordre de grandeur supérieure à celle de la porphyrine [100, 118],
- des cinétiques d'échange de la membrane avec le milieu aqueux rapides([100, 118] et ce travail),
- des comportement vis à vis des membranes fortement différents par leurs vitesses de traversée des membranes (flip-flop) : dans les conditions physiologiques, moins d'une seconde pour la porphyrine, plusieurs heures pour la phtalocyanine [96, 100].

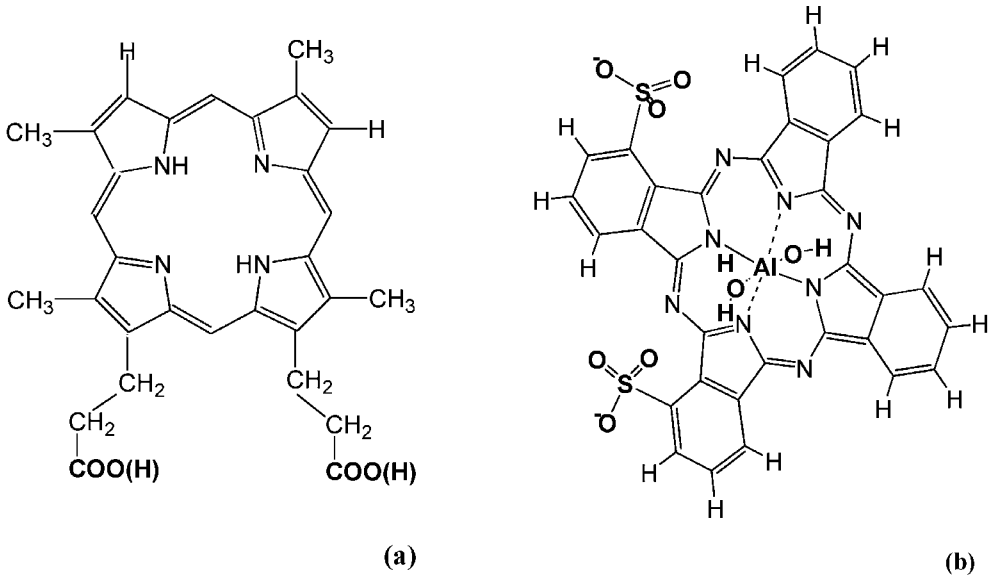


Figure 5.1 : Structure (a) de la deutéroporphyrine (DP) et (b) de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée ($AlPcS_2$).

Ces études confirment que le positionnement des molécules lors de leur interaction avec les membranes est largement influencé par la position des chaînes latérales. L'équilibre entre les interactions répulsives (chaînes polaires / cœur hydrophobe) et attractives (macrocycle / phase hydrocarbonée) existant entre la bicouche lipidique et ces molécules tétrapyrroliques conduit à l'enfoncement plus ou moins profond de la molécule dans chaque feuillet. Moins les chaînes sont chargées, plus l'enfoncement du macrocycle est profond et donc plus le flip-flop est aisé.

De plus, l'une de nos hypothèses de travail est que l'entrée dans les cellules proliférative des molécules tétrapyrroliques est favorisée par leur association avec les LDL. Nous avons donc préalablement étudié l'interaction LDL-deutéroporphyrine. Nous nous intéressons maintenant à l'interaction $AlPcS_2$-LDL

5.1 Généralités

Tout comme celles de la deutéroporphyrine, les propriétés spectrales de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée sont influencées par l'environnement de la molécule (figure 5.2). La longueur d'onde d'excitation conduisant à la plus grande différence de fluorescence entre $AlPcS_2$ en phase aqueuse et $AlPcS_2$ en présence de LDL est 375 nm.

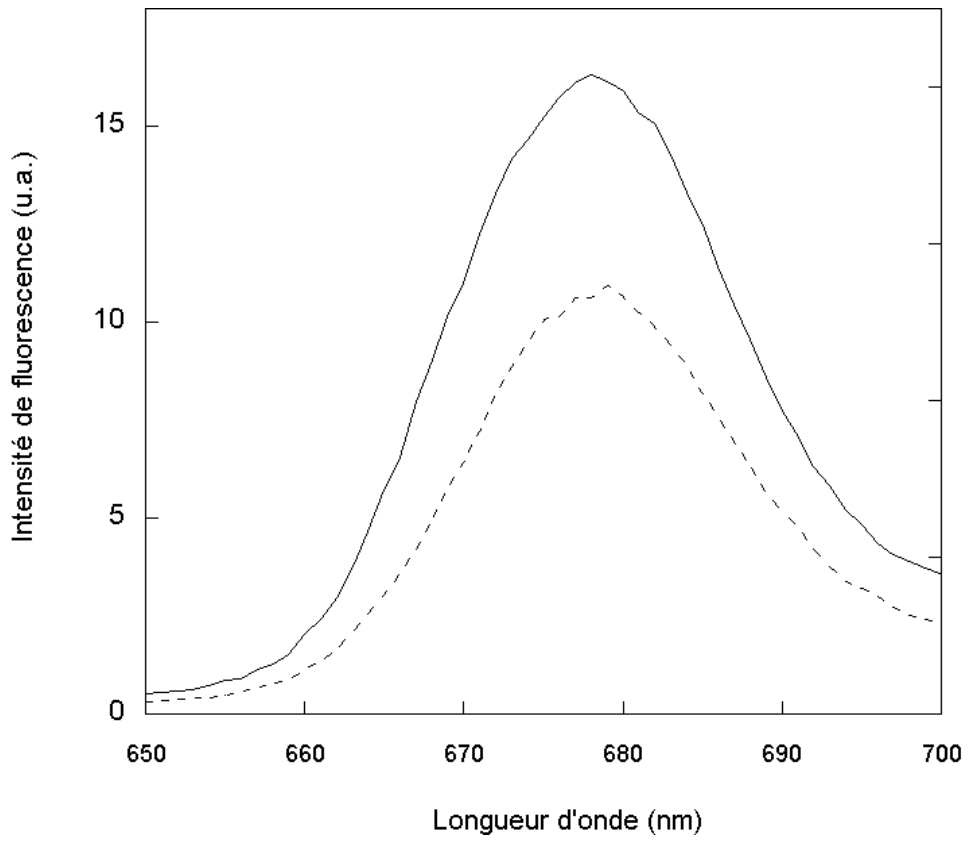


Figure 5.2 : Spectre d'émission de fluorescence de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée ($1,75\times10^{-7}$ M) associée aux LDL (10^{-7} M) (———) et dans du tampon phosphate, PBS (- - -). La longueur d'onde d'excitation était fixée à 375 nm.

Le maximum d'émission de fluorescence se déplace alors de 677 nm en milieu aqueux à 674 nm en présence de LDL. Ce shift s'accompagne d'une augmentation notable de l'intensité [100]. Pour suivre l'association de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée aux LDL, il suffit donc d'observer l'évolution du signal de fluorescence du photosensibilisateur en excitant à 375 nm.

Comme pour la deutéroporphyrine, les changements de fluorescence accompagnant l'association de la molécule aux LDL sont similaire à ceux correspondant à son incorporation dans des liposomes [100]. Ceci indique que les molécules de phtalocyanines associées aux lipoprotéines sont dans un environnement lipidique, tout au moins en ce qui concerne la partie tétrapyrrolique, qui confère à la molécule ses propriétés optiques.

5.2 Etude à l'équilibre de l'interaction $AlPcS_2$-LDL

5.2.1 En suivant le quenching du tryptophane des LDL

La fixation de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée à proximité immédiate de l'apoprotéine des LDL, voire directement à celle-ci, sera détectée en suivant les modifications de fluorescence intrinsèque des lipoprotéines. En effet, comme dans le cas de la deutéroporphyrine, il existe un recouvrement important entre le spectre d'émission des LDL (maximum autour de 330 nm) et le spectre d'absorption de la phtalocyanine (maximum 375 nm).

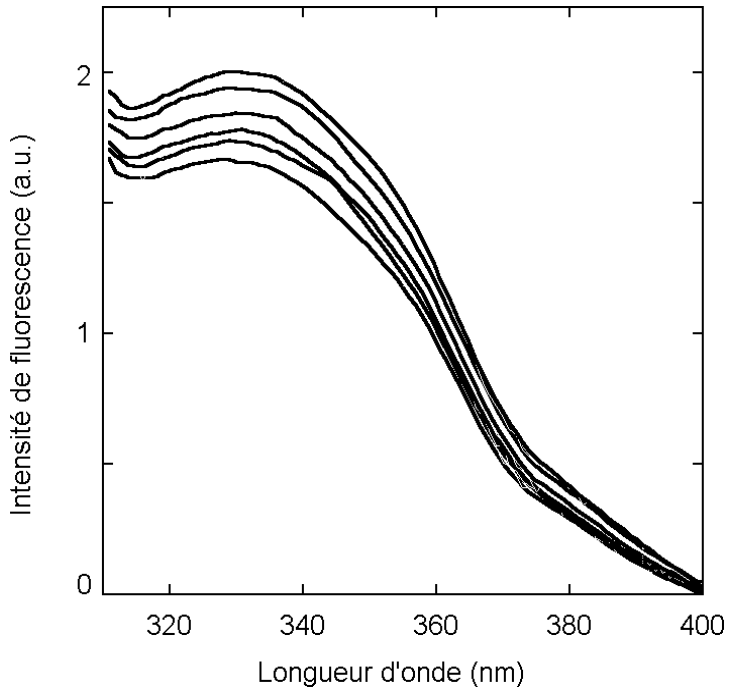


Figure 5.3 : Quenching de la fluorescence intrinsèque des LDL (λ_{ex} = 280 nm) induit par la fixation de la phtalocyanine : Spectres de fluorescence des LDL (4×10^{-8} M) en fonction des quantités croissantes de phtalocyanine d'aluminium disulfonée ajoutées, c'est à dire de la concentration totale en phtalocyanine (P_T). P_T/LDL = 0 ; 2,2 ; 4,4 ; 5,5 ; 6,6 et 8,8.

La figure 5.3 montre que l'association aux LDL de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée induit effectivement une diminution de l'intensité de la fluorescence intrinsèque des lipoprotéines. Cette diminution est fonction de la concentration en phtalocyanine ajoutée à la solution de LDL. Comme dans le cas de la deutéroporphyrine, cette diminution nous permet de mettre en évidence l'existence d'une fixation de *classe P* sur ou à proximité de l'apoprotéine. Les paramètres de cette interaction ont été déterminés de la même façon, en utilisant la méthode de Nishida [35].

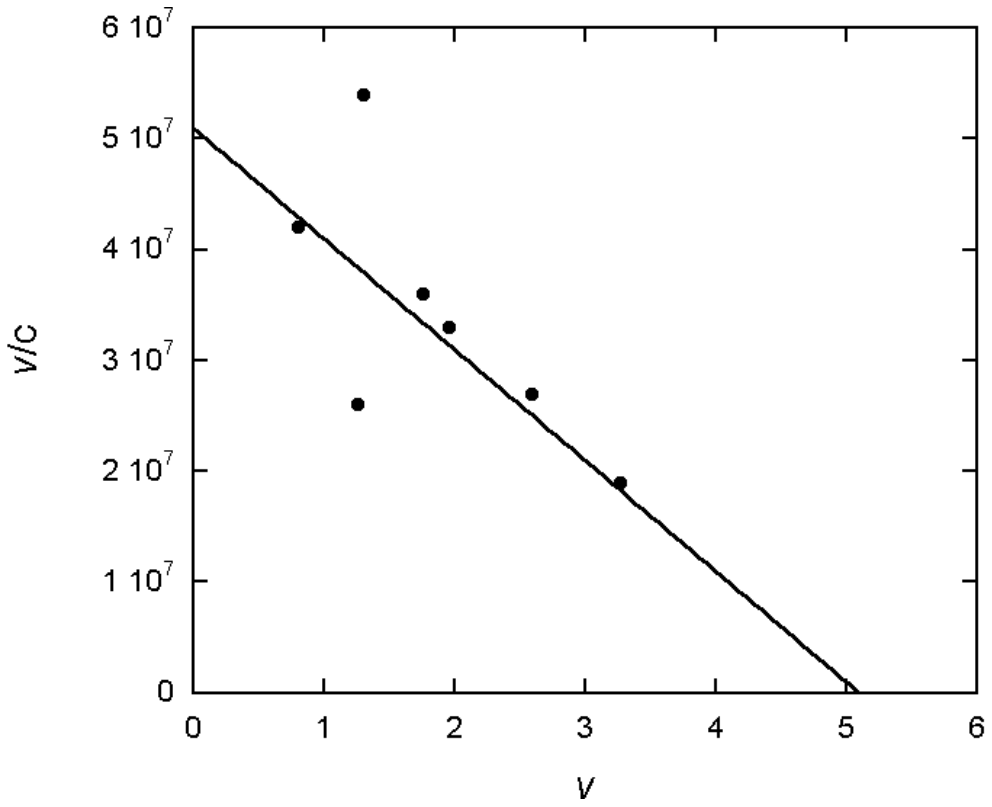


Figure 5.4 : Quantification de l'association de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée aux LDL en suivant les changements de la fluorescence à 330 nm, excitée à 280 nm. Les points ont été calculés selon la méthode de Halfman et Nishida, et représentés en accord avec la méthode classique de Scatchard.

La représentation de Scatchard des données obtenues est montrée figure 5.4. Environ 5 sites de *classe P* sont mis en évidence. La constante d'affinité correspondant à ce premier type de fixation est de $K_P = 5\times10^7$ M^{-1}, chaque site a donc une affinité intrinsèque de l'ordre de 1×10^7 M^{-1}.

5.2.2 En suivant les changements de fluorescence de l'$AlPcS_2$: schéma global de la fixation

Nous avons ensuite suivi les changements du spectre d'émission de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée ($1{,}75\times10^{-7}$ M) induits par des ajouts de quantités croissantes de LDL (figure 5.5). Les solutions utilisées sont à des concentrations suffisamment faibles pour qu'aucun effet d'écran ne se produise. La fluorescence de chaque espèce en solution est donc directement proportionnelle à sa concentration.

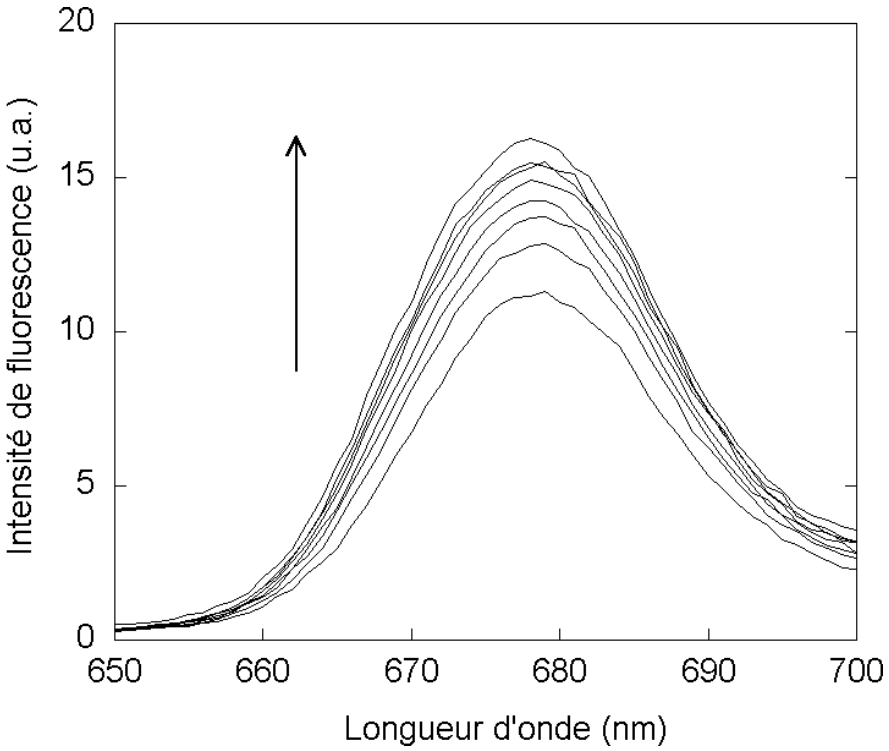


Figure 5.5 : Spectres de fluorescence de $AlPcS_2$ ($1{,}75\times10^{-7}$ M) en présence de différentes quantités de LDL. Longueur d'onde d'excitation : 375 nm. Concentrations en LDL : 0, 10, 15, 20, 30, 40, 50 et 100 $\times10^{-9}$ M. La flèche indique la direction des changements de spectre pour une augmentation de la quantité de LDL.

Les données sont analysées de la même façon que celles correspondantes dans le cadre de l'interaction DP-LDL, c'est à dire à partir de l'équation (4.6) en notant respectivement P_B et P_L les concentrations en phtalocyanine associée aux LDL et libre dans la solution :

$$K_{LDL} = \frac{P_B}{P_F \cdot LDL}$$

En définissant F_∞ et F_0 comme les intensités de fluorescence à 677 nm correspondant à 0% (pas de LDL dans la solution) et 100% (LDL en excès) de molécules associées aux LDL, cette relation s'écrit alors :

$$K_{LDL} = \frac{(F - F_0)}{(F_\infty - F) \cdot LDL} \qquad (5.1)$$

où F est l'intensité de fluorescence à 677 nm d'une solution obtenue par l'ajout d'une quantité donnée de LDL.

La figure 5.6 montre que la fluorescence augmente avec la quantité de LDL ajoutée. L'intersection entre le niveau de plateau (extrapolé) et la pente initiale de la

courbe indique qu'environ $2{,}5\times10^{-8}$ M de LDL peut incorporer autour de $1{,}75\times10^{-7}$ M de phtalocyanine, ce qui signifie que chaque particule peut fixer environ 7 molécules d'$AlPcS_2$. Deux ou trois molécules fixées aux LDL ne participent donc pas au quenching du tryptophane. Cette fixation correspond donc à une association aux lipides et sera donc nommée fixation de *classe L*.

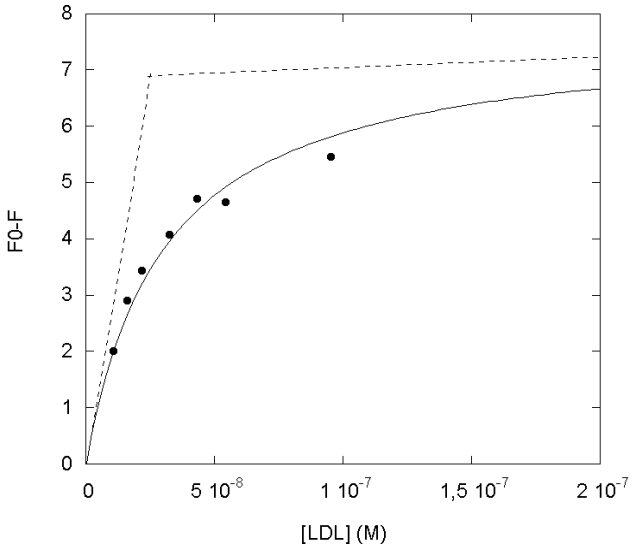


Figure 5.6 : Evolution de la fluorescence de la solution d'$AlPcS_2$ ($1{,}75\times10^{-7}$ M) en fonction de la concentration en LDL, calculée à partir des spectres de la figure 5.5. La courbe correspond au meilleur ajustement des valeurs expérimentales par la l'équation (5.1). Elle donne ici $K_{LDL} = 5\times10^{7}$ M^{-1}.

L'équation (5.1) peut également s'écrire sous la forme :

$$\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{F_0 - F_\infty} + \frac{1}{K_{LDL}\cdot[LDL]\cdot\left(F_0 - F_\infty\right)} \qquad (5.2)$$

La représentation en double inverse $1/(F_0\text{-}F) = f([LDL])$ donne donc accès directement à la valeur de K_{LDL}, en faisant le rapport de la pente obtenue et de sa valeur à l'origine (figure 5.7). La valeur obtenue confirme la validité de l'ajustement de la figure 5.6. Néanmoins, il faut noter que le type d'analyses réalisées à partir des équations (5.1) et (5.2) implique que les LDL soient en excès par rapport à la phtalocyanine. Compte tenu des résultats obtenus, il semble que nos conditions expérimentales ne remplissent pas tout à fait cette condition. Cependant, des impératifs expérimentaux (sensibilité et effet d'écran) nous ont interdit de diminuer la concentration en phtalocyanine ou d'augmenter celle des LDL. La valeur de la constante d'affinité est donc certainement sous estimée.

Le meilleur ajustement linéaire des points expérimentaux de la figure 5.7 donne accès à la valeur de la constante d'affinité globale de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée pour les lipoprotéines de basse densité, qui est d'environ 5×10^{7} M^{-1} dans du tampon phosphate à pH 7,4. Or, la même valeur a été attribuée à K_P correspondant à la fixation de *classe* P. La fixation de *classe L* a donc une constante d'affinité relativement faible. Elle n'implique, cependant, que peu de molécules.

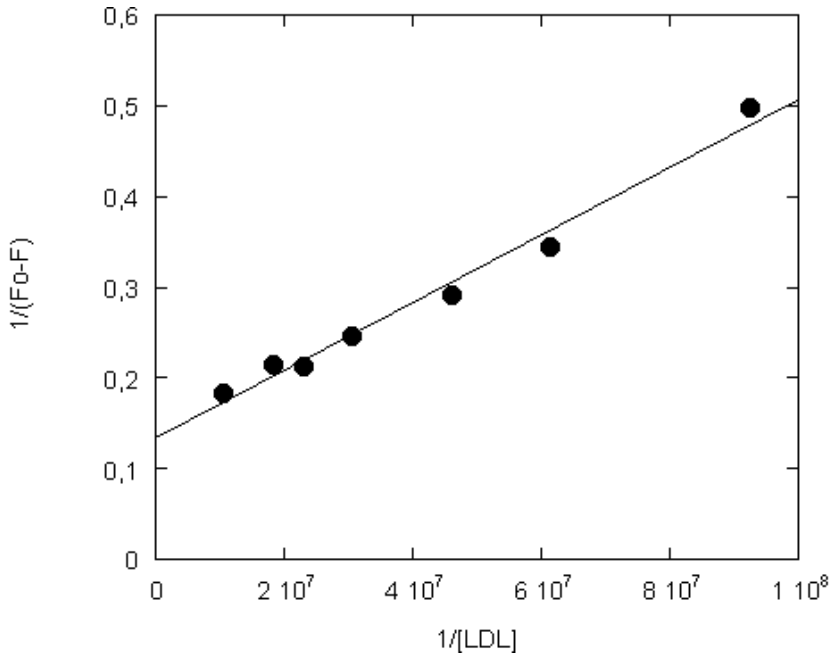


Figure 5.7 : Détermination de la constante d'affinité de $AlPcS_2$ pour les LDL. Les intensités de fluorescence sont dérivées des spectres de la figure 5.5 et l'ajustement linéaire correspond à l'équation (5.2). La constante déduite correspond à $K_{LDL} \cong 5\times10^7\ M^{-1}$.

L'équilibre de l'interaction LDL-AlPcS$_2$

Les expériences réalisées à partir de l'observation des changements de fluorescence de la phtalocyanine, ainsi que de celle du tryptophane, nous ont permis de caractériser deux types de fixation. Le premier, impliquant cinq sites, conduit à un quenching de la fluorescence des résidus tryptophanes des lipoprotéines. Il s'agit de la fixation de *classe P*. Ce type de fixation de la phtalocyanine sur les LDL a déjà été mis en évidence par ailleurs [142]. Quelques molécules supplémentaires de phtalocyanine peuvent s'associer aux LDL sans mettre en jeu ce phénomène de FRET. Il s'agit de fixation de *classe L*, dans les lipides, qui correspond à la solubilisation des phtalocyanines dans la phase lipidique des LDL. Ce type de fixation a également déjà été évoqué dans la littérature [134, 142].

Comme pour la deutéroporphyrine, les sites de *classe P* sont localisés soit sur l'apoprotéine B-100 soit, plus probablement, à l'interface entre les parties protéique et lipidique des LDL. En effet, le spectre de fluorescence intrinsèque de ces lipoprotéines présente un maximum à plus de 330 nm. Cette valeur est typique de la fluorescence d'un résidu tryptophane dans un environnement fortement apolaire [136]. Cette hypothèse sera plus amplement discutée par la suite.

5.3 Etudes cinétiques de l'interaction $AlPcS_2$-LDL

5.3.1 Association de la phtalocyanine aux LDL

Les cinétiques d'association de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée aux LDL ont été suivies par enregistrement des variations, au cours du temps, de la fluorescence de la phtalocyanine excitée à 375 nm. Une solution d'$AlPcS_2$ ($4{,}4\times10^{-8}$ M après mélange) est mélangée, dans notre appareil de stopped-flow, avec une solution de LDL dont on fait varier la concentration (5×10^{-8}, $7{,}5\times10^{-8}$, 1×10^{-7}, $1{,}25\times10^{-7}$ et $1{,}5\times10^{-7}$ M après mélange). Les signaux enregistrés correspondent chacun à une moyenne sur dix tirs. De plus, comme toujours dans nos expériences, les conditions sont telles qu'il n'existe aucun effet d'écran. Nous avons pour cela utilisé les possibilités qu'offre notre appareil de travailler sur un chemin optique plus court (2 mm au lieu de 10). L'intensité de fluorescence émise par chaque forme de la phtalocyanine est donc directement proportionnelle à sa concentration.

Un signal expérimental typique, correspondant à la plus forte concentration en LDL, est donné figure 5.8. L'intensité de fluorescence de la phtalocyanine excitée à 375 nm augmente dans le temps. Les changements du signal de fluorescence sont très rapides et ces signaux sont très bien ajustés par des courbes bi-exponentielles. Compte tenu des concentrations auxquelles nous avons réalisé ces mesures, ces cinétiques ont été considérées comme étant du pseudo premier ordre et vont donc être analysées comme dans le chapitre précédent pour l'interaction des LDL avec la deutéroporphyrine.

Les donnée obtenues à l'équilibre ont permis de caractériser deux types de fixation de la phtalocyanine aux LDL, définis comme fixation de *classe P* et de *classe L*. L'association $AlPcS_2$-LDL sera donc décrite par un système d'équations différentielles identique à (4.10a-c). Le traitement sera donc semblable*. La solution de ce système permet d'exprimer la concentration en phtalocyanine libre (P_F) sous la forme d'une bi-exponentielle similaire à l'expression (*a*.3) :

$$P_F = A_0 - A_1 \times \exp(-k_1 \times t) - A_2 \times \exp(-k_2 \times t)$$

* Les modèles cinétiques sont développés en annexe.

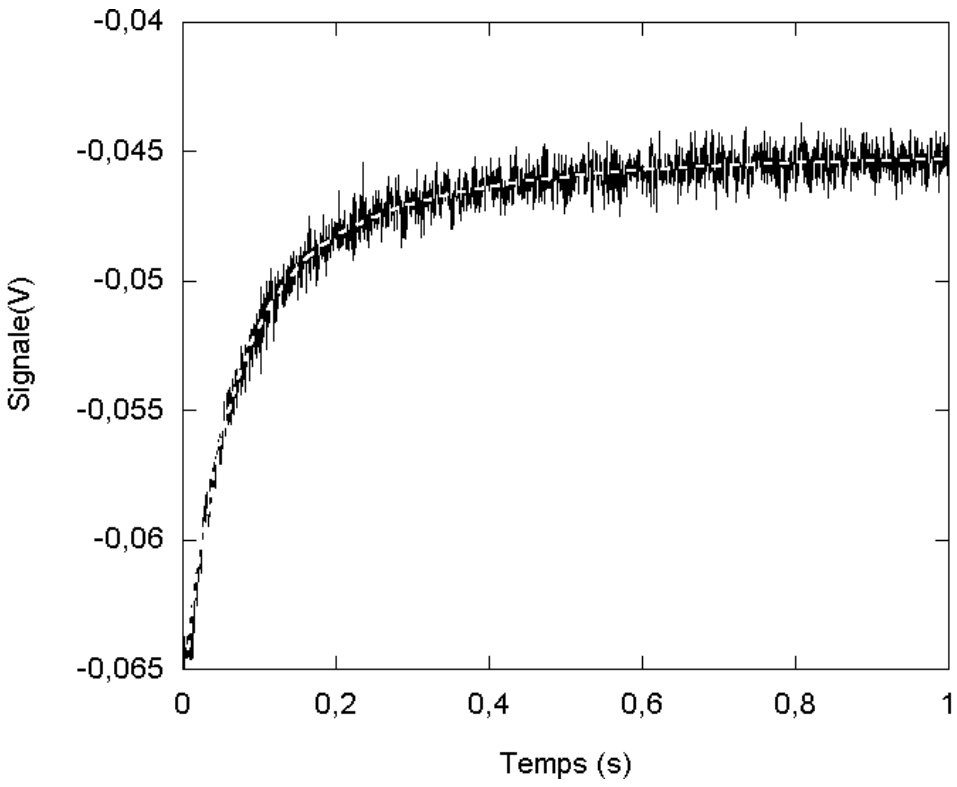


Figure 5.8 : Cinétique de l'association de la phtalocyanine l'aluminium disulfonée aux LDL : Exemple de signal de fluorescence enregistré après le mélange de la phtalocyanine ($4{,}4\times10^{-8}$ M) avec les LDL ($1{,}5\times10^{-7}$ M). Le meilleur ajustement bi-exponentiel est superposé au signal.

Les expressions des constantes de vitesse de ces signaux bi-exponentiels sont données par l'équation (4.11) :

$$k_{1,2} = \frac{1}{2}\times\left[\Sigma k \pm \sqrt{(\Sigma k)^2 - 4\times(k_{dP}\times k_{dL} + k'_{aL}\times k_{dP} + k'_{aP}\times k_{dL})}\right] \qquad (5.3)$$

où $\Sigma k = k_{dP} + k'_{aP} + k_{dL} + k'_{aL}$

Les amplitudes s'écrivent :

$$A_0 = P_{F(t=0)}\times\frac{k_{d1}\times k_{d2}}{k_1\times k_2} \qquad (5.4)$$

$$A_1 = P_{F(t=0)}\times\frac{(k_1)^2 - k_1(k_{dP}+k_{dL}) + k_{dP}\times k_{dL}}{k_1(k_2-k_1)} \qquad (5.5)$$

$$A_2 = P_{F(t=0)}\times\frac{(k_2)^2 - k_2(k_{dP}+k_{dL}) + k_{dP}\times k_{dL}}{k_2(k_1-k_2)} \qquad (5.6)$$

De plus, le rapport des amplitudes de la phase lente et de la phase rapide est donné par :

$$\frac{A_2}{A_1} = \frac{\left(k_2\right)^2 - k_2\left(k_{dP} + k_{dL}\right) + k_{dP} \times k_{dL}}{\left(k_1\right)^2 - k_1\left(k_{dP} + k_{dL}\right) + k_{dP} \times k_{dL}} \qquad (5.7)$$

Les constantes de vitesse de chacune des deux phases de nos signaux expérimentaux sont déterminées et représentées en fonction de la concentration en LDL (figure 5.10). Le même traitement est opéré pour les amplitudes relatives, A_2/A_1 (figure 5.11). Les courbes théoriques sont calculées respectivement à l'aide des équations (5.3) et (5.7). Cependant, pour que les valeurs déterminées par cet ajustement soient significatives, il nous a fallu diminuer le nombre de degrés de liberté. Pour cela, et avant d'aller plus loin dans l'analyse, nous avons déterminé les cinétiques de transfert de la phtalocyanine des LDL vers la HSA en excès, afin d'avoir un accès aux valeurs de k_{dP} et k_{dL}.

5.3.2 Transfert de $AlPcS_2$ des LDL vers la HSA

L'étude dynamique de l'association de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée aux LDL met très clairement en évidence la rapidité de cette interaction. Néanmoins, elle ne nous a pas permis de déterminer les paramètres cinétiques correspondants. En effet, le nombre de paramètres ajustables est bien trop important. Le transfert de la porphyrine vers l'albumine de sérum humain (HSA), a précédemment été utilisé avec succès pour déterminer les constantes de vitesse de sortie de la deutéroporphyrine dans le cadre de l'étude de son incorporation dans les LDL. Nous l'avons utilisé ici afin de déterminer les valeurs de k_{dP} et k_{dL} et de diminuer les degrés de liberté lors de nos ajustements.

Comme pour la deutéroporphyrine, nous avons considéré que le transfert de la phtalocyanine des LDL vers la HSA a lieu via la phase aqueuse. Si ce phénomène se faisait par collision, nous aurions, comme dans le cas de la porphyrine, des signaux mono-exponentiels (voir équation 4.19). Nous avons pré-chargé des LDL ($7{,}5\times10^{-8}$ M) avec de la phtalocyanine ($2{,}2\times10^{-8}$ M). Dans ces conditions, plus de 90% des molécules de colorant sont associées aux LDL. Le signal expérimental obtenu après mélange à 10^{-4} M de HSA est donné sur la figure 5.9. Ce signal est bi-exponentiel. Etant donné que les amplitudes des deux phases sont comparables, il nous est possible de différencier clairement les constantes de chacun des termes exponentiels. Les concentrations en LDL et en HSA étant grandes devant celle d'$AlPcS_2$, l'analyse des résultats a été réalisée en considérant les processus comme

étant du pseudo premier ordre. La HSA étant en excès, il découle du modèle théorique que les constantes de vitesse de chacune des deux phases donnent directement accès aux valeurs des constantes de dissociations (voir équation 4.15-16).

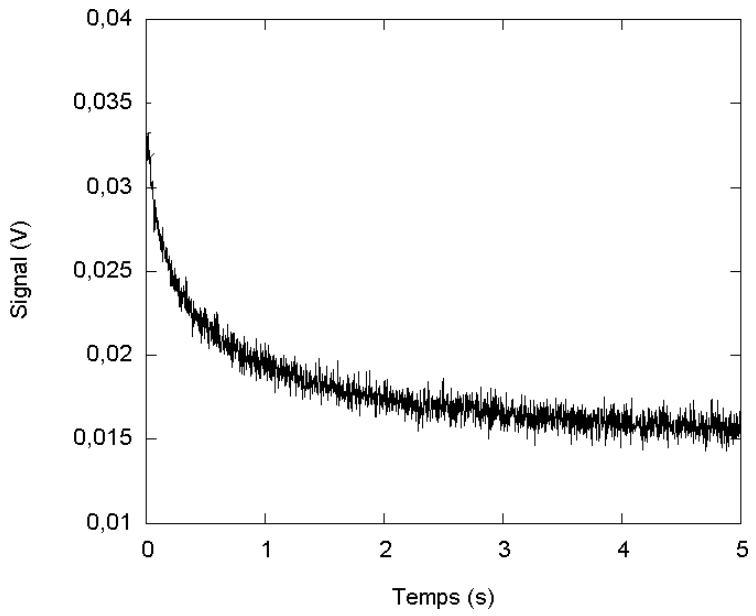


Figure 5.9 : Signal de fluorescence enregistré après le mélange de LDL ($7{,}5\times10^{-8}$ M) chargés en $AlPcS_2$ ($2{,}2\times10^{-8}$ M) avec de l'albumine en excès (10^{-4} M).

Les constantes de vitesses des termes exponentiels s'écrivent donc :

$$\text{(a)} \begin{cases} k_1 = k_{dP} \\ k_2 = k_{dL} \end{cases} \quad \text{ou} \quad \text{(b)} \begin{cases} k_1 = k_{dL} \\ k_2 = k_{dP} \end{cases} \qquad (5.8)$$

Le meilleur ajustement entre la courbe théorique bi-exponentielle et nos données expérimentales donne $k_1 \cong 6{,}8\ s^{-1}$ et $k_2 \cong 0{,}8\ s^{-1}$.

5.3.3 Analyse des résultats : Ajustements, simulations et synthèse de la dynamique de l'association

A partir de ces valeurs, nous avons retravaillé sur les données correspondant à l'association $AlPcS_2$-LDL. Connaissant les valeurs des constantes d'équilibre et des constantes de vitesse de dissociation, il nous est possible, comme dans le cas de la deutéroporphyrine, de calculer les constantes de vitesse d'association.

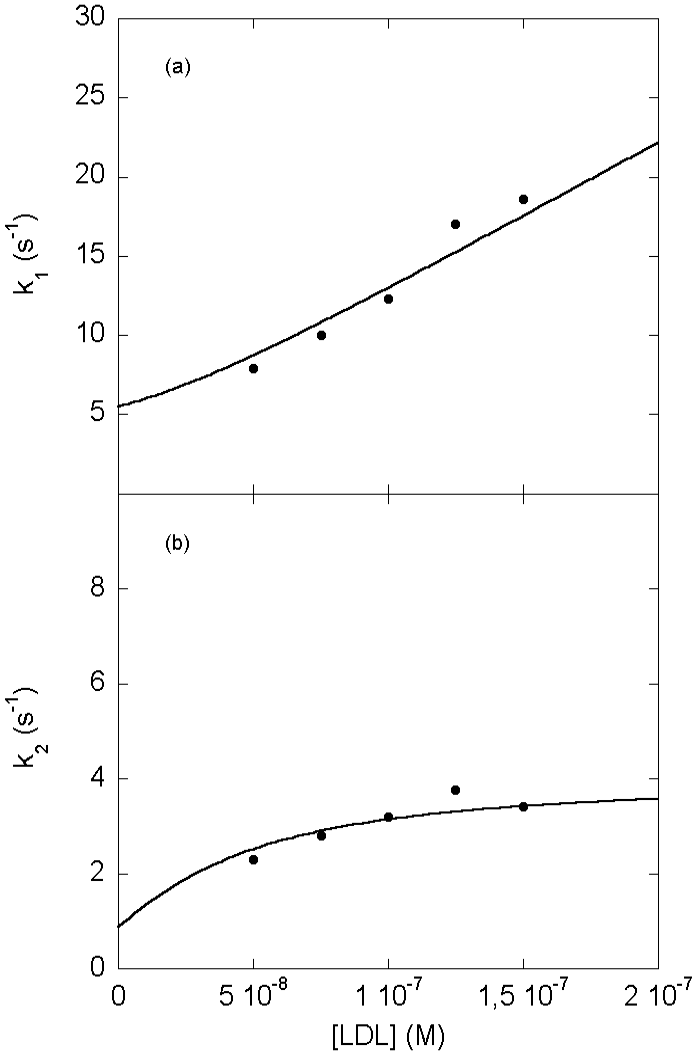


Figure 5.10 : Constantes de vitesse de l'association de la phtalocyanine d'aluminium di-sulfonée avec les LDL.

(a) : première phase,
(b) : deuxième phase.

$[AlPcS_2] = 4{,}4\times10^{-8}$ M

Les courbes théoriques ont été calculées à partir de l'équation (5.3) et des valeurs données dans le tableau 5.1.

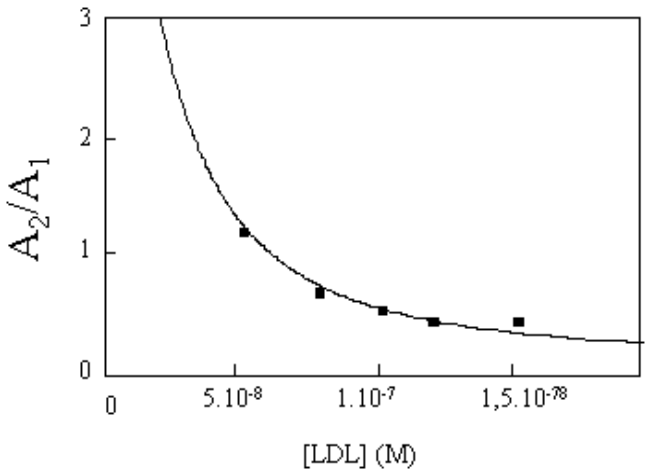


Figure 5.11 : Rapport des amplitudes phase lente / phase rapide du signal de fluorescence correspondant à l'association de la phtalocyanine aux LDL. La courbe théorique est calculée à partir de l'équation (5.7) et des valeurs du tableau 5.1.

Nous avons ainsi obtenu deux jeux possibles de constantes, correspondant chacun aux deux attributions possibles de k_1 et k_2 (voir équations 5.8). Les ajustements entre les données expérimentales et les courbes théoriques correspondantes (équation 5.3 et 5.7) ont été réalisés avec chacun de ces jeux de valeurs. Nous avons ainsi pu montrer clairement que $k_{dP} = 0{,}8\ s^{-1}$ et $k_{dL} = 6.8\ s^{-1}$, et que l'attribution inverse n'est pas compatible avec nos résultats expérimentaux. Afin d'affiner ces données et de les rendre cohérentes avec l'ensemble de nos résultats, les cinétiques d'***association*** de la phtalocyanine aux LDL ont été simulées sur ordinateur en imposant les valeurs des constantes de dissociation. Les valeurs obtenues sont données dans le tableau 5.1.

Pour les constantes de vitesse, k_1 et k_2, des termes exponentiels de l'***association*** de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée aux LDL, les résultats de ces simulations sont donnés en figure 5.10. Cette figure montre la bonne adéquation obtenue entre les courbes théoriques et les points expérimentaux. De plus, en accord avec l'équation (5.7), l'amplitude de la seconde phase exponentielle diminue avec l'augmentation de la concentration en LDL (figure 5.11). Sur cette figure, la courbe théorique correspond au résultat de nos simulations sous MathCad. Sa bonne correspondance avec les points expérimentaux confirme la validité de notre modèle et des valeurs des paramètres physico-chimiques obtenus

	Constantes cinétiques				
n_P	k_{aPi}	k_{aP}	k_{dP}	k_{aL}	k_{dL}
5 (b, b*)	$1\times10^7\ M^{-1}s^{-1}$ (a)	$5\times10^7\ M^{-1}s^{-1}$ (a)	$0.8\ s^{-1}$ (a)	$3{,}5\times10^7\ M^{-1}s^{-1}$ (a)	$6{,}8\ s^{-1}$ (a)
	Constantes d'équilibre				
	K_{Pi}	K_P		K_L	
	$1{,}25\times10^7\ M^{-1}$ (a)	$6{,}25\times10^7\ M^{-1}$ (a) $5\times10^7\ M^{-1}$ (b*)		$5{,}1\times10^6\ M^{-1}$ (a)	
	K_{LDL}				
	$5\times10^7\ M^{-1}$ (b)		$6{,}76\times10^7\ M^{-1}$ (a)		

Tableau 5.1 : Paramètres physico-chimiques de l'interaction $AlPcS_2$-LDL.

(a) valeurs déterminées à partir des expériences cinétiques et des simulations correspondantes. Les constantes d'équilibre ont été calculées à partir de la relation (4.17).

(b) Constantes d'équilibre calculées à partir des expériences à l'équilibre, l'astérisque indiquant les expériences suivies à partir de la fluorescence intrinsèque des LDL.

5.4 Discussion

In fine, deux types de fixation de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée aux LDL ont été caractérisés. Le premier, de *classe P*, induit un quenching de la fluorescence des LDL et correspond à la fixation des molécules sur cinq sites bien définis, vraisemblablement situés à l'interface lipide-apoprotéine. Le second, défini comme fixation de *classe L*, peut être assimilé au simple phénomène de répartition des molécules de phtalocyanine entre le milieu aqueux et la phase lipidique des LDL.

Le processus prédominant lors de l'interaction de la phtalocyanine avec les LDL est donc la fixation de *classe P*. Afin de mieux appréhender la nature de cette fixation, nous l'avons comparée avec un processus limité par diffusion. La limite théorique de ce type de mécanisme est donnée par la constante de diffusion, k_D. R_{LDL} et R_P sont respectivement les rayons d'un LDL et d'une molécule de phtalocyanine, D_{LDL} et D_P leurs coefficients de diffusion dans le milieu. N étant la constante d'Avogadro, cette constante de diffusion limite s'écrit [140] :

$$k_D = 4\,\pi\,(R_{LDL} + R_P)\,(D_{LDL} + D_P)\,N \qquad (5.9)$$

Le coefficient de diffusion a été estimé, grâce à celui des porphyrines, en tenant compte de la taille de la molécule à $(1\text{-}1{,}5)\times10^{-10}$ m^2/s [127]. Le coefficient de diffusion des LDL est de 2×10^{-11} m^2/s [141]. Les rayons de ces deux molécules sont respectivement de 8×10^{-10} m et 11×10^{-9} m. A partir de l'équation (5.9), la valeur de k_D peut être estimée à $1{,}1\times10^{10}$ $M^{-1}s^{-1}$. La constante de vitesse d'association de la phtalocyanine aux LDL a été déterminée expérimentalement à $5\times10^{7}M^{-1}s^{-1}$. Cette valeur est relativement éloignée de la limite de diffusion. Cependant, compte tenu du fait que cette fixation met en jeu cinq sites dont la taille est sans doute du même ordre que celle de la phtalocyanine, cette valeur est tout à fait vraisemblable. La diminution observée est moins importante que ce à quoi nous nous attendions dans le cas de sites ponctuels sur l'apoprotéine : la diminution correspondant au rapport de surface aurait été de l'ordre de 5×10^{3}. La valeur de k_{aP} est donc en faveur de l'implication des interfaces lipo-protéiques, bien que les sites de *classe P* correspondent vraissemblablement à des sites relativement bien définis (la diminution observée pour la valeur de k_{aP} est en effet relativement plus importante ici que dans le cas de la deutéroporphyrine, indiquant que les « sites » impliqués sont plus localisés).

La constante d'affinité correspondant à la fixation de *classe L* est très faible. Contrairement à ce que la taille de son macrocycle laissait penser, la phtalocyanine d'aluminium disulfonée s'associe peu aux lipides des LDL, comme cela a déjà été suggéré par ailleurs [134 , 143]. La constante d'affinité des molécules d'$AlPcS_2$ pour les phospholipides a été étudiée sur des vésicules de dimyristoylphosphatidylcholine

(DMPC) [100]. Elle est de $2{,}7\times10^{6}$ M^{-1}. Une comparaison peut donc être faite sur la base du nombre de phospholipides à la surface d'un LDL, la constante d'affinité pour la fixation de *classe L* s'écrivant alors, exprimée par mole de phospholipide K_L = $6{,}38\times10^{3}$ M^{-1}. Cette valeur est donc plus de deux ordres de grandeurs plus faible que celle attendue. Néanmoins, la présence d'un grand nombre de molécules de cholestérol dans les LDL pourrait influer assez fortement sur l'affinité. De plus, les charges portées par la phtalocyanine sont sans doute un obstacle à son incorporation dans les lipides, alors qu'elles pourraient favoriser les interactions avec les résidus polaires de l'apoprotéine, potentialisant ainsi la fixation de *classe P*. D'autre part, le même type de comparaison peut être réalisé sur la constante de vitesse d'entrée, k_{aL}. Celle-ci donne, exprimée par rapport à la concentration en phospholipides, k_{aL} = $4{,}4\times10^{4}$ $M^{-1}s^{-1}$. Cette valeur est relativement proche de celle obtenue dans les vésicules, 1.37×10^{5} $M^{-1}s^{-1}$.

Enfin, comme dans le cas de la deutéroporphyrine, nous n'avons pas pu mettre en évidence un éventuel peuplement du cœur des lipoprotéines par la phtalocyanine. Or, la surface des LDL n'est constituée que d'une monocouche lipidique, et non d'une bicouche comme les liposomes. La relativement faible affinité de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée pour les LDL est donc a considérer au regard de la taille importante du macrocycle de cette molécules.

4.5 Conclusion

Les LDL ont une forte affinité pour la phtalocyanine d'aluminium disulfonée et peuvent en incorporer près sept ou huit. Comme dans le cas de la deutéroporphyrine, la reconnaissance des LDL par leur récepteurs spécifiques ne devrait pas être altérée par l'association de cinq molécules d'$AlPcS_2$ sur l'apoprotéine [71, 74]. Néanmoins, des études réalisées sur une autre phtalocyanine, la Zn(II)-phtalocyanine, suggèrent que la reconnaissance des LDL par les récepteurs « B/E » est altérée par la fixation cette molécule [143]. Il faut cependant remarquer que cette dernière, parfaitement hydrophobe, se comporte très différemment de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée, amphiphile. Notamment, cette molécule semble peupler le cœur hydrophobe des LDL, déstabilisant ainsi leur structure et donc empêchant donc leur internalisation cellulaire par endocytose spécifique. L'interaction des molécules d'$AlPcS_2$ avec les LDL est très différente, et les phénomènes observés permettent de l'apparenter à l'interaction de la deutéroporphyrine avec les LDL. Il semblerait donc que ces phénomènes soient

caractéristiques des molécules amphiphiles et ne soient que peu influencés par la nature du macrocycle. Remarquons cependant ici que si l'interaction $AlPcS_2$-LDL est un phénomène rapide, qui pourra donc facilement être modifié par des changements d'environnement, cette dynamique est ralentie par rapport au cas de la deutéroporphyrine. Notamment, les échanges de molécules avec d'autres transporteurs ou avec le milieu extérieur seront sans doute plus limités.

CHAPITRE 6 : RESULTATS 4 – Mécanisme d'internalisation cellulaire, incorporation et localisation subcellulaire

Résumé

Dans ce dernier chapitre expérimental, nous corrélons nos résultats cinétiques au niveau moléculaire avec la répartition *in vivo* des molécules tétrapyrroliques dans les cellules, étudiée par microscopie de fluorescence . Il est généralement admis que l'incorporation cellulaire et la localisation subcellulaire des photosensibilisateurs dépendent étroitement de leur structure. L'internalisation cellulaire peut se faire soit par endocytose, soit par diffusion passive. On peut s'attendre a ce que les affinités des photosensibilisateurs tétrapyrroliques pour les membranes et les LDL, et plus particulièrement les dynamiques de ces interactions, jouent des rôles déterminants. Nous nous sommes concentrés sur deux molécules tétrapyrroliques amphiphiles : la deutéroporphyrine et la phtalocyanine d'aluminium disulfonée. En effet, ces deux molécules, dont la structure est relativement proche, possèdent une affinité élevée pour les membranes et les LDL ainsi que des cinétiques d'échange avec le milieu aqueux rapides. Cependant, elles diffèrent fortement par leur vitesse de traversée des membranes (flip-flop) : moins d'une seconde pour la porphyrine, plusieurs heures pour la phtalocyanine. Ainsi, la redistribution entre les systèmes lipidiques sub-cellulaires sera a priori rapide pour la porphyrine et presque inexistante pour la phtalocyanine. De fait, les observations en microscopie de fluorescence sur des fibroblastes mettent en évidence un marquage diffus des cellules par la porphyrine, qui n'est pas significativement modifiée par sa vectorisation via des LDL. Pour la phtalocyanine, par contre, la distribution cellulaire est fortement modifiée par les LDL : ils augmentent le taux d'incorporation et favorisent une localisation lysosomiale des molécules de colorant. Si les LDL sont incontestablement des vecteurs intéressants pour beaucoup de photosensibilisateurs et de médicaments anti-cancéreux, la localisation subcellulaire, et donc l'efficacité, de ces produits est directement sous contrôle de leur dynamique d'interaction avec les membranes.

Chapitre 6

MECANISME D'INTERNALISATION CELLULAIRE, INCORPORATION ET LOCALISATION SUBCELLULAIRE

Dans ce dernier chapitre sont présentés les résultats portant sur l'incorporation cellulaire des molécules porphyrique considérées. Nous avons étudié, par microscopie de fluorescence, l'adéquation des résultats de nos études de dynamique en solution avec la répartition subcellulaire des molécules porphyriques dans les cellules. Notre objectif est, en effet, de corréler les comportements cellulaires de ces molécules et la dynamique de leur interaction avec les membranes d'une part et les LDL d'autre part.

Comme nous l'avons précédemment précisé, ces molécules ont chacune des affinités très importantes pour les LDL et pour les membranes. Leurs comportements vis à vis des membranes diffèrent cependant fortement par la vitesse du flip-flop, qui est extrêmement rapide pour la porphyrine mais très lent (plusieurs heures dans les conditions physiologiques) pour la phtalocyanine. Sur l'échelle de temps correspondant à la durée de nos expériences, le flip-flop de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée peut donc être considéré comme inexistant (figure 6.1). La localisation subcellulaire de ces molécules dépend a priori de la voie d'internalisation cellulaire qu'elles ont suivie (endocytose ou diffusion passive, voir figure 6.2). Cependant, compte tenu de leurs caractéristiques de dynamique en solution, on peut s'attendre à ce que la redistribution entre les systèmes lipidiques sub-cellulaires soit rapide pour la porphyrine et presque inexistante pour la phtalocyanine, et ce quel que soit le chemin d'internalisation suivi.

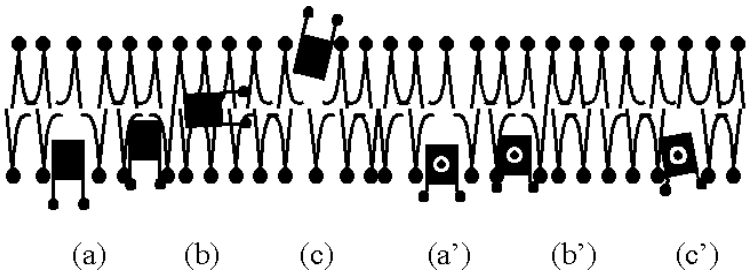


Figure 6.1 : Schéma du comportement dans les membranes des deux molécules tétrapyrroliques sur lesquelles nous avons travaillé. (a, b et c) : Entrée, flip-flop et sortie de la deutéroporphyrine ; (a', b' et c') : Entrée, flip-flop négligeable et sortie de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée. Sur cette figure, les diamètres des molécules des colorants et l'épaisseur de la membrane sont représentatifs des tailles réelles.

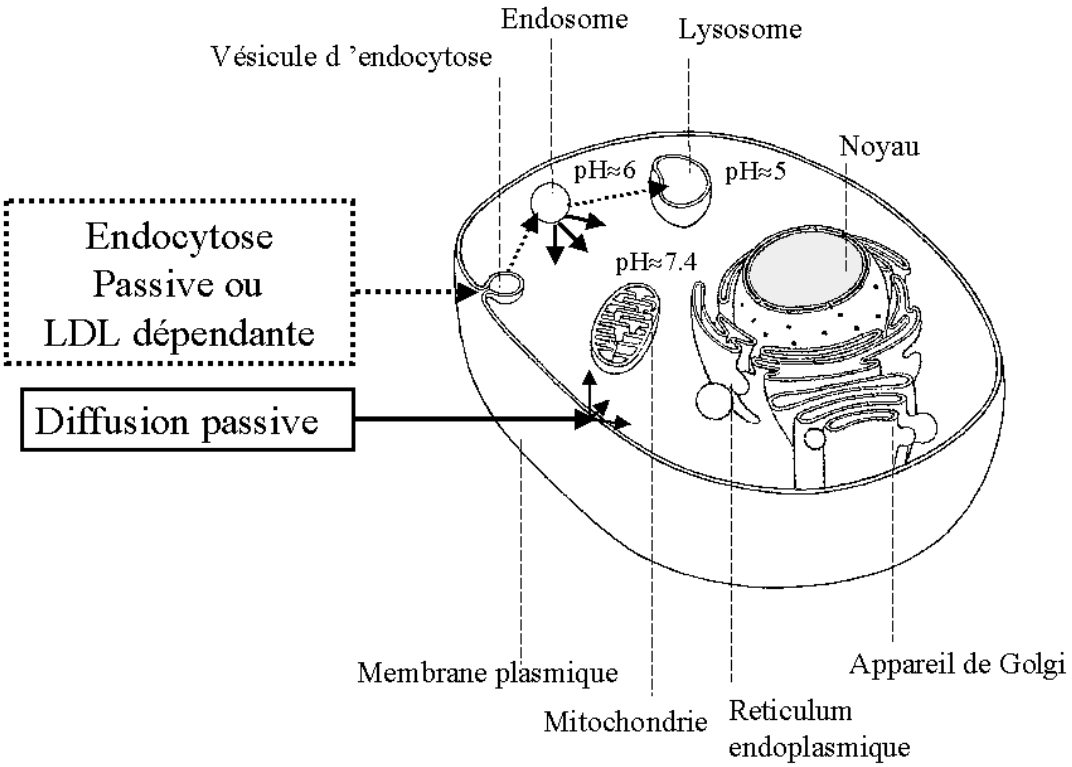


Figure 6.2 : Représentation des différents mécanismes potentiels d'internalisation d'une molécule hydrophobe ou amphiphile par une cellule. Les différentes structures cellulaires peuvent être des localisations potentielles de la molécule, en fonction de la voie d'internalisation suivie par celle-ci.

6.1 Généralités

Les études cellulaires présentées ici ont été réalisées sur une souche humaine de fibroblastes dermiques (voir figure 6.3), HS68. Cette lignée a été développée en 1969 au laboratoire naval de biosciences (NBL) à Oakland, CA. Le matériel a été prélevé sur un garçon nouveau-né, de type « caucasien », apparemment normal au moment du prélèvement.

Les fibroblastes sont des cellules de grande taille, fusiformes, provenant des tissus conjonctifs (tissu de remplissage et de soutien rencontré fréquemment dans l'organisme et contenant des fibres élastiques et du collagène). Ces cellules ont la caractéristique d'être en voie de prolifération, de multiplication. Les fibrocytes sont les mêmes cellules arrivées à maturité. Les fibroblastes sont couramment utilisés comme modèle cellulaire, notamment du fait de leur grande taille, qui facilite les observations microscopiques, et de la facilité de leur mise en culture. De plus, dans le cadre de notre étude portant sur l'incorporation préférentielle des porphyrines par les tissus prolifératifs, les fibroblastes sont un modèle d'autant plus approprié qu'il s'agit de cellules en multiplication.

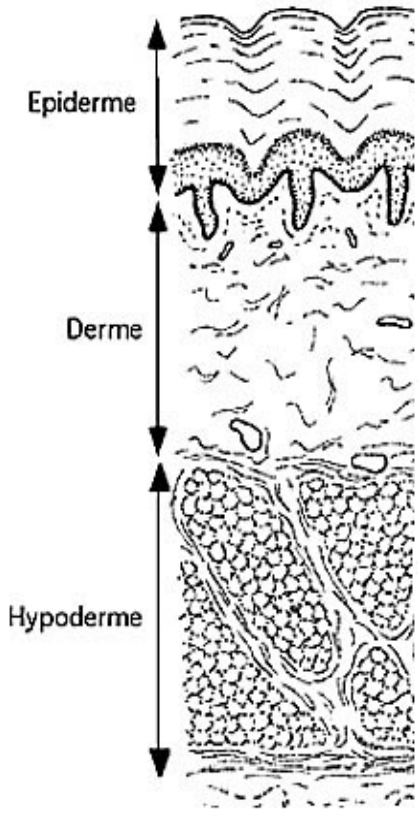


Figure 6.3 : Coupe transversale de la peau (ici d'une peau épaisse) de mammifère.

Les fibroblastes sont les cellules majoritaires de la couche médiane de cette structure, appelée le derme. L'ensemble de cette structure repose sur la lame basale.

Cultivés *in vitro*, les fibroblastes ne peuvent se diviser qu'un nombre limité de fois. Au delà, les cellules subissent un phénomène de crise qui les empêche d'entrer dans le cycle mitotique [144]. Les fibroblastes meurent ensuite rapidement. Cependant, certaines cellules échappent à ce phénomène et subissent alors une profonde transformation. La crise et la sénescence s'accompagnent de modifications oncogéniques. Ces variations peuvent permettre d'appréhender les interrelations vieillissement/cancer. La sénescence est associée à un mécanisme de réduction télomérique. Ces phénomènes, observés *in vitro*, peuvent expliquer en partie le vieillissement *in vivo* : le nombre de cycles cellulaires d'un fibroblaste en culture diminue avec l'âge du donneur. Ce nombre de cycle est moindre dans les maladies où on observe un vieillissement précoce.

Pour la lignée HS68, prélevée sur un nouveau-né, les études de longévité effectuées au NBL ont démontré que les cellules peuvent être maintenues correctement jusqu'à 42 passages. De façon à éviter tout problème lié au vieillissement cellulaire et à la sénescence, nous avons toujours utilisé les cultures cellulaires entre le 13^{è} et le 19^{è} passage, c'est à dire à un moment où leur pouvoir proliferatif est maximum.

Les localisations cellulaires de la deutéroporphyrine et de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée ont été observées par microscopie de fluorescence, en utilisant les propriétés optiques de ces deux molécules. Il faut noter que certains

constituants naturels des cellules sont également fluorescents. Nos conditions d'excitation et les filtres utilisés en émission ont néanmoins été choisis de façon à ce que les structures cellulaires non marquées par les photosensibilisateurs (i.e. fluorescence naturelle) aient une intensité de fluorescence négligeable au regard de celle des porphyrines exogènes. En moyenne, le « fond » (zone noire, en dehors des cellules) de nos prises de vues en fluorescence était à 140±10 coups pour des intensités de fluorescence significatives autour de 400 à 1000 coups. Nous avons donc considéré qu'il était noir. De même, la fluorescence verte du lysoTracker® n'est pas significative sur les prises de vues avec un filtre rouge en émission, et réciproquement, la fluorescence rouge de la phtalocyanine n'est pas significative lorsque le filtre à l'émission est vert. Dans nos expériences de co-marquage (voir chapitre « Matériel et Méthodes »), la fluorescence verte et la fluorescence rouge sont donc suffisamment bien séparées par nos jeux de filtres pour qu'il n'y ait ni interférence ni superposition artéfactuelle.

6.2 Observations microscopiques de l'incorporation dans les cellules

Les incubations des cultures cellulaires avec les molécules tétrapyrroliques ont été réalisées juste avant les observations. Les protocoles sont résumés en figure 6.4.

(1) Pour le premier type d'expériences, les molécules (DP 2.5×10^{-7} M ou $AlPcS_2$, moins fluorescente, 1×10^{-6} M) ont été « préchargées » dans les LDL (1×10^{-7} M). Dans ces conditions, 97% des molécules de deutéroporphyrine sont associées aux LDL, et 85% des molécules de phtalocyanine. Les complexes photosensibilisateur-LDL obtenus seront notés respectivement DP-LDL et $AlPcS_2$-LDL, les notations DP et $AlPcS_2$ seront réservées aux molécules libres en solution. Les cellules ont ensuite été incubées avec ces solutions pendant 15 min à 37°C sous atmosphère humidifiée contenant 5% de CO_2.

(2) Un second type d'expérimentations a également été réalisé, en utilisant le même protocole d'incubation mais avec des photosensibilisateurs en solution dans le tampon (HBSS), sans étape de préchargement dans des LDL.

(3) Le troisième et dernier type d'expérimentations a été utilisé comme contrôle et consistait à suivre le même protocole, mais cette fois sans photosensibilisateur ni LDL dans la solution. Dans tous les cas, les cellules ont été rincées soigneusement trois fois de suite avec du tampon avant l'observation.

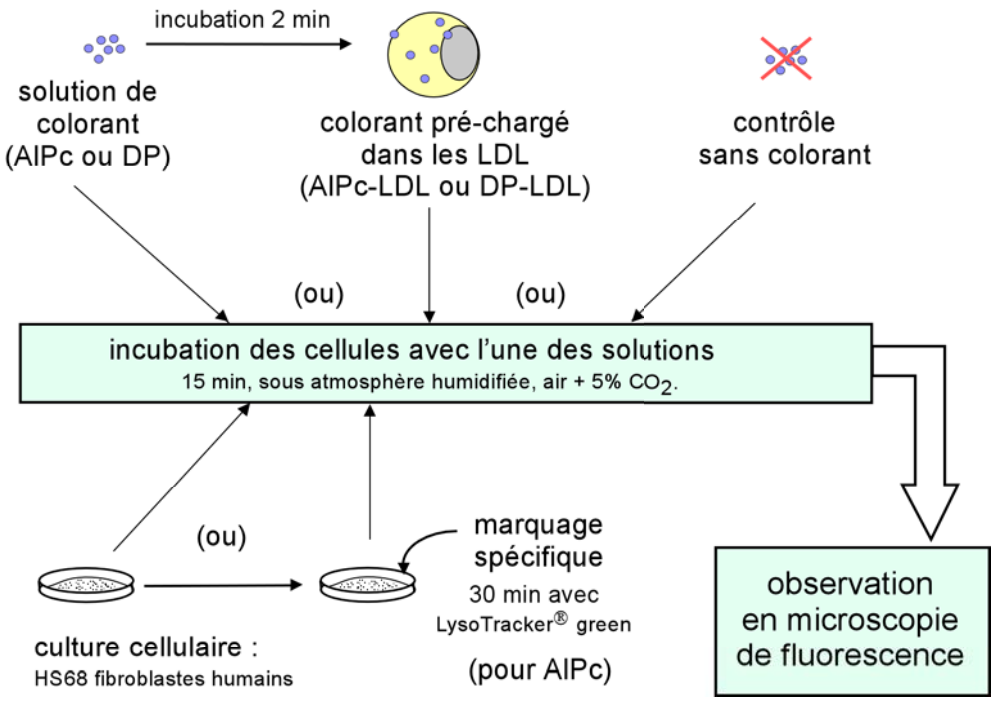


Figure 6.4 : Résumé schématique des protocoles suivis pour la mise en œuvre des expériences cellulaires.

6.2.1 Incorporation cellulaire de la deutéroporphyrine

Après quinze minutes d'incubation avec l'une des solutions contenant la deutéroporphyrine (DP ou DP-LDL), l'observation de la préparation cellulaire montre une fluorescence rouge, correspondant à la présence de porphyrine, relativement diffuse, suggérant une incorporation membranaire et cytosolique de la molécule (figure 6.5). Un certain nombre de structures en réseau semblent marquées légèrement plus intensément que les autres structures. Il pourrait s'agir de mitochondries et/ou du réticulum. Le noyau, par contre, est parfaitement exempt de fluorescence. Les molécules de deutéroporphyrine ne franchissent donc pas la membrane nucléaire.

Aucune modification visible de cette répartition n'est induite par la vectorisation du colorant par les LDL. Cependant, et bien que ce résultat ne soit probablement pas significatif, il faut remarquer la légère tendance à une diminution de l'incorporation cellulaire en présence de LDL. L'intensité relative moyenne (l'intensité du « fond » ayant été retranchée) des cellules incubées avec DP-LDL se situe autour de 160 coups, contre 310 coups pour les fibroblastes incubés avec la DP seule (voir figure 6.6, la légende donne la méthode de détermination de ces intensités).

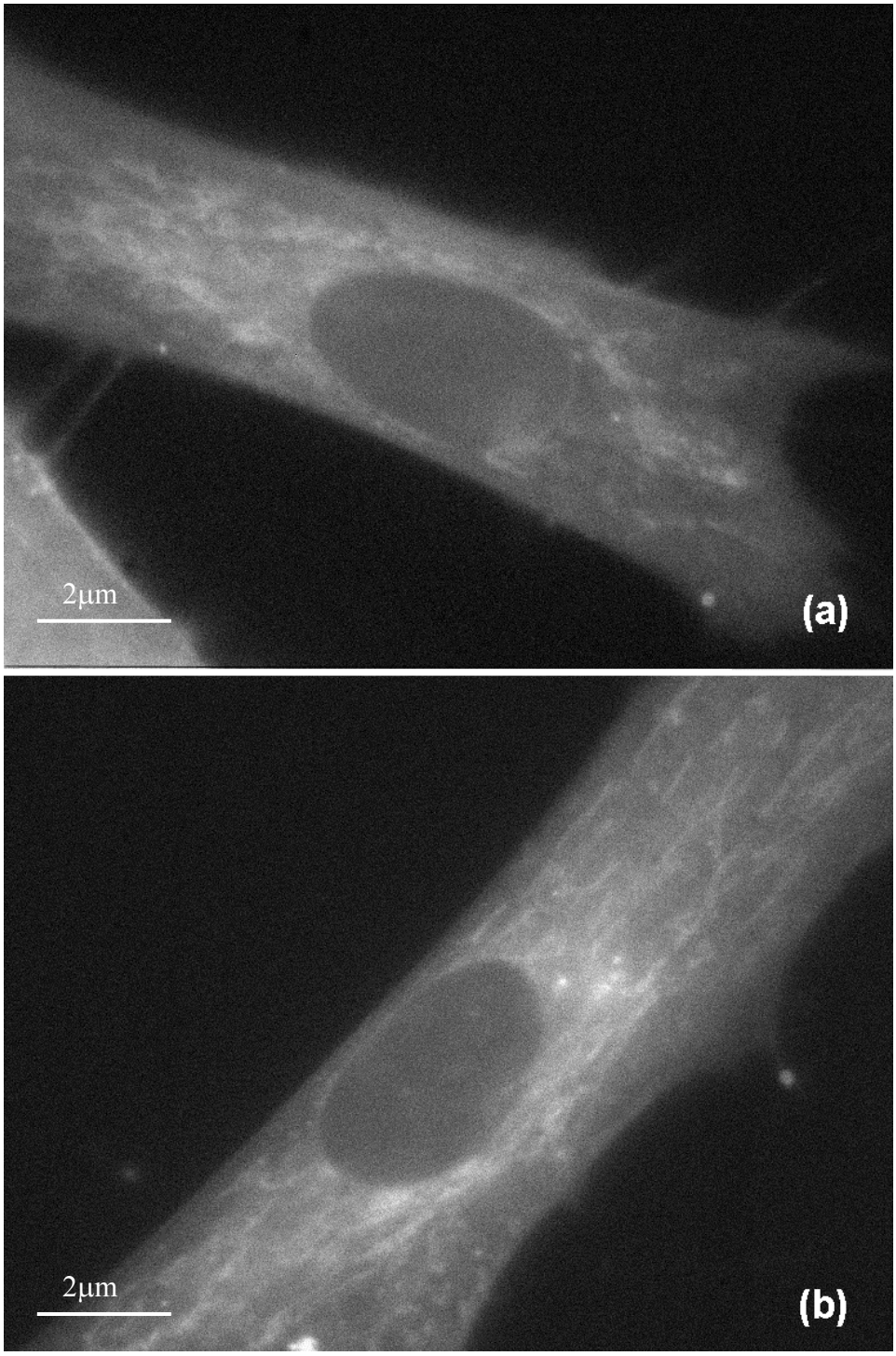


Figure 6.5 : Incorporation de la deutéroporphyrine dans les fibroblastes, observation par microscopie de fluorescence. L'excitation dans l'UV induit la fluorescence rouge de la porphyrine et permet donc d'en déterminer la distribution.

(a) : cellules incubées avec la DP seule, intensité [0-310 cps], voir figure 6.6.

(b) : cellules incubées avec DP-LDL, intensité [0-160 cps], voir figure 6.6.

Concentrations utilisées : [DP] = $2{,}5\times10^{-7}$ M ; [LDL] = 0 ou 10^{-7} M.

Excitation : 330-380 nm ; émission : 645±75 nm.

Analyse des observations

In fine, les LDL ne semblent pas influencer significativement les phénomènes observés ici : ils ne modifient pas la localisation subcellulaire de la deutéroporphyrine. Comme prévu, cette dernière s'est redistribuée très rapidement entre les différentes structures cellulaires et est donc localisée dans toutes les membranes cellulaires. Ces observations sont en accord avec celles d'autres auteurs [77, 78], et ce bien que la localisation subcellulaire soit vraisemblablement influencée par le type cellulaire utilisé ainsi que par le protocole d'incubation mis en œuvre [79].

Quoi qu'il en soit, les interactions impliquées ont des dynamiques extrêmement rapides. Les échanges de molécules de DP entre les LDL et la membrane plasmique doivent donc également être très rapides. Etant donné que le flip-flop transmembranaire est lui aussi caractérisé par sa grande vitesse, il est probable l'association des molécules de porphyrine aux LDL ne soit pas le facteur déterminant. Une grande partie des porphyrines entre vraisemblablement dans la cellule par diffusion passive. Elles sont ensuite redistribuées entre les différentes structures membranaires selon les mêmes mécanismes. Dans le milieu extracellulaire, l'équilibre est donc fortement déplacé dans le sens de l'incorporation cellulaire : la porphyrine est « aspirée » par les membranes cellulaires. De plus, même la portion de molécules qui peut, éventuellement, entrer par endocytose via les LDL va rapidement être captée par les structures lipidiques intracellulaires et sera donc rapidement redistribuée entre les différents composants membranaires de la cellule. Notamment, la fuite des molécules depuis les endosomes et les lysosomes est favorisée par le gradient de pH transmembranaire évoqué dans le chapitre 3. Les LDL n'ont donc que peu d'influence sur les processus de distribution de ce colorant. D'autre part, il semble que les mitochondries soient légèrement plus marquées que les autres structures cellulaires. Cette observation peut se comprendre au regard des résultats présentés dans le chapitre 3. Le pH de la matrice des mitochondries, autour de 8, peut en effet défavoriser leur fuite. Enfin, il faut noter qu'il est possible qu'une partie des porphyrines reste associée aux LDL dans le milieu et ne soit donc pas disponible pour interagir avec les cellules. Ceci pourrait notamment expliquer pourquoi le marquage des cellules incubées en absence de LDL est un peu plus intense que pour les cellules incubées avec DP-LDL.

Ces observations permettent de conclure que, dans tous les cas, ***les phénomènes d'internalisation de la deutéroporphyrine dans les cellules sont gouvernés par des processus de diffusion passive***.

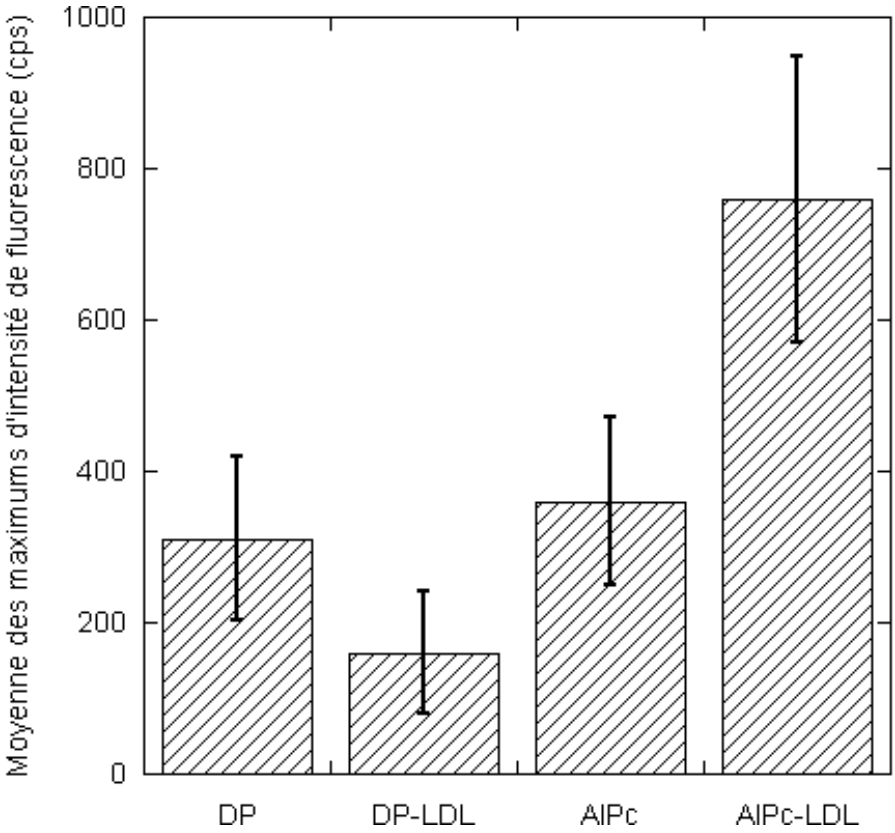


Figure 6.6 : Comparaison du rôle des LDL sur l'incorporation cellulaire de :
(a) la deutéroporphyrine (DP) et
(b) la phtalocyanine d'aluminium disulfonée ($AlPcS_2$).

Les concentrations utilisées sont : [DP] = $2{,}5\times10^{-7}$ M ; [$AlPcS_2$] = 1×10^{-6} M ; [LDL] = 0 ou 10^{-7} M. Excitation : 330-380 nm ; émission : 645±75 nm.

Méthode de mesure :

Dix surfaces de 0,25µm^2 ont été délimitées sur les prises de vues cellulaires et placées en des sites choisis dans chaque cellule (dans les zones marquées par le photosensibilisateur). L'intensité moyenne de ces six surfaces a été mesurée pour déterminer l'intensité de fluorescence attribuée à chaque cellule. La moyenne de fluorescence sur dix cellules différentes a été faite pour chaque type d'expérimentation.

6.2.2 Incorporation cellulaire de la phtalocyanine

A l'inverse du cas de la porphyrine, l'internalisation de la phtalocyanine d'aluminium est fortement influencée par le mécanisme d'entrée des molécules dans les cellules. Comme le montre la figure 6.7a, lorsque les cellules ont été incubées avec le photosensibilisateur sans LDL ($AlPcS_2$), les molécules de phtalocyanine sont principalement incorporées dans des vésicules intracellulaires, ce qui laisse penser à une éventuelle localisation lysosomiale.

Afin de pouvoir précisément identifier la nature de ces vésicules, nous avons réalisé des expériences de co-localisation avec un marqueur spécifique des lysosomes, le LysoTracker® green. La superposition des images prises respectivement avec les filtres rouges et verts en émission montre clairement que la fluorescence de ce marqueur et celle de la phtalocyanine ne sont pas co-localisées. Les vésicules intracellulaires visibles sur cette figure ne sont donc pas des lysosomes. Il s'agit très probablement de granules intracellulaires de lipides neutres (« lipid droplets »). Pour être certain de cette attribution, nous aurions pu les identifier par marquage spécifique au Nile rouge. Malheureusement, ce fluorophore a, comme la phtalocyanine, une émission dans le rouge et n'était donc pas utilisable pour des expériences de co-marquage dans notre cas.

Lorsque les cellules ont été incubées avec des molécules de phtalocyanine pré-associées à des LDL ($AlPcS_2$-LDL, figure 6.7b), les préparations présentent également, sous excitation UV, des vésicules intracellulaires fluorescent dans le rouge. Cependant, comparé au premier type d'expérimentation ($AlPcS_2$ seule), nous avons observé deux différences importantes :

- D'une part, la concentration des molécules incorporées dans les vésicules est significativement plus importante ici, avec LDL, que précédemment en l'absence de LDL. L'intensité de la fluorescence rouge est en effet bien supérieure (760 coups contre 360 après les incubations sans LDL, voir figure 6.6).
- D'autre part, le même protocole de co-marquage avec le LysoTracker® a été réalisé, montrant une localisation lysosomiale des molécules d'$AlPcS_2$ transportées par les LDL.

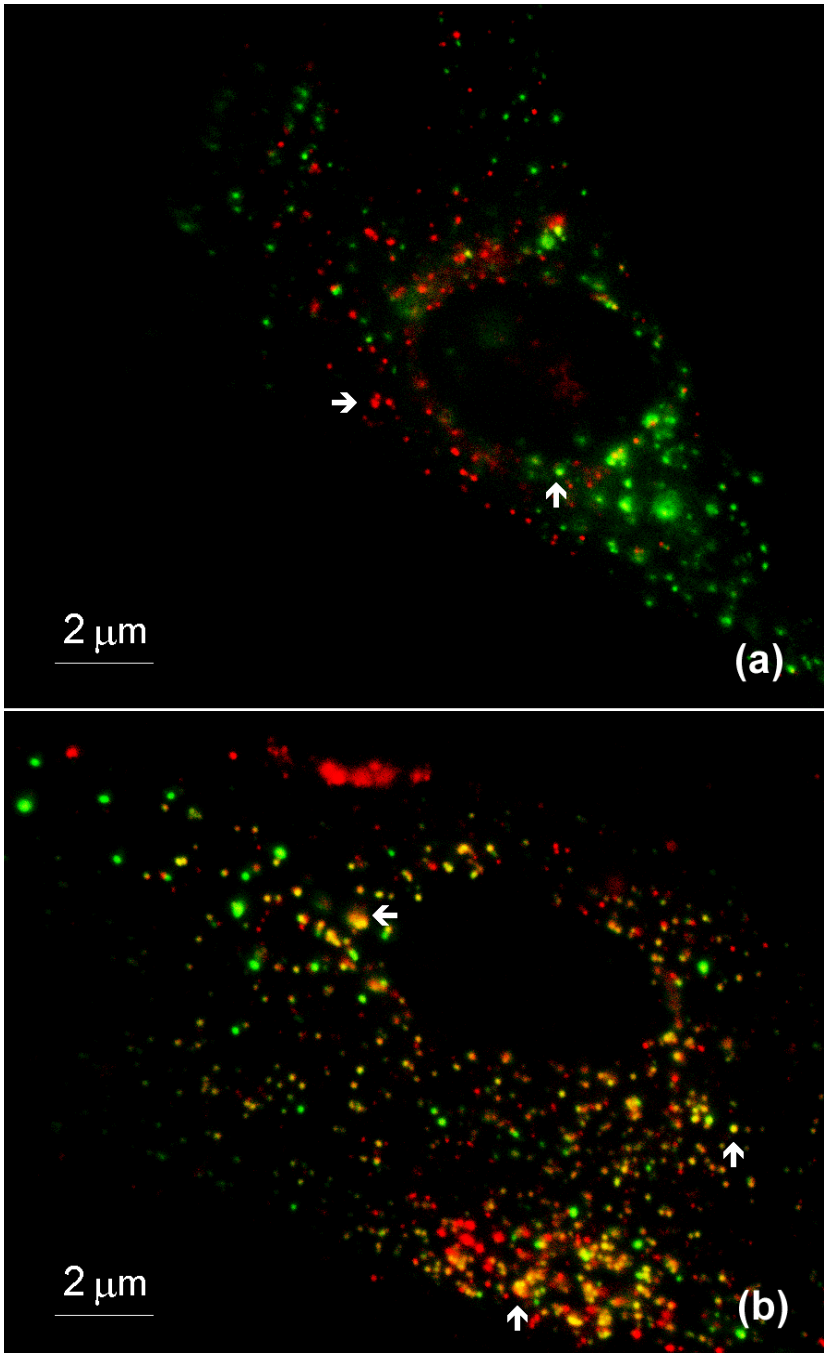


Figure 6.7 : Incorporation de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée dans les fibroblastes, observation par microscopie de fluorescence. Les cellules ont été pré-marquées avec le LysoTracker® green. L'excitation dans l'UV (330-380 nm) induit la fluorescence rouge de la phtalocyanine et la fluorescence verte du lysoTracker, séparées grâce à des filtres placés en émission (645±75 nm et 535±45 nm). La superposition des deux images obtenues permet déterminer la localisation de la phtalocyanine.

(a) : cellules incubées avec la $AlPcS_2$ seule, intensité [0-360 cps].

(b) : cellules incubées avec $AlPcS_2$-LDL, intensité [0-760 cps].

Concentrations utilisées : $[AlPcS_2] = 1\times10^{-6}$ M ; [LDL] = 0 ou 10^{-7} M ; [LysoTracker®] = 2×10^{-7} M.

Sur la figure 6.7b, les structures marquées uniquement par le LysoTracker® apparaissent vertes, celles marquées uniquement par la phtalocyanine apparaissent rouges et celles co-marquées sont dans des tons jaunes, plus ou moins orangés en fonction du rapport $AlPcS_2$/LysoTracker® dans les membranes considérées. Dans ces structures co-marquées, il y a donc co-localisation du marqueur spécifique des lysosomes et du photosensibilisateur. Les lysosomes sont donc verts ou jaunes selon qu'ils contiennent ou non de la phtalocyanine. La majorité des vésicules intracellulaires observées apparaissent orangées. Il y a donc, dans ce cas, un important recouvrement entre la fluorescence rouge de la phtalocyanine et celle, verte, du LysoTracker®. A la différence de précédemment, la majorité des molécules d'$AlPcS_2$ est donc incorporée dans des lysosomes. Le transport de ce photosensibilisateur par des LDL favorise donc son entrée dans les cellules et sa localisation lysosomiale.

Analyse des observations

Comme nous l'avons spécifié, le flip-flop de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée est pratiquement inexistant sur l'échelle de temps correspondant à la durée de nos expériences (15 min). Par conséquent, les molécules ne peuvent pas traverser les membranes. Elles ne peuvent donc pas pénétrer directement dans les cellules par diffusion passive et leur internalisation cellulaire se fait donc par endocytose, non spécifique (1) ou spécifique (2). Selon la présence ou l'absence de récepteurs appropriés sur la surface des cellules, trois types d'endocytose doivent être distingués :

(1) On parle d'*endocytose fluide* lorsque la capture d'une molécule reflète strictement l'internalisation de fluide extracellulaire et est donc strictement proportionnelle à la concentration de ladite molécule dans le milieu extracellulaire. L'endocytose fluide est très peu efficace (typiquement, une cellule internalise chaque jour l'équivalent de 40% de son volume) et n'est généralement pas modulable puisque la formation des puits endocytaires est constitutive. L'*endocytose adsorptive* implique une composante supplémentaire, résultant de l'interaction non spécifique de la molécule à une grande diversité de sites de liaison sur la membrane plasmique. Son efficacité reflète donc la rapidité d'internalisation membranaire du type de cellule considéré (environ 1% par minute). Cette efficacité peut être aisément modulée par la cellule, par exemple en augmentant la force des interactions non spécifiques en améliorant la complémentarité de charge. L'endocytose adsorptive s'ajoute nécessairement à l'endocytose fluide et dans le cas de molécules hydrophobes, elle sera même très prépondérante.

(2) Enfin, l'*endocytose spécifique* implique la liaison spécifique d'un ligand à un récepteur de surface. Les complexes ligands-récepteurs sont concentrés environ 10 fois dans des puits endocytaires recouverts de clathrine,(« coated pits »), et internalisés très rapidement lors de la formation de « coated vesicles ». L'endocytose par récepteurs est donc particulièrement efficace. De plus elle peut être régulée très finement en la modulant l'abondance du récepteur, la fraction de celui-ci exposée à la surface cellulaire, et/ou son affinité pour le ligand, voire par compétition.

Dans tous les cas, après leur entrée dans la cellule, les molécules se trouvent dans des structures vésiculaires. Après acidification progressive des compartiments endocytaires, une grande partie des molécules captées par endocytose non spécifique aboutissent dans les lysosomes. Dans le cas de l'endocytose spécifique, une part plus ou moins importante des molécules incorporées peut être recyclée et relarguée dans le milieu extracellulaire. Cependant, comme nous l'avons indiqué en introduction, les LDL et leurs composants aboutissent intégralement dans les lysosomes où ils sont dégradées. D'autre part, comme nous l'annoncions au début de ce chapitre, nous nous attendons dans le cas de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée à ce que la redistribution de la molécule dans la cellule par diffusion soit inexistante et donc à ce que sa localisation subcellulaire soit le strict résultat de ce trafic endocytaire.

Après une incubation des cellules avec l'$AlPcS_2$ seule, un mécanisme d'endocytose non médiée conduit les molécules dans des granules intracytoplasmiques, desquelles elles ne peuvent pas sortir, puisqu'elles ne peuvent traverser les membranes. Compte tenu des processus endocytotiques connus, décrits précédemment, la part de molécules de phtalocyanine ayant aboutit dans les lysosomes est beaucoup plus faible que ce à quoi nous nous attendions. La base moléculaire de la localisation des molécules dans les granules intracellulaires de lipides neutres n'est pas connue. Cependant, des expériences menées sur une autre lignée de fibroblastes ont mis en évidence que certaines molécules très hydrophobes, comme par exemple le cholestérol non estérifié, suivrent la même voie [145] et aboutissent dans les granules de lipides neutres. Le mécanisme suggéré fait intervenir la plus connue des protéines localisée dans ces granules, la ADRP (Adipose Differenciation-Related Protein, par ailleurs impliquée dans la différentiation cellulaire [146 , 147]). Cette protéine a été identifiée dans différentes lignées de cellules peu différenciées comme des pré-adipocytes et des fibroblastes. Elle est capable de fixer des molécules comme l'acide stéarique [148] et le cholestérol non estérifié et les tricgycérides. Il est donc envisageable que cette protéine puisse également fixer des molécules comme la phtalocyanine d'aluminium disulfonée et être impliquée dans le fort taux de ciblage de cette molécules vers les granules de lipides neutres.

Lorsque l'incubation a été réalisée avec la $AlPcS_2$-LDL, la majorité des molécules sont incorporées par endocytose spécifique via les LDL, ce qui les conduit dans les lysosomes où elles restent bloquées, toujours pour les mêmes raisons. De plus, comme le montre la différence d'intensité de fluorescence rouge entre les deux types d'expérience (figure 6.6), les LDL sont un facteur favorable pour la prise d'$AlPcS_2$, augmentant la quantité incorporée par des cellules. L'entrée par endocytose spécifique s'ajoute au phénomène d'endocytose non médiée. Comme nous le supposions dans le chapitre précédent, ***la fixation de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée n'affecte donc pas la reconnaissance des LDL par leurs récepteurs spécifiques***. *In fine*, pour la phtalocyanine d'aluminium disulfonée, il n'y a aucune redistribution entre les structures intracellulaires, et les phénomènes sont gouvernés par la voie d'internalisation, en accord avec d'autres observations [143, 149].

L'ensemble de ces observations montre clairement que les ***phénomènes d'internalisation de la phtalocyanine dans les cellules sont gouvernés par les mécanismes d'endocytose.***

6.3 Conclusion

Quel que soit le mode expérimental utilisé, l'incorporation de la deutéroporphyrine dans les cellules est gouvernée par la diffusion passive. De fait, dans nos expériences de microscopie, toutes les membranes sub-cellulaires sont marquées et aucune différence significative n'a été observée pour des cellules incubées avec une solution de DP ou de DP-LDL. Au contraire, pour la phtalocyanine d'aluminium disulfonée, la voie d'incorporation influence fortement la prise cellulaire et la localisation sub-cellulaire du colorant.

En conclusion, nos résultats donnent une importance nouvelle à l'étude du comportement des drogues lipophiles et amphiphiles vis-à-vis des membranes. Bien que les LDL jouent un rôle clé pour bon nombre d'entre elles dans le ciblage des tissus pathologiques en prolifération (tels que les tumeurs) [150], la localisation sub-cellulaire des molécules porphyriques est sous la gouverne de la dynamique des interactions « molécule-membrane ». Ces résultats montrent l'importance majeure des études physico-chimiques pour l'optimisation de la vectorisation de drogues. Dans le cadre de la PDT, il a été noté qu'une distribution cytoplasmique diffuse est un facteur favorisant l'efficacité photodynamique [91]. Une meilleure connaissance de la dynamique des interactions LDL-médicament et membrane-médicament devrait permettre une amélioration significative du ciblage médicamenteux.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La deutéroporphyrine et la phtalocyanine d'aluminium disulfonée possèdent des propriétés photophysiques qui nous ont entre autre permis de les étudier par fluorescence et qui sont à la base de leur activité photosensibilisatrice dans le cadre de la PDT. A l'heure actuelle, un grand nombre de photosensibilisateurs – dont la plupart sont des tetrapyrroles ou des précurseurs des molécules tetrapyrroliques comme l'acide 5-aminolévulinique – sont utilisés ou étudiés pour cette application thérapeutique. Cependant, comme cela a déjà été spécifié, de petites variations structurales peuvent conduire à des modes de transport dans l'organisme, des localisations cellulaires et des niveaux d'activité très différents. Les propriétés photophysiques de ces molécules sont pourtant bien comprises, *in vitro*, et appréhendées à partir de paramètres tels que leurs caractéristiques d'absorption dans le rouge et leur rendement de production d'oxygène sigulet. Cependant, la transposition de ces propriétés à des systèmes biologiques réels pose un certain nombre de questions, compte tenu notamment de la propension de ces molécules à former des dimères et des agrégats. Le Photofrin®, par exemple, est un mélange complexe contenant des dimères et des oligomères porphyriques. Bien que non fluorescents, certains dimères de porphyrine ont un bon rendement de production d'axygène singulet [125] et sont donc potentiellement actifs thérapeutiquement. Dans le cas de la plupart des photosensibilisateurs, le rôle de ces structures dans les mécanismes de photosensibilisation n'est pas connu. De plus, les mécanismes de photoinactivation cellulaire, qui déterminent l'efficacité thérapeutique, dépendent également fortement du photosensibilisateur utilisé. Plus particulièrement, sa localisation intracellulaire semble déterminer la voie dans laquelle la cellule s'engage (nécrose ou apoptose). Actuellement, il n'existe aucun lien clair reliant la diversité des photosensibilisateurs à la variabilité des activités thérapeutiques qu'ils induisent. Leur efficacité a été cependant corrélée à leur coefficient de partition huile/eau. Ces travaux suggèrent l'existence d'un optimum d'hydrophobie, pour lequel l'efficacité est maximale [151]. Les limites de ces corrélations, discutées par les auteurs eux-mêmes, tiennent certainement au fait qu'ils relèvent en grande partie de constatations uniquement empiriques.

De façon similaire, il n'existe pas de paramètres prédictifs de la pharmacocinétique tissulaire et cellulaire des différents photosensibilisateurs, ni de l'importance relative de leur mode de transport dans l'organisme sur ces deux caractéristiques. Comme nous le suggérions dès l'introduction de ce travail, la structure, et notamment le rapport hydrophobie/hydrophilie, de la molécule joue sans aucun doute un rôle prépondérant dans ces phénomènes. La compréhension de la

dynamique de répartition des photosensibilisateurs, tant au niveau systémique que cellulaire, revêt une importance toute particulière pour la PDT, à cause du délai entre l'administration du médicament et l'irradiation. La détermination précise du délai optimum permet notamment de cibler soit les cellules pathologiques, soit la vascularisation. Il s'agit donc d'un facteur d'efficacité important.

Au cours de cette thèse ont été abordées les interactions de deux molécules photosensibilisatrices, amphiphiles et asymétriques avec des modèles de membranes, des lipoprotéines et des cellules. Ces deux molécules, la deutéroporphyrine et la phtalocyanine d'aluminium disulfonée, sont constituées d'un noyau tetrapyrrolique sur lequel sont greffés différents groupements polaires. Les études menées l'ont été dans le contexte général de l'appréhension conjointe du mode de transport systémique et de l'internalisation cellulaire de telles molécules. La deutéroporphyrine peut être considérée comme un archétype des porphyrines di-carboxyliques. En ce sens, la compréhension des mécanismes gouvernant son comportement peut vraisemblablement être étendue, avec un ajustement approprié des paramètres, à toute cette famille de molécules et notamment aux composants de photofrin®. La phtalocyanine d'aluminium disulfonée présente un macrocycle de taille un peu plus importante. Ses charges, également distribuée de façon asymétrique, sont plus encombrantes et non neutralisables, limitant l'enfouissement de la molécule dans les bicouches lipidiques. De plus, l'aluminium central joue également dans ce sens. Les possibilités de transfert transmembranaire de cette phtalocyanine sont donc très réduites par rapport à celles de la deutéroporphyrine. L'étude en parallèle de ces deux composés nous a conduit à développer et à valider des modèles théoriques, mathématiques et mécanistiques, permettant de décrire les interactions étudiées.

En PDT , ***les LDL jouent incontestablement un rôle de transporteur-cibleur*** des photosensibilisateurs vers les tissus hyperprolifératifs (tumeurs ou néovascularisation associée à la forme humide de la DMLA, par exemple). Ceci est bien illustré par les deux « photosensibilisateurs-moldéles » que nous avons choisis, la deutéroporphyrine et la phtalocyanine d'aluminium disulfonée. Non seulement les LDL ont une forte affinité pour ces molécules mais ils peuvent en transporter des quantités relativement importantes. De plus, cette association ne gêne pas leur reconnaissance par leurs récepteurs cellulaires spécifiques, les récepteurs « B/E » ([71, 74] et ce travail). Plus largement, dans le mesure où le modèle d'interaction mis en œuvre dans ce travail est, comme nous l'avons dit, sans doute valable pour d'autres molécules amphiphiles, les LDL peuvent probablement jouer ce rôle de ciblage tumoral pour un grand nombre de médicaments anti-cancéreux. Néanmoins, le type d'interaction mis en jeu entre ces molécules et les LDL est remarquable par sa

rapidité, et les changements micro-environnementaux pourraient conduire à de rapides modifications de distribution des photosensibilisateurs. Par exemple, la concentration plasmatique en LDL étant de 7×10^{-6} M, le temps de demi-association est d'environ 2×10^{-5} s pour la deutéroporphyrine, les temps caractéristiques de la dissociation étant compris entre 0,05 et 0,12 s. Les échanges entre les différents transporteurs plasmatiques potentiels (LDL, HDL, HSA…) ou avec le milieu plasmatique sont donc extrêmement rapides et importants. La compréhension, et éventuellement le contrôle, de la dynamique d'interaction de ces molécules avec les LDL peut permettre une amélioration certaine du ciblage des médicaments amphiphiles, voire même la conception de nouvelles drogues et de nouveaux vecteurs comme par exemple des molécules LDL-like [69].

L'efficacité des lipoprotéines comme vecteurs endogènes pourrait a priori être sensiblement augmentée par le peuplement de leur cœur hydrophobe par les molécules transportées. En effet, ce type de localisation stabiliserait sans doute l'association de la molécule aux LDL et assurerait ainsi son entrée cellulaire par endocytose médiée. Le peuplement du cœur des LDL favoriserait donc le ciblage de la molécule via les LDL. De plus, la capacité de charge des LDL comme transporteurs serait augmentée. Pour les porphyrines di-carboxyliques, compte tenu des valeurs des pK des groupes carboxyliques, ce peuplement du cœur est a priori possible aux pH physiologiques. Cependant, l'exemple déjà cité de la Zn(II)-phtalocyanine qui, entrant dans le cœur des LDL, en déstabilise la structure et bloque leur reconnaissance spécifique par les récepteurs « B/E » souligne que cette voie doit être explorée avec prudence.

L'association plasmatique des porphyrines, endogènes ou exogènes, aux LDL apporte donc un éclairage important sur leur rétention préférentielle dans les tissus en croissance. Cependant, nous avons montré que d'autres facteurs jouent également un rôle important sur le comportement des molécules carboxyliques asymétriques. ***Les études réalisées sur leurs interactions avec les bicouches lipidiques mettent en effet en évidence l'importance du pH dans ces processus.*** La relative acidification du pH interstitiel dans les tumeurs favorise donc le ciblage des molécules porphyriques amphiphiles dans ces tissus [97, 152], en favorisant leur diffusion passive transmembranaire de l'extérieur vers l'intérieur des cellules. Typiquement, le liquide interstitiel tumoral se trouve à un pH de 6,9. Or, d'après nos résultats, la sortie de la porphyrine à ce pH est deux fois plus lente qu'au pH du milieu intracellulaire (pH typiquement de 7,4). De plus, le flip-flop est environ cinq fois plus rapides à ce pH qu'à pH 7,4. La pénétration des molécules porphyriques amphiphiles dans les cellules tumorales devrait donc être accélérée par rapport à celle dans les cellules normales dont le micro-environnement est à un pH proche de 7,5. De façon similaire, le pH de chacun des compartiments va influencer le comportement de la porphyrine

vis-à-vis de la membrane qui le délimite. Ainsi, par exemple, la deutéroporphyrine semble marquer légèrement plus les mitochondries dont le pH matriciel est autour de 8. Les deux phénomènes sont donc sous le contrôle du même mécanisme : la deutéroporphyrine entre par simple diffusion dans les cellules et se répartie ensuite dans l'ensemble des membranes. A l'inverse, la phtalocyanine est incapable, dans tous les cas, de franchir les membranes biologiques. Son comportement vis-à-vis des cellules est donc déterminé par son éventuelle association aux différents transporteurs plasmatiques potentiels, notamment aux LDL.

In fine*, c'est donc la dynamique des interactions des porphyrines avec les membranes qui détermine non seulement leur comportement vis-à-vis des cellules, mais aussi l'influence relative de leur mode de transport jusqu'à ces cellules.* En effet, celui-ci n'intervient sur la localisation subcellulaire que dans la mesure où la relocalisation est suffisamment lente. Nos conclusions sur le rôle de transporteurs-cibleurs des LDL doivent être prises e, considération, dans le contexte intracellulaire, au regard de cette dynamique de la molécule vis-à-vis des membranes. Si l'affinité de ces molécules pour les bicouches dépend de l'hydrophobie relative, la dynamique de cette interaction est essentiellement déterminée par les groupes polaires greffés sur le macrocycle. D'une part, leur répartition asymétrique implique un positionnement membranaire typique (macrocycle dans les lipides et chaînes polaires vers l'interface polaire) et la nature de ces groupes définit la profondeur de l'enfouissement de la molécule dans les lipides. D'autre part, comme nous l'avons montré, dans le cas des chaînes carboxyliques les pK gouvernent la mécanique des processus en facilitant ou en interdisant les deux étapes que sont (i) l'entrée et la sortie de la bicouche et (ii) le flip-flop.

L'efficacité des molécules utilisées lors des traitements par PDT est donc fortement influencée par deux facteurs :

- la rétention du médicament par le tissu ciblé, qui peut dépendre de son association à des vecteurs spécifiques,
- sa localisation dans les cellules cibles qui, comme nous l'avons vu, dépend des possibilités de relocalisation de la molécule, i.e. de son comportement vis-à-vis des membranes. Elle peut dans certains cas être influencée fortement par l'association de la molécule à un transporteur.

Dans le cadre de l'optimisation de la PDT, ces deux facteurs d'efficacité sont donc fortement interconnectés, rendant nécessaire une approche globale de ces phénomènes. Les études dynamiques que nous avons présentées dans ce mémoire constituent donc une étape utile à la caractérisation pharmacologique de telles molécules, permettant de dégager des paramètres prédictifs de leur comportement

cellulaire et donc, en retour, de concevoir et de synthétiser des molécules de plus en plus performantes (voir figure *c*.1).

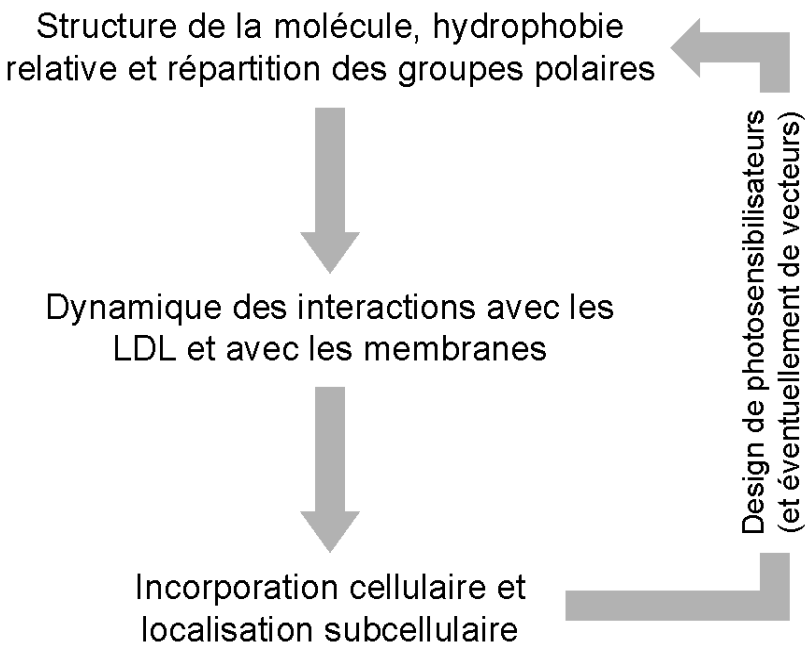


Figure *c*.1 : Les études dynamiques, *in vitro*, des interactions des molécules avec les LDL et les membranes modèles constituent une étape informative pour leur caractérisation pharmacologique, permettant de dégager des paramètres prédictifs de leurs comportements cellulaires.

L'ensemble de ces résultats a également un intérêt particulier dans le cadre de l'utilisation de liposomes comme vecteurs des médicaments anticancéreux hydrophobes. En effet, la très faible solubilité aqueuse de ces drogues, comme par exemple les photosensibilisateurs de seconde génération, implique qu'elles soient formulées avant être injectées aux patients. Dans la plupart des cas, elles sont conditionnées dans des liposomes. Si ces molécules traversent difficilement les bicouches lipidiques, leur ciblage vers les tumeurs ne peut se faire que via les LDL [153, 154]. Or, le transfert du médicament depuis son transporteur exogène vers les lipoprotéines n'est alors possible par diffusion que si elles sont associées à la couche externe de la bicouche du liposome. Dans ce cas, l'encapsulation des molécules dans les liposomes, ou l'utilisation de liposomes multi-lamellaires, sont certainement assez défavorables à leur transfert vers les LDL et donc à leur ciblage tumoral. Néanmoins, ce transfert peut également avoir lieu via d'autres mécanismes. La possibilité de fusion entre les liposomes et les lipoprotéines a, entre autre, été évoquée [155] et nécessite des études complémentaires.

Sur le plan biologique, la question du passage transmembranaire des porphyrines di-carboxyliques se pose également lors des dernières étapes de synthèse de l'hème dans les mitochondries (figure *c*.2). Cette synthèse a lieu dans la matrice mitochondriale, par incorporation d'un ion ferreux dans le noyau porphyrique de la protoporphyrine IX.

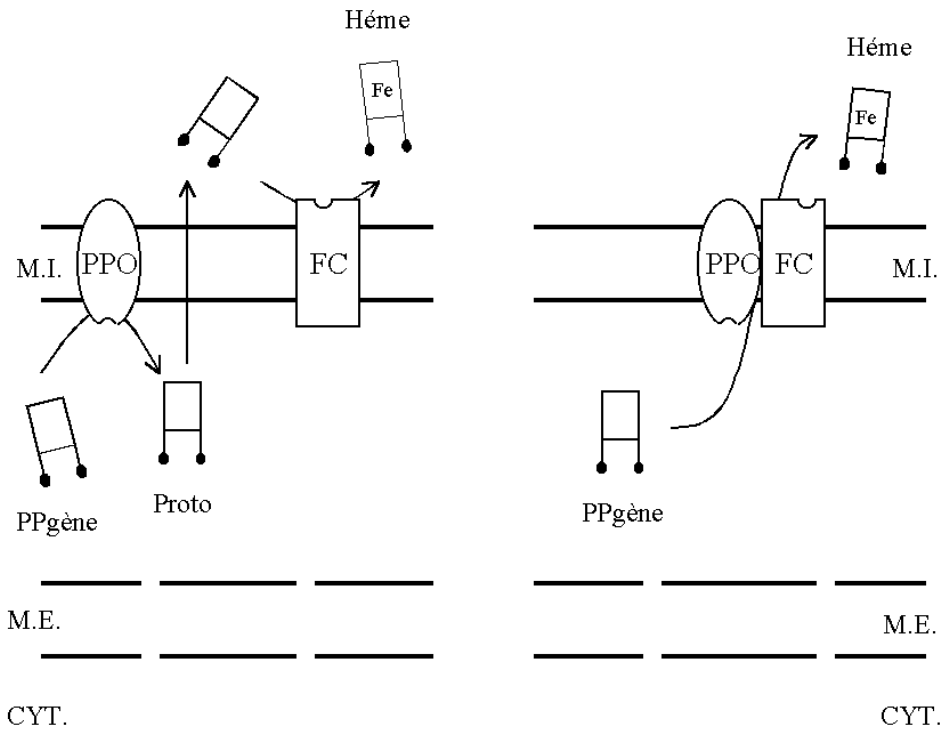


Figure *c*.2 : Représentation schématique des modèles possibles pour les dernières étapes de la biosynthèse de l'héme dans les mitochondries. Le passage transmembranaire de la protoporphyrine IX peut se faire soit par diffusion passive (à gauche) soit peut faire intervenir des phénomènes coopératifs entre les différents enzymes impliqués.

Abréviations utilisées : FC : ferrochelatase. PPO : protoporphyrinogène oxydase, Ppgène : porphyrinogène, Proto : protoporphyrine IX, CYT. : cytosol, M.E. : membrane externe, M.I. : membrane interne.

L'enzyme catalysant cette réaction est ancrée dans la membrane interne des mitochondries et son site actif se trouve du côté de la matrice [156]. La protoporphyrine IX est synthétisée dans l'espace intermembranaire par oxydation du protoporphyrinogène, lui même synthétisé dans le cytosol. La protoporphyrinogène oxydase est également ancré à la membrane interne mitochondriale, mais son site actif se situe dans l'espace intermembranaire. La protoporphyrine doit donc, au cours de cette biosynthèse, traverser la membrane interne des mitochondries. Le mécanisme de ce processus est très mal connu. Différents modèles ont été proposés,

faisant intervenir soit une collaboration des différentes enzymes concernées pour former un complexe possédant un canal spécifique du substrat (la protoporpyrine IX), soit une passage par diffusion simple au travers de la membrane [157]. Nos résultats indiquent que cette dernière hypothèse est très vraisemblable, la diffusion passive à travers les bicouches lipidiques étant rapides. De plus, l'activité mitochondriale maintient un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne. Le pH de la matrice mitochondriale est de 8 unités pH, l'espace intermembranaire étant typiquement à un pH de 7,4. Le gradient ainsi établi favoriserait le passage de la porphyrine vers la matrice. Cette hypothèse est à mettre en relation avec nos observations microscopiques, la deutéroporphyrine étant retenue sensiblement plus fortement dans les mitochondries.

Enfin, la forte affinité de ces composés tétrapyrroliques pour les systèmes membranaires, associée à leur propriétés photochimiques, leur a récemment ouvert un nouveau champ d'application : la « Photo-Chemical Internalisation » (PCI). Cette technique est basée sur la rupture photo-induite des vésicules d'endocytose, libérant dans le cytosol les molécules endocytées [158-162]. De nombreux agents thérapeutiques, notamment ceux développés dans le cadre des thérapies géniques, sont en effet des macromolécules (oligonucléotides, PNA, gènes, protéines, peptides…) qui ne peuvent pénétrer dans les cellules que par endocytose. Or, l'activité de beaucoup de ces agents, notamment dans le cas des gènes et des oligonucléotides, nécessite qu'ils parviennent jusqu'à leur cible intracellulaire, en l'occurrence le noyau ou le cytosol (ARNm). Cependant, après endocytose, ces molécules aboutissent très souvent dans les lysosomes, où elles sont dégradées. Leur libération par PCI dans le cytosol rend donc non seulement leur cible intracellulaire plus accessible mais limite aussi de façon très importante leur dégradation. Elle augmente très significativement leur activité [162-167]. Les agents photosensibilisants utilisés pour la PCI doivent répondre à certaines exigences. Il est notamment impératif qu'ils se localisent spécifiquement dans les membranes des vésicules endocytotiques ciblées. En effet, les espèces chimiques très réactives produites par l'irradiation lumineuse de ces composés réagissent avec leur environnement immédiat, en l'occurrence la membrane de la vésicule. Les altérations membranaires subséquentes conduisent à la libération des molécules actives. Si le photosensibilisateur a d'autres localisations cellulaires que les vésicules d'endocytose, les endosomes et les lysosomes, les lésions se répartiront sur l'ensemble des organites marquées. La précision du ciblage des molécules photosensibilisatrices détermine donc d'une part l'efficacité de la libération et, d'autre part, l'absence de cytotoxicité. Les deux photosensibilisateurs aujourd'hui principalement utilisés en PCI sont la tétraphénylporphyrine disulfonée et la phtalocyanine d'aluminium disulfonée [168]. Or, comme nos travaux l'ont montré, la localisation subcellulaire de la phtalocyanine est modifiée de façon importante par

son mode de transport (dans notre cas, les LDL). De ce point de vue, chaque type cellulaire peut d'ailleurs potentiellement se comporter différemment, selon ses caractéristiques spécifiques. Ainsi, la protéine ADRP n'a, par exemple, jamais été mise en évidence dans des adipocytes matures alors qu'elle l'a été dans adipocytes juste différenciés. Et, en effet, le cycle cellulaire semble également influencer l'effet de la PCI [169].

Outre ses nombreuses possibilités d'utilisation *in vitro* (transfection), la PCI pourrait être un facteur majeur de l'amélioration des vaccinations par ADN. Cette technique est basée sur la transformation d'un certain nombre de cellules d'un organisme, par exemple des cellules cutanées, par un ADN codant pour un antigène donné. Les cellules transformées expriment constitutivement cet antigène [170]. L'objectif de cette vaccination, et donc le principal problème de la méthode, est de maintenir un niveau suffisant d'anticorps (réponse immunitaire humorale) ainsi qu'une mémoire lymphocytaire satisfaisante (réponse immunitaire cellulaire). Il faut donc que les taux de transformation et de survie cellulaire soient les meilleurs possibles. Dans l'optique d'une vaccination par voie locale cutanée, l'utilisation d'un photosensibilisateur et d'une irradiation locale de la zone traitée pourraient répondre à cet objectif. La taux de survie cellulaire dépendra, lui, de l'importance des lésions subies, c'est à dire de la précision du ciblage subcellulaire du photosensibilisateur.

La relative simplicité des modèles que nous avons choisi d'étudier *in vitro* nous a permis de décrire de façon détaillée les processus mis en œuvre dans ces systèmes, d'en extraire clairement les paramètres significatifs et de corréler ces résultats « simples » à ceux que nous avons obtenus dans des systèmes biologiques complexes, les cellules. Néanmoins, il est nécessaire de considérer les limites de notre choix de modèles. Les liposomes, utilisés comme modèle de membrane dans nos expériences, sont des vésicules unilamellaires de C18 :1, ce qui leur confère une épaisseur de bicouche correspondant à l'épaisseur moyenne des membranes biologiques. Néanmoins, comme nous l'avons déjà spécifié, ce modèle ne rend compte que de la partie lipidique des membranes. La présence de nombreux autres composants, notamment les protéines membranaires, a très certainement une forte influence sur les interactions des porphyrines avec les membranes. La nature de ces protéines varie selon les membranes biologiques. Ensuite, la composition lipidique de nos vésicules est artificielle. *In vivo*, cette composition varie d'une membrane à l'autre, ce qui va sans doute également influencer le comportement des porphyrines. Le taux membranaire de cholestérol, notamment, détermine la rigidité de la bicouche et ralentit la dynamique des interactions. Cependant, il est important de noter que l'effet du pH observé dans des vésicules de DMPC-cholestérol est similaire à celui observé dans des vésicules de DMPC pur [97]. La composition phospholipidique des membranes détermine leur épaisseur et influence également la dynamique

d'interaction avec les porphyrines. Là encore, l'influence du pH est conservée [96]. Il est donc vraisemblable que l'effet de pH observé dans nos expériences *in vitro* soit effectif *in vivo*. Enfin, la présence de groupes carboxyliques dans la structure d'autres porphyrines (naturelles comme la protoporphyrine ou exogènes, utilisées en PDT, comme Photofrin®) permet de supposer que le pH est un facteur important dans les interactions de cette famille de molécules avec les bicouches.

Enfin, il nous faut revenir sur l'aspect très général que revêt l'appréhension conjointe du transport plasmatique et des possibilités de (re)localisation cellulaire des molécules amphiphiles. D'un point de vu biologique, nous avons évoqué en introduction l'importance de l'asymétrie des membranes biologiques. L'ensemble du métabolisme des lipides, y compris leur distribution cellulaire, présente certainement beaucoup de similarité avec les phénomènes que nous avons étudiés. Les approches tans méthodologiques que théoriques développé ici pourraient donc être étendues, en complément d'autres méthodes biophysiques, à l'étude du trafic intracellulaire.

Annexe 1

MODELES CINETIQUES

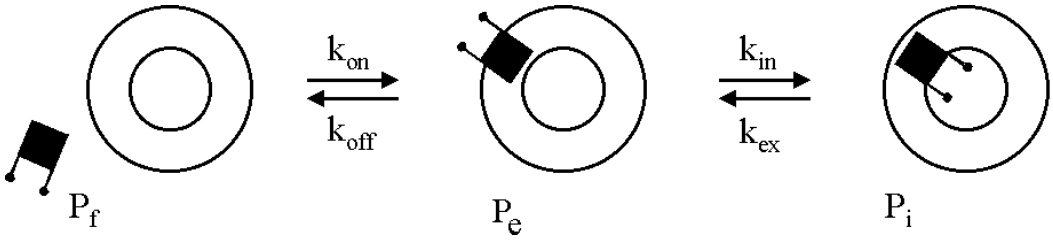
L'interaction des porphyrines avec des systèmes lipidiques s'accompagne de changements caractéristiques de leurs spectres d'émission et d'excitation de fluorescence (voir chapitre « Propriétés de bases des systèmes étudiés », voir également les résultats). La forme des spectres enregistrés lorsque la deutéroporphyrine est en présence de vésicules lipidiques ou de lipoprotéines est très proche de celle obtenue dans un solvant organique tel que le chloroforme ou le tetrahydrofurane. Il en va de même pour la phtalocyanine d'aluminium. Or les propriétés de fluorescence de ces molécules leur sont conférées par leur macrocycle. Une telle similitude indique entre les spectres en présence de LDL et en présence de vésicules indique, dans les deux cas, les molécules sont dans un environnement hydrophobe, c'est à dire soit incorporée dans la bicouche des vésicules, soit associée à la lipoprotéine.

Ces changements de fluorescence nous ont permis de suivre les cinétiques d'association et/ou de dissociation de ces deux molécules avec les LDL. Les modèles théoriques présentés dans ce chapitre ont permis l'analyse et l'interprétation de nos cinétiques expérimentales.

1. Incorporation de la porphyrine dans les liposomes

Le modèle théorique décrivant cette interaction a été préalablement détaillé ([118]). Il ne sera donc repris ici que dans les grandes lignes.

L'association de la porphyrine aux vésicules lipidiques s'effectue en deux étapes. La première, rapide, correspond à l'entrée de la porphyrine dans le feuillet externe de la bicouche, la seconde correspond au flip-flop. Typiquement, les cinétiques expérimentales correspondantes sont bi-exponentielles.



P_f, P_e et P_i sont respectivement les concentrations en porphyrine libre, incorporée dans le feuillet externe et interne de la bicouche lipidique, k_{on} et k_{off} sont les constantes de vitesse d'entrée et de sortie de la bicouche, k_{in} et k_{ex} les constantes cinétiques du flip-flop.

Notre objectif étant de déterminer l'influence du pH sur l'entrée et la sortie de la bicouche, c'est à dire sur la capacité de la DP à franchir les interfaces amphiphiles, nous nous sommes intéressés exclusivement à la première étape décrite par ce mécanisme. Dans nos conditions expérimentales, les vésicules sont en large excès. La quasi-totalité des molécules de deutéroporphyrine est donc incorporée immédiatement. L'équilibre correspondant à la première étape du schéma ci-dessus est donc fortement déplacé vers P_e. Lorsque ces molécules se répartissent de part et d'autre de la bicouche lipidique par flip-flop, le peu de porphyrine libre restant dans la solution va entrer dans le feuillet externe de la bicouche. Dans ce cas, l'amplitude de la seconde phase est donc extrêmement faible. De plus - et surtout - avec les vésicules utilisées composées de dioleoylphosphatidylcholine, les deux phases sont bien séparées dans le temps, et la première peut donc, dans tous les cas, être analysée grâce à une mono-exponentielle.

2. Association des molécules tetrapyrroliques amphiphiles avec les LDL

Compte tenu de la structure des LDL, les porphyrines peuvent, a priori, s'associer soit à l'apoprotéine, soit à la surface lipidique, soit pénétrer dans le cœur hydrophobe. Les résultats expérimentaux ont conduit à considérer deux types de fixation de la porphyrine aux LDL, définis comme fixation de *classe P* et de *classe L*. En première approximation, l'association de chaque molécule est supposée ne pas dépendre de l'état d'occupation des LDL. En d'autres termes, l'association sera considérée comme étant de pseudo premier ordre. En outre, les deux classes de fixation sont considérées comme indépendantes. Le schéma représentant cet équilibre, où k_{aP} et k_{dP} sont les constantes de vitesse d'association et de dissociation pour les sites de *classe P* et k_{aL} et k_{dL} celles pour la fixation des molécules porphyriques à la phase lipidique de la lipoprotéine (*classe L*), est donné ci-dessous. P_F, P_L et P_P sont respectivement les concentrations en molécules tetrapyrrolique (DP ou $AlPcS_2$) libres, fixées de *classe L* et de *classe P*.

$$P_F + LDL \underset{k_{dP}}{\overset{k_{aP}}{\rightleftharpoons}} P_P$$

$$P_F + LDL \underset{k_{dL}}{\overset{k_{aL}}{\rightleftharpoons}} P_L$$

2.1 Cas général

Le système d'équations différentielles décrivant ce système est donc :

$$dP_F/dt = k_{dL} \times P_L + k_{dP} \times P_P - (k'_{aL} + k'_{aP}) \times P_F \qquad (a.1a)$$

$$dP_L/dt = k'_{aL} \times P_F - k_{dL} \times P_L \qquad (a.1b)$$

$$dP_P/dt = k'_{aP} \times P_F - k_{dP} \times P_P \qquad (a.1c)$$

où k'_{aP} et k'_{aL} sont les constantes apparentes de vitesse d'association, incluant la concentration en LDL :

$$k'_{aL} = k_{aL} \times [LDL]$$

$$k'_{aP} = k_{aP} \times [LDL]$$

Les conditions initiales sont :

$P_{F(t=0)} = P_0$

$P_{L(t=0)} = P_{P(t=0)} = 0$

Ce choix correspond aux conditions de nos expériences où une solution de porphyrine (ou de phtalocyanine) est mélangée avec une solution de lipoprotéines.

La solution de ce système d'équations différentielles peut être déterminée, par exemple, en utilisant les Transformées de Laplace* [140], dont l'application donne :

$$s \times P_F - P_0 = -(k'_{aP} + k'_{aL}) \times P_F + k_{dL} \times P_L + k_{dP} \times P_P$$

$$s \times P_L = k'_{aL} \times P_F - k_{dL} \times P_L$$

$$s \times P_P = k'_{aP} \times P_F - k_{dP} \times P_P$$

où s correspond à la Transformée de Laplace de la fonction dérivée, et P_P, P_L et P_F aux Transformées de Laplace de P_P, P_L et P_F.

Il s'ensuit que :

$$P_F = \frac{P_0 \times \left(s^2 + (k_{dP} + k_{dL}) \times s + k_{dP} \times k_{dL}\right)}{s \times D}$$

$$P_L = \frac{k'_{aL} \times P_0 \times (s + k_{dP})}{s \times D}$$

et $P_P = \dfrac{k'_{aP} \times P_0 \times (s + k_{dL})}{s \times D}$

avec

$$D = s^2 + (k_{dP} + k_{dL} + k'_{aP} + k'_{aL}) \times s + k_{dP} \times k_{dL} + k'_{aL} \times k_{dP} + k'_{aP} \times k_{dL} = (s + k_1) \times (s + k_2)$$

* L'utilisation des transformées et des transformées inverses de laplace est détaillée en annexe 2, page 155.

Les Transformées de Laplace inverses donnent ensuite l'expression décrivant l'évolution des concentrations P_F, P_L et P_P en fonction du temps. Etant donné que D est un polynôme du second degré, cette évolution compte deux termes exponentiels pour chacune des trois espèces. Les constantes de vitesse k_1 et k_2, sont les racines de D (avec une inversion de signe) :

$$k_{1,2} = \frac{1}{2} \times \left[\Sigma k \pm \sqrt{(\Sigma k)^2 - 4 \times (k_{dP} \times k_{dL} + k'_{aL} \times k_{dP} + k'_{aP} \times k_{dL})} \right] \qquad (a.2)$$

où $\Sigma k = k_{dP} + k'_{aP} + k_{dL} + k'_{aL}$

L'expression de P_F est donc :

$$P_F = A_0 - A_1 \times \exp(-k_1 \times t) - A_2 \times \exp(-k_2 \times t) \qquad (a.3)$$

où $$A_0 = P_{F(t=0)} \times \frac{k_{d1} \times k_{d2}}{k_1 \times k_2} \qquad (a.4)$$

et où les amplitudes des termes exponentiels sont :

$$A_1 = P_{F(t=0)} \times \frac{k_1^2 - k_1 \left(k_{dP} + k_{dL}\right) + k_{dP} \times k_{dL}}{k_1 \left(k_2 - k_1\right)} \qquad (a.5)$$

$$A_2 = P_{F(t=0)} \times \frac{k_2^2 - k_2 \left(k_{dP} + k_{dL}\right) + k_{dP} \times k_{dL}}{k_2 \left(k_1 - k_2\right)} \qquad (a.6)$$

2.2 Lorsque $k_{dP} \cong k_{dL}$: cas de la deutéroporphyrine

D'après l'expression (*a*.3), décrivant l'évolution temporelle de P_F, un signal bi-exponentiel est a priori attendu. Cependant, dans nos conditions expérimentales, $k_{dP} \approx k_{dL}$ au regard des k_a, ce qui simplifie considérablement le système. De plus, l'amplitude de la première exponentielle s'annule. En développant k'_{aP} et k'_{aL} en $k_{aP}\times[LDL]$ et $k_{aL}\times[LDL]$ et en remplaçant k_{dP} et k_{dL} par k_d, on obtient, pour P_F :

$$k_1 \cong k_d \qquad (a.7)$$

$$k_2 \cong \left(k_{aP} + k_{aL}\right)\cdot\left[LDL\right] + k_d \qquad (a.8)$$

$$A_1 \cong P_{F(t=0)} \times \frac{\left(k_d^2 - 2k_d^2 + k_d^2\right)}{k_d \times \left(k_{aP} + k_{aL}\right)\times\left[LDL\right]} \cong 0 \qquad (a.9)$$

$$A_2 \cong P_{F(t=0)} \times \frac{\left(k_{aP} + k_{aL}\right)\times\left[LDL\right]}{k_d + \left(k_{aP} + k_{aL}\right)\times\left[LDL\right]} \qquad (a.10)$$

Ainsi, le numérateur de l'équation *a*.9 est nul. De plus, la présence du terme fonction de la concentration en lipoprotéine uniquement au dénominateur de cette équation réduit encore la contribution de la première exponentielle lorsque la concentration en LDL est forte. Les expressions décrivant l'évolution de P_L et de P_P ont été calculées suivant la même procédure.

$$P_P = k'_{aP}\cdot P_{F(t=0)}\cdot\left(\frac{k_{dL}}{k_1\cdot k_2} - \frac{k_{dL}-k_1}{k_1\cdot\left(k_2-k_1\right)}\cdot\exp(-k_1\times t) - \frac{k_{dL}-k_2}{k_2\cdot\left(k_2-k_1\right)}\cdot\exp(-k_2\times t)\right)$$

et

$$P_L = k'_{aL}\cdot P_{F(t=0)}\cdot\left(\frac{k_{dP}}{k_1\cdot k_2} - \frac{k_{dP}-k_1}{k_1\cdot\left(k_2-k_1\right)}\cdot\exp(-k_1\times t) - \frac{k_{dP}-k_2}{k_2\cdot\left(k_2-k_1\right)}\cdot\exp(-k_2\times t)\right)$$

Elles impliquent également les constantes de vitesse k_1 et k_2. Par contre, les constantes d'association se trouvent et au dénominateur et au numérateur. Les simplifications opérées sur P_F ne sont pas valables dans ce cas. Néanmoins, la somme de ces signaux, P_B, qui correspond à l'opposé de P_F, est beaucoup plus simple et est décrit par une mono-exponentielle. En effet, l'amplitude du premier terme

exponentiel étant comme précédemment nulle en considérant que $k_{dP} \approx k_{dL}$ au regard des k_a. On a donc :

$$P_B = P_F + P_P = P_{F(t=o)} \times \left\{ \frac{k_d \left(k_{aP} + k_{aL}\right) \cdot [LDL]}{k_d \cdot \left(k_{aP} - k_{aL}\right) \cdot [LDL] + k_d} - \frac{\left[\left(k_{aP} + k_{aL}\right) \cdot [LDL]\right]^2}{\left[\left(k_{aP} - k_{aL}\right) \cdot [LDL] + k_d\right] \cdot \left(k_{aP} - k_{aL}\right) \cdot [LDL]} \cdot \exp\left(-k_2 \cdot t\right) \right\}$$

et donc,

$$P_B = P_{F(t=0)} \times \left[\frac{(k_{aP} + k_{aL}) \times [LDL]}{k_d + (k_{aP} + k_{aL}) \times [LDL]} - \frac{(k_{aP} + k_{aL}) \times [LDL]}{k_d + (k_{aP} + k_{aL}) \times [LDL]} \cdot \exp(-k_2 \cdot t) \right] \quad (a.11)$$

Comme, dans nos expériences, les concentrations de porphyrine et de LDL sont toujours faibles, aucun effet d'écran ne se produit et l'intensité de fluorescence émise par chaque forme de la porphyrine est directement proportionnelle à sa concentration. L'intensité de fluorescence observée est donc la somme de toutes les contributions. Elle s'écrit donc également comme une mono-exponentielle avec comme constante de vitesse k_2, introduite dans l'équation (*a*.8).

Propriétés du signal et justification des approximations

L'association de la porphyrine aux LDL donne un signal mono-exponentiel dont la constante est donnée par l'équation (*a*.8). Si la différence entre les constantes de sortie est petite, la constante k_1 est directement proportionnelle à la concentration en LDL. A partir de la mesure de cette constante en fonction de [LDL], on peut obtenir la constante d'association globale k_a (pente) et la constante de dissociation k_d (intersection). Cependant, comme nous l'avons souligné, les variations au cours du temps de P_L et P_P sont bien plus complexes. Notamment, il faut remarquer la possibilité d'une redistribution dynamique de la porphyrine entre les différents compartiments du LDL. Cependant, nous n'avons pas pu distinguer expérimentalement P_L et P_P, car les signaux cinétiques obtenus par FRET étaient trop médiocres. Nous avons donc travaillé sur un signal global, cprrepondant à $P_B = P_L + P_P$.

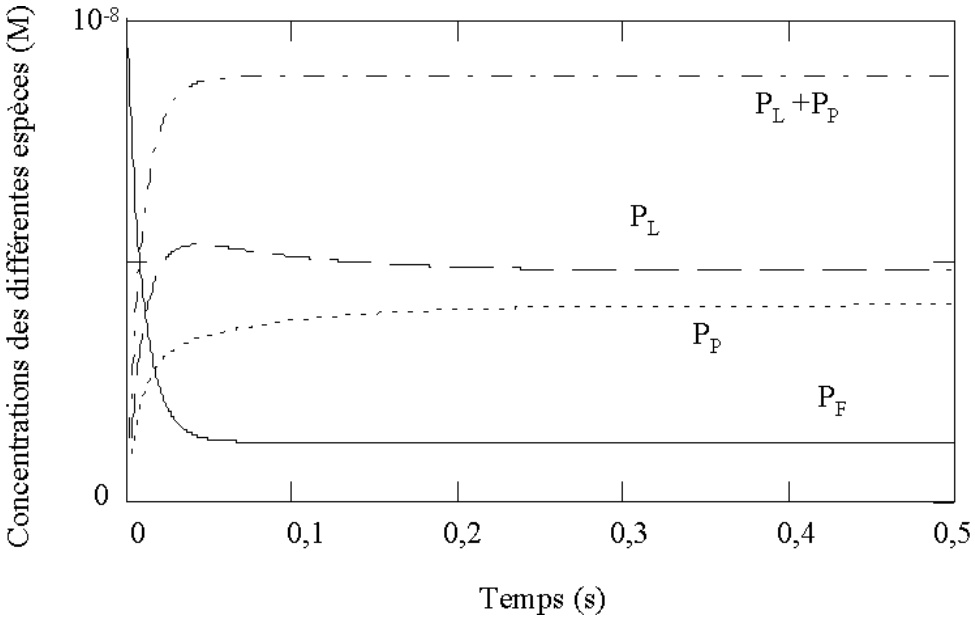


Figure *a*.1 : Caractéristiques de l'évolution des concentrations accompagnant l'incorporation de la porphyrine dans les LDL. Les courbes ont été obtenues sans aucune approximation à partir des équations *a*.1a, b et c. Les calculs ont été faits pour [LDL] = $2x10^{-8}$ M et [DP] = $1x10^{-8}$ M. Les valeurs numériques utilisées pour ces calculs correspondent à nos résultats expérimentaux et sont :

$k_{aPi} = 5 \times 10^8\ M^{-1}s^{-1}$ et n = 4 $\quad$ $k_{aL} = 3 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$
$k_{aP} = 2 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$ $\quad$ $k_{dL} = 15\ s^{-1}$
$k_{dP} = 5.8\ s^{-1}$

Des simulations numériques sur le logiciel MatCad ont été effectuées pour estimer la gamme de validité de cette approximation. Des signaux bi-exponentiels ont été simulés avec différents rapports k_{dL}/k_{dP} et différentes concentrations de LDL en accord avec les équations *a*.2-6. Puis, ils ont été ajustés par de simples exponentielles. Les résidus (écart du signal à la courbe ajustée, normalisé par rapport à l'amplitude totale du signal) ont été calculés (figure 4.17). Quelques exemples pour lesquels la différence entre les constantes de dissociation est plus importante sont donnés sur la figure 4.17. Dans ces cas, il apparaît une déviation progressive des signaux simulés aux courbes théoriques obtenues d'après nos équations simplifiées, équation (*a*.11). Quand k_{dL} et k_{dP} diffèrent de moins d'un facteur 2,6 et pour des concentrations en LDL supérieures ou égales à $1x10^{-8}$ M, la déviation du signal ne peut pas être distinguée du bruit. Quand le rapport est de 5, la déviation commence à être visible pour des concentrations en LDL supérieures ou égales à $2x10^{-8}$ M. Un rapport égal à 10 mènerait à une déviation visible dans la toute la gamme des concentrations de LDL utilisée lors de nos études.

2.3 Cas de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée

En accord avec l'équation (a.3), l'association de la phtalocyanine d'aluminium disulfonée donne un signal bi-exponentiel. L'analyse des résultats a donc été faite à partir du modèle général (équation *a*.2-6), deux types de fixation (*classe L* et *classe P*) ayant été mis en évidence. Comme dans le cas de la deutéroporphyrine, les variations au cours du temps de P_L et P_P sont bien plus complexes que celles de P_F et P_B à cause de l'importance de la dynamique de redistribution de la phtalocyanine entre les différents compartiments du LDL. Cependant, la fixation lipidique, de *classe L*, est très peu impliquée dans les phénomènes mesurés.

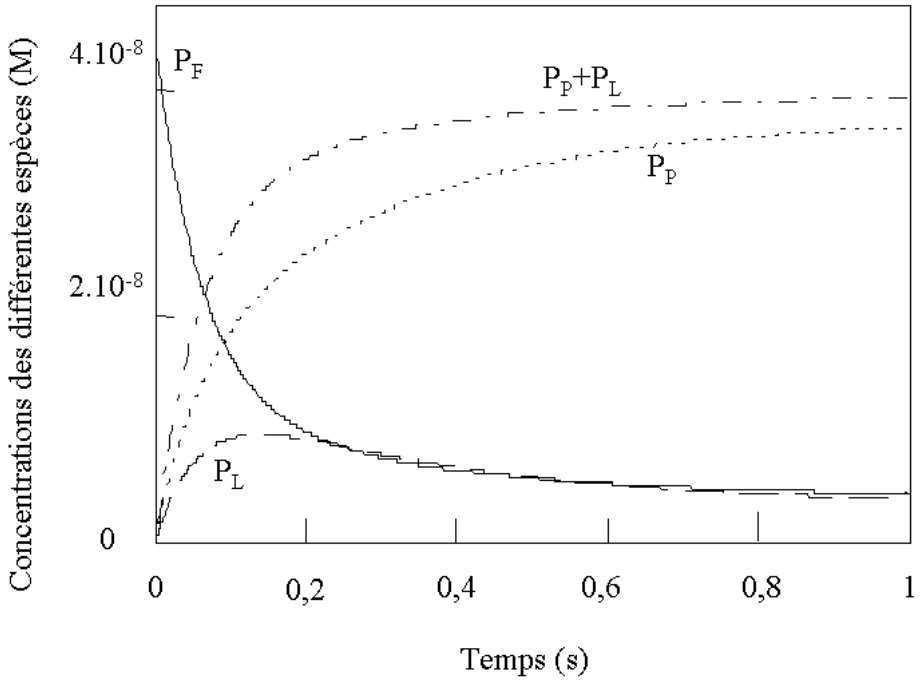


Figure *a*.1 : Caractéristiques de l'évolution des concentrations accompagnant l'incorporation de la phtalocyanine dans les LDL. Les courbes ont été obtenues sans aucune approximation à partir des équations *a*.1a, b et c. Les calculs ont été faits pour [LDL] = $2x10^{-7}$ M et [$AlPcS_2$] = $4,4x10^{-8}$ M. Les valeurs numériques utilisées pour ces calculs correspondent à nos résultats expérimentaux et sont :

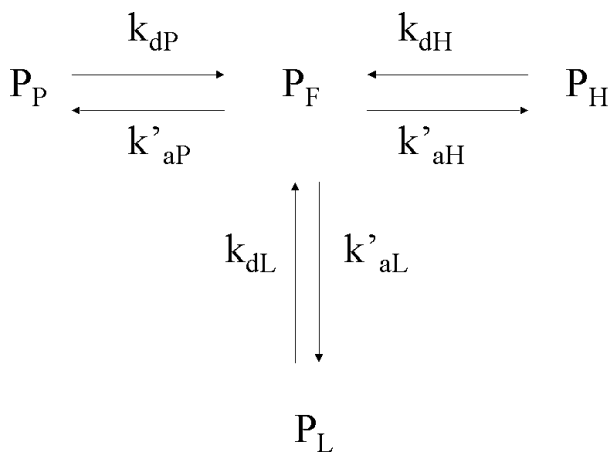
$k_{aPi} = 1,25 \times 10^7\ M^{-1}s^{-1}$ et n = 5 $\qquad$ $k_{aL} = 3,5 \times 10^7\ M^{-1}s^{-1}$

$k_{aP} = 6,25 \times 10^7\ M^{-1}s^{-1}$ $\qquad$ $k_{dL} = 6,8\ s^{-1}$

$k_{dP} = 0.8\ s^{-1}$

3. Transfert des molécules tetrapyrroliques des LDL vers l'albumine

Afin d'avoir un accès direct aux constantes de vitesse de dissociation k_{dL} et k_{dP}, un second type de processus a été étudié dans ce travail : le transfert des molécules porphyriques des LDL vers l'albumine de sérum humain (HSA). Dans le modèle développé, le passage s'effectue par la phase aqueuse selon le mécanisme décrit par le schéma ci-dessous :



où k'_{aH} est la constante de vitesse d'association et k_{dH} la constante de vitesse de dissociation de la fixation de la porphyrine à la HSA et P_H la porphyrine associée à cette protéine.

Dans les expériences réalisées, la concentration en albumine est nettement supérieure à celle en deutéroporphyrine ou en phtalocyanine. Les processus d'association à la HSA et aux LDL sont donc encore supposés répondre aux conditions du pseudo premier ordre. La cinétique du transfert peut donc être décrite par :

$$dP_F/dt = k_{dL} \times P_L + k_{dP} \times P_P + k_{dH} \times P_H - (k'_{aL} + k'_{aP} + k'_{aH}) \times P_F \quad (a.12a)$$

$$dP_L/dt = k'_{aL} \times P_F - k_{dL} \times P_L \quad (a.12b)$$

$$dP_P/dt = k'_{aP} \times P_F - k_{dP} \times P_P \quad (a.12c)$$

$$dP_H/dt = k'_{aH} \times P_F - k_{dH} \times P_H \quad (a.12d)$$

La résolution de ce système implique des termes exponentiels dont les expressions analytiques sont complexes. Cependant, du fait des fortes concentrations en LDL et en HSA utilisées lors des expérimentations, les calculs peuvent être considérablement simplifiés. En effet, les constantes de vitesse d'association des deux molécules tétrapyrroliques à l'albumine et aux LDL sont très nettement supérieures aux constantes de dissociation. La concentration résiduelle de P_F est donc très faible, ainsi que ses variations au cours du temps (dérivée). Hormis pendant la courte période initiale, l'approximation de Bodenstein est donc valide, c.-à-d. $dP_F/dt=0$. Nous pouvons ainsi exprimer P_F en fonction de P_P, P_L et P_H . De plus, dans nos expériences, la constante apparente de vitesse d'association de la porphyrine à l'albumine ($k'_{aH} = k_{aH}\times[HSA]$) est largement plus grande que la constante de vitesse d'association avec les LDL puisque l'albumine est en excès ([HSA]>>[LDL]). Il en découle que :

$$\frac{dP_F}{dt} \cong 0$$

$$\frac{dP_P}{dt} = \left(\frac{k_{aP}\times k_{dP}}{k_{aH}} - k_{dP}\right)\times P_P + \frac{k_{aP}\times k_{dL}}{k_{aH}}\times P_L + \frac{k_{aP}\times k_{dH}}{k_{aH}}\times P_H$$

$$\frac{dP_L}{dt} = \frac{k_{aL}\times k_{dP}}{k_{aH}}\times P_P + \left(\frac{k_{aL}\times k_{dL}}{k_{aH}} - k_{dL}\right)\times P_L + \frac{k_{aL}\times k_{dH}}{k_{aH}}\times P_H$$

$$\frac{dP_H}{dt} = k_{dp}\times P_P + k_{dL}\times P_L$$

En utilisant les Transformées de Laplace avec, comme conditions initiales $P_{L(t=0)} = P_{L0}$, $P_{P(t=0)} = P_{P0}$ et $P_{F(t=0)} = P_{H(t=0)} = 0$ et en négligeant, de plus, les termes qui deviennent petits lorsque [HSA] >> [LDL], on obtient :

$$P_P = \frac{\left(\frac{k_{aP}\times k_{dL}}{k_{aH}}\times s\right)\times P_{L0} + \left(s^2 + k_{dL}\times s\right)\times P_{P0}}{s\times D}$$

$$P_L = \frac{\left(\frac{k_{aL}\times k_{dP}}{k_{aH}}\times s\right)\times P_{P0} + \left(s^2 + k_{dP}\times s\right)\times P_{L0}}{s\times D}$$

$$P_H = \frac{\left[k_{dP} \times s + \left(k_{dP} \times k_{dL} + \frac{k_{dL} \times k_{aL} \times k_{dP}}{k_{aH}}\right)\right] \times P_{P0}}{s \times D} + \frac{\left[k_{dL} \times s + \left(k_{dP} \times k_{dL} + \frac{k_{dL} \times k_{aL} \times k_{dP}}{k_{aH}}\right)\right] \times P_{L0}}{s \times D}$$

où $D = s^2 + (k_{dL} + k_{dP}) \times s + k_{dL} \times k_{dP} = (s + k_{dL}) \times (s + k_{dP})$ (*a*.13)

Les Transformées de Laplace inverses donnent les expressions décrivant l'évolution de P_H, P_L et P_P en fonction du temps. Chacune de ces expressions est une somme d'une constante et de deux termes exponentiels. Les constantes de vitesse k_1 et k_2 sont les racines, au signe près, de l'équation *a*.13.

$$k_1 = k_{dP} \quad (a.14)$$

$$k_2 = k_{dL} \quad (a.15)$$

Pour chacune des deux exponentielles (notées 1 et 2), les part de concentration des différentes formes de la molécule (notées H, P, L) sont données ci-dessous. Leurs contribution à l'amplitude du signal expérimentales leur sont proportionnelles, le facteur de proportionnalité dépendant de leurs propriétés de fluorescence. Elles sont donc proportionnelles aux expressions :

$$A_{H,1} = \frac{\left(k_{dL} - k_{dP} + \frac{k_{aL} \times k_{dL}}{k_{aH}}\right) \times P_{P0} + \frac{k_{aP} \times k_{dL}}{k_{aH}} \times P_{L0}}{k_{dL} - k_{dP}}$$

$$A_{H,2} = \frac{\frac{k_{aL} \times k_{dP}}{k_{aH}} \times P_{P0} + \left(k_{dP} - k_{dL} + \frac{k_{aP} \times k_{dP}}{k_{aH}}\right) \times P_{L0}}{k_{dP} - k_{dL}}$$

$$A_{P,1} = \frac{(k_{dP} - k_{dL}) \times P_{P0} + \frac{k_{aP} \times k_{dL}}{k_{aH}} \times P_{L0}}{k_{dL} - k_{dP}}$$

$$A_{P,2} = \frac{k_{aP} \times k_{dL}}{k_{aH} \times (k_{dP} - k_{dL})} \times P_{L0}$$

$$A_{L,1} = \frac{k_{aL} \times k_{dP}}{k_{aH} \times (k_{dL} - k_{dP})} \times P_{P0} \quad A_{L,2} = \frac{(k_{dL} - k_{dP}) \times P_{L0} + \frac{k_{aL} \times k_{dP}}{k_{aH}} \times P_{P0}}{k_{dP} - k_{dL}}$$

Les contributions des différentes formes à chacun des deux termes exponentiels sont semblables, et ce même quand k_{dP} et k_{dL} sont proches. Il nous sera donc possible de les différencier. L'évolution des concentrations des différentes espèces est très clairement bi-exponentielle (figure *a*.2).

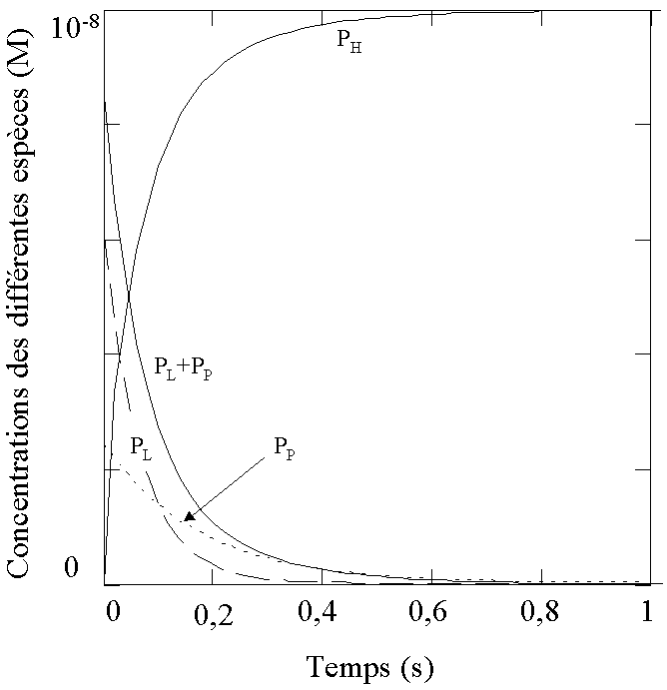


Figure *a*.2 :

Caractéristiques de l'évolution des concentrations accompagnant le transfert de la porphyrine des LDL vers la HSA, calculées à partir des équations (*a*.12a-d).

Les courbes ont été obtenues sans aucune approximation à partir des équations 1a, b et c. Les calculs ont été faits pour [LDL] = 2×10^{-8} M, [HSA] = 10^{-4} M et [DP] = 1×10^{-8} M. Les valeurs numériques utilisées pour ces calculs sont :

$k_{aPi} = 5 \times 10^{8}\ M^{-1}s^{-1}$
$k_{aL} = 3 \times 10^{9}\ M^{-1}s^{-1}$
$n = 4$
$k_{dL} = 15\ s^{-1}$
$k_{aP} = 2 \times 10^{9}\ M^{-1}s^{-1}$
$k_{dP} = 5.8\ s^{-1}$

Annexe 2

TRANSFORMEES DE LAPLACE

Soit une fonction F(t) de la variable t.

Posons $\Im(s) = \int_0^\infty F(t) \cdot \exp(-s \cdot t) \cdot dt = TransfLap(F(t))$

Si, pour cette fonction F, l'intégrale ci-dessous existe, elle définit sa transformée de Laplace au point s. La transformée de Laplace de la dérivée de F(t) s'écrit :

$$TransfLap\left(\frac{dF(t)}{dt}\right) = s \cdot \Im(s) - F(0)$$

Dans ce travail, nous avons utilisé les transformées de Laplace pour résoudre les systèmes d'équations différentielles décrivant les cinétiques des réactions étudiées. En effet, comme le montre l'expression ci-dessus, l'applications de ces transformées à un tel système conduit à remplacer les dérivations par de simples multiplications, ce qui rend la résolution dans l'espace de Laplace triviale. En utilisant les transformées de Laplace inverses, il est ensuite possible de convertir le résultat obtenu dans l'espace de t (ici, t est la variable temps et F(t) est donc une fonction du temps).

Dans nos calculs, nous avons utilisé les transformées de Laplace inverses de rapports de polynômes. Si les racines du dénominateur, notées a_1, a_1, …, a_n, diffèrent les unes des autres, cette transformées inverse se calcule comme suit :

$$TransfLap\left(\frac{p(s)}{q(s)}\right) = \sum_{m=1}^{n} \frac{p(a_m)}{q'(a_m)} \cdot \exp(a_m \cdot t)$$ où q' est la dérivée de q.

Les transformées de Laplace inverses ont été calculées pour un grand nombre d'expressions, et sont données dans des tables comme [171].

Le tableau ci-après donne les résultats concrets utilisés dans ce travails :

Expression dans l'espace de Laplace	Transformée de Laplace inverse
$\frac{a \cdot s + b}{s \cdot (s + k_1) \cdot (s + k_2)}$	$\frac{b}{k_1 \cdot k_2} - \frac{b - a \cdot k_1}{k_1 \cdot (k_2 - k_1)} \cdot \exp(-k_1 \cdot t)$ $- \frac{b - a \cdot k_2}{k_2 \cdot (k_1 - k_2)} \cdot \exp(-k_2 \cdot t)$
$\frac{a \cdot s^2 + b \cdot s + c}{s \cdot (s + k_1) \cdot (s + k_2)}$	$\frac{c}{k_1 \cdot k_2} - \frac{a(k_1)^2 - b \cdot k_1 + c}{k_1 \cdot (k_2 - k_1)} \cdot \exp(-k_1 \cdot t)$ $- \frac{a(k_2)^2 - b \cdot k_2 + c}{k_2 \cdot (k_1 - k_2)} \cdot \exp(-k_2 \cdot t)$

REFERENCES

1. Bjornson, L.K., et al., *The transport of alpha-tocopherol and beta-carotene in human blood.* J Lipid Res, 1976. **17**(4): p. 343-52.
2. Kadish, K.M.E., et al., *The Porphyrin Handbook.* Academic Press ed. 2000.
3. Krieg, R.C., et al., *Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro.* Photochem Photobiol, 2000. **72**(2): p. 226-33.
4. Sassa, S., *Recent progress in Heme Synthesis and metabolism*, in *Regulation of Heme Protein*, H. Fujita, Editor. 1994, AlphaMed Press: Dayton. p. 1-10.
5. Moan, J., C. Rimington, and A. Western, *The binding of dihematoporphyrin ether (photofrin II) to human serum albumin.* Clin Chim Acta, 1985. **145**(3): p. 227-36.
6. Policard, A., C. R. Soc. Biol., 1924. **91**: p. 1423-1424.
7. Rao, K.N., *The significance of the cholesterol biosynthetic pathway in cell growth and carcinogenesis (review).* Anticancer Res, 1995. **15**(2): p. 309-14.
8. Fielding, C.J., *Lipoprotein receptors, plasma cholesterol metabolism, and the regulation of cellular free cholesterol concentration.* Faseb J, 1992. **6**(13): p. 3162-8.
9. Brown, M.S., J.L. Goldstein, and M.D. Siperstein, *Regulation of cholesterol synthesis in normal and malignant tissue.* Fed Proc, 1973. **32**(12): p. 2168-73.
10. Gal, D., et al., *Cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. III. Low- density lipoprotein metabolism.* Int. J. Cancer, 1981. **28**(3): p. 315-9.
11. Vitols, S., et al., *Elevated uptake of low density lipoproteins by human lung cancer tissue in vivo.* Cancer Res., 1992. **52**(22): p. 6244-7.
12. Singer, S.J. and N. G.L., *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.* Science, 1972. **175**: p. 720-731.
13. Brault, D., C. Vever-Bizet, and T. Le Doan, *Spectrofluorimetric study of porphyrin incorporation into membrane models - evidence for pH effects.* Biochim. Biophys. Acta, 1986. **857**: p. 238-250.
14. Brault, D., *Physical chemistry of porphyrins and their interactions with membranes: the importance of pH.* J Photochem Photobiol B, 1990. **6**(1-2): p. 79-86.
15. Brault, D. and C. Vever-Bizet, *Protonation equilibria of haematoporphyrin as studied by fluorescence lifetime analysis.* J. Chem. Soc. Faraday Trans., 1992. **88**(11): p. 1519-1524.

16. Brault, D., C. Vever-Bizet, and K. Kuzelova, *Interactions of dicarboxylic porphyrins with membranes in relation to their ionization state.* J Photochem Photobiol B, 1993. **20**(2-3): p. 191-5.

17. Barrett, A.J., et al., *The effect of tissue and cellular pH on the selective biodistribution of porphyrin-type photochemotherapeutic agents: a volumetric titration study.* J Photochem Photobiol B, 1990. **6**(3): p. 309-23.

18. Eftink, M.R., *Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions.* Methods Enzymol, 1997. **278**: p. 221-57.

19. Wavilov, S.I., Z. Physik, 1927. **42**(311).

20. Gaviola, E., Z. Physik, 1926. **35**(748).

21. Bayliss, N.S. and E.G. McRae, J. Phys. Chem., 1954: p. 1002.

22. Lippert, E., Z. Electrochem., 1957. **61**: p. 962.

23. Bakchiev, N.G., Opt. Spktrok., 1962. **12**: p. 350.

24. Stryer, L., *Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler.* Annu Rev Biochem, 1978. **47**: p. 819-46.

25. Fairclough, R.H. and C.R. Cantor, *The use of singlet-singlet energy transfer to study macromolecular assemblies.* Methods Enzymol, 1978. **48**: p. 347-79.

26. Wu, P. and L. Brand, *Resonance energy transfer: methods and applications.* Anal Biochem, 1994. **218**(1): p. 1-13.

27. Coppey-Moisan, M., et al., *Dynamical change of mitochondrial DNA induced in the living cell by perturbing the electrochemical gradient.* Biophys J, 1996. **71**(5): p. 2319-28.

28. Daniel, E. and G. Weber, *Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. I. The binding of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate. Fluorimetric titrations.* Biochemistry, 1966. **5**(6): p. 1893-900.

29. Weber, G. and E. Daniel, *Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. II. The binding of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate. Polarization of the ligand fluorescence and quenching of the protein fluorescence.* Biochemistry, 1966. **5**(6): p. 1900-7.

30. LePecq, J.B. and C. Paoletti, *A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization.* J Mol Biol, 1967. **27**(1): p. 87-106.

31. Blake, A. and A.R. Peacocke, *The interaction of aminocridines with nucleic acids.* Biopolymers, 1968. **6**(9): p. 1225-53.

32. Theorell, H. and K. Tatemoto, *Excitation transfer in complexes of horse liver alcohol dehydrogenase.* Arch Biochem Biophys, 1971. **142**(1): p. 69-82.

33. Brewer, J.M. and G. Weber, *The effect of magnesium on some physical properties of yeast enolase.* J Biol Chem, 1966. **241**(11): p. 2550-7.

34. Lehrer, S.S. and G.D. Fasman, *The fluorescence of lysozyme and lysozyme substrate complexes.* Biochem Biophys Res Commun, 1966. **23**(2): p. 133-8.

35. Halfman, C.J. and T. Nishida, *Method for measuring the binding of small molecules to proteins from binding-induced alterations of physical-chemical properties.* Biochemistry, 1972. **11**(18): p. 3493-8.

36. Hartridge, H. and F.J.W. Roughton, Proc. Roy. Soc. London, 1923. **A104**: p. 376.

37. Hartridge, H. and F.J.W. Roughton, Proc. Cambridge Phil. Soc., 1926. **23**: p. 450.

38. Roughton, F.J.W., Proc. Roy. Soc. London, 1934. **B115**: p. 473.

39. Miller, J.L. and R.A. Alberty, *Kinetics of reversibles Michaelis-Menten mechanism and the applicability of the steady-state approximation.* J. Am. Chem. Soc., 1958. **80**: p. 5146.

40. Hammes, G.G. and P.R. Schimmel, *Rapid reactions and transient states*. The enzymes, ed. P.D. Boyer. Vol. 2. 1970, New York: Academic Press.

41. Moan, J. and K. Berg, *The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen.* Photochem Photobiol, 1991. **53**(4): p. 549-53.

42. Dougherty, T.J., et al., *Photodynamic therapy.* J. Natl. Cancer Inst., 1998. **90**(12): p. 889-905.

43. Pottier, R. and T.G. Truscott, *The photochemistry of haematoporphyrin and related systems.* Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1986. **50**(3): p. 421-52.

44. Jessionek, A. and H. von Tappeiner, Munch. Med. Wochenschr., 1903. **41**: p. 2042-51.

45. Auler, H. and G. Banzer, Z. Krebsforsch, 1942. **53**: p. 65-68.

46. Lipson, R.L., E.J. Baldes, and A.M. Olsen, J. Natl. Cancer Inst., 1961. **26**: p. 1-11.

47. Lipson, R.L., M.J. Gray, and E.J. Baldes, Proc. 9th Int. Cancer Congr., 1966(393).

48. Diamond, I., S. Ganelli, and A.F. Mcdonald, Lancet, 1973. **2**: p. 1177.

49. Dougherty, T.J., *Activated dyes as antitumor agents.* J Natl Cancer Inst, 1974. **52**(4): p. 1333-6.

50. Dougherty, T.J., et al., *Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light.* J Natl Cancer Inst, 1975. **55**(1): p. 115-21.

51. Dougherty, T.J., et al., *Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors.* Cancer Res, 1978. **38**(8): p. 2628-35.

52. Dougherty, T.J., et al., *Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma.* J Natl Cancer Inst, 1979. **62**(2): p. 231-7.

53. Kato, H., T. Okunaka, and H. Shimatani, *Photodynamic therapy for early stage bronchogenic carcinoma.* J. Clin. Laser Med. Surg., 1996. **14**(5): p. 235-8.

54. Fingar, V.H., *Vascular effects of photodynamic therapy.* J Clin Laser Med Surg, 1996. **14**(5): p. 323-8.

55. Boyle, R.W. and D. Dolphin, *Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers.* Photochem. Photobiol., 1996. **64**(3): p. 469-85.

56. Bass, S.J. and V. Giovinazzo, *Laser treatment of macular disease.* Optom Clin, 1996. **5**(1): p. 161-73.

57. Bown, S.G., *Science, medicine, and the future. New techniques in laser therapy.* Bmj, 1998. **316**(7133): p. 754-7.

58. Atmaca, L.S., F. Batioglu, and P. Atmaca, *Evaluation of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with fluorescein and indocyanine green videoangiography.* Ophthalmologica, 1996. **210**(3): p. 148-51.

59. Schmidt-Erfurth, U., et al., *In vivo uptake of liposomal benzoporphyrin derivative and photothrombosis in experimental corneal neovascularization.* Lasers Surg Med, 1995. **17**(2): p. 178-88.

60. Scott, L.J. and K.L. Goa, *Verteporfin.* Drugs Aging, 2000. **16**(2): p. 139-46; discussion 147-8.

61. Schmidt-Erfurth, U., et al., *Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization: clinical and angiographic examples.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1998. **236**(5): p. 365-74.

62. Schmidt-Erfurth, U., et al., *[Selective occlusion of subretinal neovascularization with photodynamic therapy].* Ophthalmologe, 1994. **91**(6): p. 789-95.

63. Kramer, M., et al., *Liposomal benzoporphyrin derivative verteporfin photodynamic therapy. Selective treatment of choroidal neovascularization in monkeys.* Ophthalmology, 1996. **103**(3): p. 427-38.

64. Donati, G., A.D. Kapetanios, and C.J. Pournaras, *Principles of treatment of choroidal neovascularization with photodynamic therapy in age-related macular degeneration.* Semin. Ophthalmol., 1999. **14**(1): p. 2-10.

65. *Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: one-year results of 2 randomized clinical trials--TAP report. Treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) Study Group.* Arch. Ophthalmol., 1999. **117**(10): p. 1329-45.

66. de Smidt, P.C. and T.J. van Berkel, *LDL-mediated drug targeting.* Crit. Rev .Ther. Drug Carrier Syst., 1990. **7**(2): p. 99-120.

67. Tokui, T., et al., *Plasma lipoproteins as targeting carriers to tumour tissues after administration of a lipophilic agent to mice.* Biopharm Drug Dispos, 1995. **16**(2): p. 91-103.

68. Allison, B.A., et al., *The plasma distribution of benzoporphyrin derivative and the effects of plasma lipoproteins on its biodistribution.* Photochem Photobiol, 1990. **52**(3): p. 501-7.

69. Rensen, P.C., et al., *Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting.* Adv. Drug Deliv. Rev., 2001. **47**(2-3): p. 251-76.

70. Maziere, J.C., P. Morliere, and R. Santus, *The role of the low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of lipophilic photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours.* J Photochem Photobiol B, 1991. **8**(4): p. 351-60.

71. de Smidt, P.C., A.J. Versluis, and T.J. van Berkel, *Properties of incorporation, redistribution, and integrity of porphyrin- low-density lipoprotein complexes.* Biochemistry, 1993. **32**(11): p. 2916-22.

72. Barel, A., et al., *Role of high-, low- and very low-density lipoproteins in the transport and tumor-delivery of hematoporphyrin in vivo.* Cancer Lett, 1986. **32**(2): p. 145-50.

73. Kessel, D., *Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization.* Cancer Lett., 1986. **33**(2): p. 183-8.

74. Candide, C., et al., *In vitro interaction of the photoactive anticancer porphyrin derivative photofrin II with low density lipoprotein, and its delivery to cultured human fibroblasts.* FEBS Lett., 1986. **207**(1): p. 133-8.

75. Reyftmann, J.P., et al., *Interaction of human serum low density lipoproteins with porphyrins: a spectroscopic and photochemical study.* Photochem. Photobiol., 1984. **40**(6): p. 721-9.

76. Miller, J.W., et al., *Photodynamic therapy of experimental choroidal neovascularization using lipoprotein-delivered benzoporphyrin.* Arch. Ophthalmol., 1995. **113**(6): p. 810-8.

77. Aveline, B.M. and R.W. Redmond, *Can cellular phototoxicity be accurately predicted on the basis of sensitizer photophysics?* Photochem Photobiol, 1999. **69**(3): p. 306-16.

78. Ouedraogo, G., et al., *Lysosomes are sites of fluoroquinolone photosensitization in human skin fibroblasts: a microspectrofluorometric approach.* Photochem Photobiol, 1999. **70**(2): p. 123-9.

79. Rousset, N., et al., *Cellular distribution and phototoxicity of benzoporphyrin derivative and Photofrin.* Res Exp Med (Berl), 2000. **199**(6): p. 341-57.

80. Khanum, F. and V. Jain, *Cellular accumulation and biological activity of hematoporphyrin derivative(L) in comparison with photofrin II.* Indian J Exp Biol, 1997. **35**(4): p. 348-55.

81. Pottier, R. and J.C. Kennedy, *The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue.* J Photochem Photobiol B, 1990. **8**(1): p. 1-16.

82. Henderson, B.W. and T.J. Dougherty, *How does photodynamic therapy work?* Photochem. Photobiol., 1992. **55**(1): p. 145-57.

83. Vonarx, V., et al., *Photodynamic therapy decreases cancer colonic cell adhesiveness and metastatic potential.* Res. Exp. Med., 1995. **195**(2): p. 101-16.

84. Rousset, N., et al., *Effects of photodynamic therapy on adhesion molecules and metastasis.* J. Photochem. Photobiol. B., 1999. **52**(1-3): p. 65-73.

85. Woodburn, K.W., et al., *Evaluation of porphyrin characteristics required for photodynamic therapy.* Photochem Photobiol, 1992. **55**(5): p. 697-704.

86. Dellinger, M., *Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol.* Photochem Photobiol, 1996. **64**(1): p. 182-7.

87. Kessel, D., et al., *The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy.* Photochem Photobiol, 1997. **65**(3): p. 422-6.

88. Hsieh, Y.J., et al., *Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets.* J Cell Physiol, 2003. **194**(3): p. 363-75.

89. Berg, K. and J. Moan, *Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer.* Photochem Photobiol, 1997. **65**(3): p. 403-9.

90. Rodal, G.H., et al., *Liposome-bound Zn (II)-phthalocyanine. Mechanisms for cellular uptake and photosensitization.* J Photochem Photobiol B, 1998. **45**(2-3): p. 150-9.

91. Ball, D.J., et al., *A comparative study of the cellular uptake and photodynamic efficacy of three novel zinc phthalocyanines of differing charge.* Photochem Photobiol, 1999. **69**(3): p. 390-6.

92. Hamblin, M.R. and E.L. Newman, *On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy.* J Photochem Photobiol B, 1994. **23**(1): p. 3-8.

93. Shechter, E., *Membranes biologiques. Structure, transports, bioénergétique*. 1984, Paris, France: Masson.

94. Stein, W.D., *Permeability for lipophilic molecules*, in *Membrane transport*. 1981, Elsevier. p. 1-128.

95. Kepczynski, M. and B. Ehrenberg, *Interaction of dicarboxylic metalloporphyrins with liposomes. The effect of pH on membrane binding revisited.* Photochem Photobiol, 2002. **76**(5): p. 486-92.

96. Maman, N. and D. Brault, *Kinetics of the interactions of a dicarboxylic porphyrin with unilamellar lipidic vesicles: interplay between bilayer thickness and pH in rate control.* Biochim Biophys Acta, 1998. **1414**(1-2): p. 31-42.

97. Kuzelova, K. and D. Brault, *Interactions of dicarboxylic porphyrins with unilamellar lipidic vesicles: drastic effects of pH and cholesterol on kinetics.* Biochemistry, 1995. **34**(35): p. 11245-55.

98. Beltramini, M., et al., *Steady-state and time-resolved spectroscopic studies on the hematoporphyrin-lipoprotein complex.* Biochemistry, 1987. **26**(21): p. 6852-8.

99. Margalit, R. and M. Rotenberg, *Thermodynamics of porphyrin dimerization in aqueous solutions.* Biochem. J., 1984. **219**(2): p. 445-450.

100. Maman, N., et al., *Kinetic and equilibrium studies of incorporation of di-sulfonated aluminum phthalocyanine into unilamellar vesicles.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1420**(1-2): p. 168-78.

101. Delattre, J., et al., *les liposomes. Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques.*, ed. E. INSERM. 1993, Paris.

102. Huang, C. and L. Lee, *Diffusion studies on phosphatidylcholine vesicles.* J Am Chem Soc, 1973. **95**(1): p. 234-9.

103. Fattal, E., et al., *Pore-forming peptides induce rapid phospholipid flip-flop in membranes.* Biochemistry, 1994. **33**(21): p. 6721-31.

104. Yang, C.Y., et al., *Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100.* Nature, 1986. **323**(6090): p. 738-42.

105. Segrest, J.P., et al., *Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins.* J. Lipid Res., 2001. **42**(9): p. 1346-67.

106. Schumaker, V.N., M.L. Phillips, and J.E. Chatterton, *Apolipoprotein B and low-density lipoprotein structure: implications for biosynthesis of triglyceride-rich lipoproteins.* Adv Protein Chem, 1994. **45**: p. 205-48.

107. van Antwerpen, R., et al., *Structural heterogeneity of apoB-containing serum lipoproteins visualized using cryo-electron microscopy.* J Lipid Res, 1999. **40**(10): p. 1827-36.

108. Orlova, E.V., et al., *Three-dimensional structure of low density lipoproteins by electron cryomicroscopy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8420-5.

109. Ambroz, M., et al., *Preparative, analytical and fluorescence spectroscopic studies of sulphonated aluminium phthalocyanine photosensitizers.* J Photochem Photobiol B, 1991. **9**(1): p. 87-95.

110. Bishop, S.M., et al., *Characterisation of the photochemotherapeutic agent disulphonated aluminium phthalocyanine and its high-performance liquid chromatographic separated components.* J Chromatogr, 1993. **646**(2): p. 345-50.

111. Havel, R.J., H.A. Eder, and J.H. Bragdon, *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.* J. Clin. Invest., 1955. **34**: p. 1345-1353.

112. Peterson, G.L., *Simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable.* Anal. Biochem., 1977. **83**: p. 346-356.

113. Carr, A.C., et al., *Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis.* FEBS Lett, 2000. **487**(2): p. 176-180.

114. Mayer, L.D., M.J. Hope, and P.R. Cullis, *Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure.* Biochim Biophys Acta, 1986. **858**(1): p. 161-8.

115. Lesieur, S., et al., *Size analysis and stability study of lipid vesicles by high-performance gel exclusion chromatography, turbidity, and dynamic light scattering.* Anal Biochem, 1991. **192**(2): p. 334-43.

116. Scatchard, G., *The attraction of proteins for small molecules and ions.* Annals of the New York Academy of Sciences, 1949. **51**: p. 660-672.

117. Scatchard, G., I.H. Scheinberg, and S.H. Armstrong, J. Amer. Chem. Soc., 1950. **72**: p. 535.

118. Kuzelova, K. and D. Brault, *Kinetic and equilibrium studies of porphyrin interactions with unilamellar lipidic vesicles.* Biochemistry, 1994. **33**(32): p. 9447-59.

119. Brown, S.B., M. Shillcock, and P. Jones, *Equilibrium and kinetic studies of the aggregation of porphyrins in aqueous solution.* Biochem . J., 1976. **153**(2): p. 279-285.

120. White, W.I., *Aggregation of porphyrins and metalloporphyrins*, in *The Porphyrins*, D. Dolphin, Editor. 1978, Academic Press,: New York,. p. 303-339.

121. Gennis, R.B., *Interaction of small molecules with membranes: Partitioning, permeability and electrical effects.*, in *Biomembranes: Molecular structures and fonction.* 1989, Springer-Verlag: New York. p. 235-69.

122. Lavi, A., et al., *The depth of porphyrin in a membrane and the membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency.* Biophys. J., 2002. **82**(4): p. 2101-10.

123. Smith, K.M., *Porphyrins and metalloporphyrins*. 1975, Amsterdam: Elsevier.

124. Kasha, M., *Energy transfer mechanisms and the molecular exciton model for molecular aggregates.* Radiat. Res., 1963. **20**: p. 55-70.

125. Dairou, J., C. Vever-Bizet, and D. Brault, *Self-association of disulfonated deuteroporphyrin and its esters in aqueous solution and photosensitized production of singlet oxygen by the dimers.* Photochem Photobiol, 2002. **75**(3): p. 229-36.

126. Atkins, P.W., *Physical chemistry*. 4th ed. 1990, Oxford: Oxford University Press.

127. Vever-Bizet, C. and D. Brault, *Kinetics of incorporation of porphyrins into small unilamellar vesicles.* Biochim Biophys Acta, 1993. **1153**(2): p. 170-4.

128. Eigen, M., et al., *Rate constants of protolytic reactions in aqueous solutions.*, in *Progress in reaction kinetics*, G. Porter, Editor. 1964, Pergamon Press: Oxford. p. 287-318.

129. Morales-Rojas, H. and A.K. Yatsimirsky, *Medium effects on the dimerization of coproporphyrin-I free base.* J. Phys. Org. Chem., 1999. **12**: p. 377-387.

130. Egret-Charlier, M., A. Sanson, and M. Ptak, *Ionization of fatty acids at the lipid--water interface.* FEBS Lett, 1978. **89**(2): p. 313-6.

131. Jori, G., et al., *Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers in vivo.* Cancer Lett., 1984. **24**(3): p. 291-7.

132. Kessel, D., *The role of low-density lipoprotein in the biodistribution of photosensitizing agents.* J Photochem Photobiol B, 1992. **14**(3): p. 261-2.

133. Biade, S., et al., *Lovastatin potentiates the photocytotoxic effect of photofrin II delivered to HT29 human colonic adenocarcinoma cells by low density lipoprotein.* Photochem Photobiol, 1993. **57**(2): p. 371-5.

134. de Vries, H.E., et al., *Oxidized low-density lipoprotein as a delivery system for photosensitizers: implications for photodynamic therapy of atherosclerosis.* J Pharmacol Exp Ther, 1999. **289**(1): p. 528-34.

135. Mahley, R.W., et al., *Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function.* J Lipid Res, 1984. **25**(12): p. 1277-94.

136. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 1983, New York: Plenum Press.

137. Ho, C.H., D.W. Britt, and V. Hlady, *Human low density lipoprotein and human serum albumin adsorption onto model surfaces studied by total internal reflection fluorescence and scanning force microscopy.* J Mol Recognit, 1996. **9**(5-6): p. 444-55.

138. Galantai, R. and I. Bardos-Nagy, *The interaction of human serum albumin and model membranes.* Int J Pharm, 2000. **195**(1-2): p. 207-18.

139. Galantai, R., et al., *Serum albumin-lipid membrane interaction influencing the uptake of porphyrins.* Arch Biochem Biophys, 2000. **373**(1): p. 261-70.

140. Connors, K.A., *Chemicals kinetics*. 1990, New York: VCH Publishers.

141. Lee, D.M. and P. Alaupovic, *Physiocochemical properties of low-density lipoproteins of normal human plasma. Evidence for the occurrence of lipoprotein B in associated and free forms.* Biochem J, 1974. **137**(2): p. 155-67.

142. Santos, A.E., J.A. Laranjinha, and L.M. Almeida, *Sulfonated chloroaluminum phthalocyanine incorporates into human plasma lipoproteins: photooxidation of low-density lipoproteins.* Photochem Photobiol, 1998. **67**(4): p. 378-85.

143. Polo, L., et al., *Low-density lipoprotein receptors in the uptake of tumour photosensitizers by human and rat transformed fibroblasts.* Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(1): p. 10-23.

144. Reff, M. and E.L. Schneider, *Cell culture aging.* Mol Cell Biochem, 1981. **36**(3): p. 169-76.

145. Frolov, A., et al., *High density lipoprotein-mediated cholesterol uptake and targeting to lipid droplets in intact L-cell fibroblasts. A single- and multiphoton fluorescence approach.* J. Biol. Chem., 2000. **275**(17): p. 12769-80.

146. Brasaemle, D.L., et al., *Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein.* J. Lipid Res., 1997. **38**: p. 2249-63.

147. Jiang, H.P. and G. Serrero, *Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1992. **89**(17): p. 7856-60.

148. Gao, J. and G. Serrero, *Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake.* J. Biol. Chem., 1999. **274**(24): p. 16825-30.

149. Moan, J., et al., *Sulfonated aluminium phthalocyanines as sensitizers for photochemotherapy. Effects of small light doses on localization, dye fluorescence and photosensitivity in V79 cells.* Int J Cancer, 1994. **58**(6): p. 865-70.

150. Konan, Y.N., R. Gurny, and E. Allemann, *State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy.* J Photochem Photobiol B, 2002. **66**(2): p. 89-106.

151. Kepczynski, M., et al., *Do liposome-binding constants of porphyrins correlate with their measured and predicted partitioning between octanol and water?* Photochem Photobiol, 2002. **76**(2): p. 127-34.

152. Cunderlikova, B., et al., *Increased binding of chlorin e(6) to lipoproteins at low pH values.* Int. J. Biochem. Cell. Biol., 2000. **32**(7): p. 759-68.

153. Ginevra, F., et al., *Delivery of the tumour photosensitizer zinc(II)-phthalocyanine to serum proteins by different liposomes: studies in vitro and in vivo.* Cancer Lett, 1990. **49**(1): p. 59-65.

154. Jori, G. and E. Reddi, *The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers.* Int J Biochem, 1993. **25**(10): p. 1369-75.

155. Amin, K., et al., *LDL induced association of anionic liposomes with cells and delivery of contents as shown by the increase in potency of liposome dependent drugs.* Pharm Res, 2001. **18**(7): p. 914-21.

156. Proulx, K.L., S.I. Woodard, and H.A. Dailey, *In situ conversion of coproporphyrinogen to heme by murine mitochondria: terminal steps of the heme biosynthetic pathway.* Protein Sci., 1993. **2**(7): p. 1092-8.

157. Ferreira, G.C., et al., *Organization of the terminal two enzymes of the heme biosynthetic pathway. Orientation of protoporphyrinogen oxidase and evidence for a membrane complex.* J. Biol. Chem., 1988. **263**(8).

158. Berg, K., et al., *Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol.* Cancer Res., 1999. **59**(6): p. 1180-83.

159. Hogset, A., et al., *Photochemical transfection: a new technology for light-induced, site-directed gene delivery.* Hum. Gene Ther., 2000. **11**(6): p. 869-80.

160. Selbo, P.K., et al., *Photochemical internalisation: a novel drug delivery system.* Tumour Biol., 2002. **23**(2): p. 103-12.

161. Berg, K., et al., *Photochemical internalization (PCI)--a novel technology for release of macromolecules from endocytic vesicles.* Oftalmologia., 2003. **56**(1): p. 67-71.

162. Prasmickaite, L., et al., *Role of endosomes in gene transfection mediated by photochemical internalisation (PCI).* J. Gene Med., 2000. **2**(6): p. 477-88.

163. Selbo, P.K., et al., *Release of gelonin from endosomes and lysosomes to cytosol by photochemical internalization.* Biochim. Biophys. Acta., 2000. **1475**(3): p. 307-13.

164. Selbo, P.K., et al., *5-Aminolevulinic acid-based photochemical internalization of the immunotoxin MOC31-gelonin generates synergistic cytotoxic effects in vitro.* Photochem. Photobiol., 2001. **74**(2): p. 303-10.

165. Hogset, A., et al., *Light-induced adenovirus gene transfer, an efficient and specific gene delivery technology for cancer gene therapy.* Cancer Gene Ther., 2002. **9**(4): p. 365-71.

166. Hogset, A., et al., *Photochemical transfection: a technology for efficient light-directed gene delivery.* Somat. Cell. Mol. Genet., 2002. **27**(1-6): p. 97-113.

167. Folini, M., et al., *Photochemical internalization of a peptide nucleic acid targeting the catalytic subunit of human telomerase.* Cancer Res., 2003. **63**(13): p. 3490-3.

168. Prasmickaite, L., A. Hogset, and K. Berg, *Evaluation of different photosensitizers for use in photochemical gene transfection.* Photochem. Photobiol., 2001. **79**(4): p. 388-95.

169. Prasmickaite, L., A. Hogset, and K. Berg, *The role of the cell cycle on the efficiency of photochemical gene transfection.* Biochim. Biophys. Acta., 2002. **1570**(3): p. 210-18.

170. Wahren, B. and M. Brytting, *DNA increases the potency of vaccination against infectious diseases.* Curr Opin Chem Biol, 1997. **1**(2): p. 183-9.

171. Rodiguin, N.M. and E.N. Rodiguina, *Consecutive chemical reactions, D.*Van Nostrand Company,Princeton, New Jersey.