

## Sommaire

**Avant propos** ..... 7

**Foreword**..... 9

### **INTRODUCTION**

**1 La membrane**..... 13

1.1 Composition ..... 13

1.1.1 Les phosphoglycérides et sphingolipides ..... 13

1.1.2 Le cholestérol ..... 15

1.1.3 Les Protéines ..... 15

1.2 Fluidité membranaire ..... 17

1.2.1 Température de transition ..... 18

1.2.2 Fluidité, viscosité et microviscosité ..... 19

1.2.3 Détermination de la microviscosité membranaire par EPR ..... 21

1.3 Formation de domaines ..... 22

1.3.1 Phase liquide ordonnée  $l_0$ ..... 24

**2 La cellule et ses organites**..... 27

2.1 Le noyau ..... 27

2.2 Le Réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi..... 28

2.3 Les mitochondries ..... 29

2.4 La membrane plasmique ..... 30

2.4.1 Radeaux lipidiques..... 31

**3 Les liposomes**..... 33

3.1 Structure..... 33

3.2 Applications ..... 35

3.3 Caractérisation des liposomes..... 37

## Sommaire

---

3.4 Les liposomes dans ce travail .....	38
<b>4 Les cyclodextrines .....</b>	<b>39</b>
4.1 Historique .....	39
4.2 Structure.....	41
4.2.1 Les cyclodextrines naturelles .....	41
4.2.2 Les cyclodextrines modifiées.....	43
4.3 Les complexes hôtes-invités.....	45
4.3.1 Les complexes d'inclusions.....	45
4.3.2 Les complexes non inclusifs.....	47
4.3.3 Les agrégats .....	47
4.4 Applications .....	48
4.4.1 Pharmaceutique .....	48
4.4.2 Autre.....	50
4.5 Les cyclodextrines et la littérature : que reste-t-il à faire ? .....	51
<b>REFERENCES .....</b>	<b>53</b>

### **CHAPITRE I : Quantification of Randomly-methylated- $\beta$ -cyclodextrin effect**

#### ***on liposome : an ESR study***

<i>Introduction.....</i>	<i>67</i>
<i>Résumé des résultats .....</i>	<i>67</i>
<i>Conclusion.....</i>	<i>69</i>
<b>ARTICLE</b>	
<i>Abstract.....</i>	<i>70</i>
<i>Introduction.....</i>	<i>71</i>
<i>Materials and methods.....</i>	<i>72</i>
<i>Results and discussion.....</i>	<i>74</i>
<i>Conclusion.....</i>	<i>80</i>

---

<i>Acknowledgements</i> .....	81
<i>References</i> .....	81
<b>SUPPLEMENTARY DATA</b> .....	85

**CHAPITRE II : ESR technique for noninvasive way to quantify cyclodextrins effect*****on cell membranes***

<i>Introduction</i> .....	89
<i>Résumé des résultats</i> .....	89
<i>Conclusion</i> .....	91

**ARTICLE**

<i>Introduction</i> .....	93
<i>Materials and methods</i> .....	94
<i>Results and discussion</i> .....	97
<i>Conclusion</i> .....	103
<i>Acknowledgements</i> .....	103
<i>References</i> .....	103

**CHAPITRE III : Investigation of the interaction between cyclodextrin and*****DMPC liposomes: a small angle neutron scattering study.***

<i>Introduction</i> .....	109
<i>Résumé des résultats</i> .....	109
<i>Conclusion</i> .....	111

**ARTICLE**

<i>Abstract</i> .....	112
<i>Introduction</i> .....	113
<i>Materials and methods</i> .....	115

## Sommaire

---

<i>SANS data handling</i> .....	117
<i>Results and discussion</i> .....	124
<i>Conclusion</i> .....	132
<i>Aknowledgement</i> .....	133
<i>References</i> .....	134
<b>SUPPLEMENTARY DATA</b> .....	139

### **CHAPITRE IV : Small-Angle Neutron Scattering investigation on cholesterol-doped liposomes interacting with $\beta$ -cyclodextrin.**

<i>Introduction</i> .....	145
<i>Résumé des résultats</i> .....	145
<i>Conclusion</i> .....	147

#### ARTICLE

<i>Abstract</i> .....	148
<i>Introduction</i> .....	149
<i>Materials and methods</i> .....	151
<i>Results and discussion</i> .....	155
<i>Conclusion</i> .....	162
<i>Aknowledgement</i> .....	163
<i>References</i> .....	163

### **CHAPITRE V : An ESR, Mass spectrometry and fluorescence microscopy approach to study the stearic acid derivatives anchoring in cells.**

<i>Introduction</i> .....	169
<i>Résumé des résultats</i> .....	169
<i>Conclusion</i> .....	171

**ARTICLE**

*Abstract*.....172  
*Introduction*.....173  
*Materials and methods* .....174  
*Results and discussion* .....177  
*Conclusion* .....182  
*Aknowledgement*.....183  
*References*.....183

**CONCLUSIONS & PERSPECTIVES**

***Conclusions générales & perspectives*.....187**  
***General conclusions & perspectives*.....197**



Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques capables de former des complexes avec une large variété de molécules lipophiles. Cette propriété complexante leur a ouvert un vaste champ d'applications aussi bien dans le domaine pharmaceutique que cosmétique, alimentaire, chimique ou textile. Parmi ces cyclodextrines, il existe des  $\beta$ -cyclodextrines naturelles mais également des  $\beta$ -cyclodextrines méthylées décrites comme nouvelle classe de promoteur d'absorption efficace et non toxique. Ces cyclodextrines ont la particularité de posséder une cavité hydrophobe ayant une forte affinité pour les molécules de cholestérol. Cette propriété a largement été étudiée, et la littérature foisonne d'articles sur les  $\beta$ -cyclodextrines méthylées. Ces dernières années, les scientifiques se sont penchés sur leur action au sein des membranes cellulaires et plus particulièrement sur les radeaux lipidiques. Ces derniers sont des microdomaines membranaires riches en cholestérol, et intervenant dans la transduction de signaux cellulaires.

Pourtant, malgré les nombreux travaux recensés, rares sont ceux qui quantifient effectivement l'action d'une cyclodextrine au sein de systèmes membranaires cellulaires ou artificiels tels les liposomes. De plus, à notre connaissance seule l'extraction de cholestérol au sein des membranes a été mise en évidence. Et si une quantification effective se fait, elle nécessite un lourd protocole. En effet, extraire le cholestérol membranaire ou les radeaux lipidiques prend du temps. La quantification de l'extraction de phospholipides ou mieux encore de la possible extraction croisée cholestérol/phospholipide n'a, à notre connaissance, pas encore été réalisée.

C'est pourquoi ce travail se propose d'élaborer un protocole simple, rapide et efficace permettant de quantifier tout d'abord les effets des cyclodextrines sur des modèles membranaires tels les liposomes, et ensuite, *in vitro*, sur les membranes cellulaires. De plus, les mécanismes d'action d'une cyclodextrine au sein des liposomes seront déterminés à l'aide d'une modélisation des sections efficaces neutroniques. Les potentialités d'extraction de la molécule étudiée au sein des radeaux lipidiques seront abordées, ainsi que les problèmes d'agrégations des cyclodextrines.

Ce manuscrit s'articule dès lors en trois volets. Le premier est une introduction mettant en avant les acteurs principaux de cette thèse, à savoir : les membranes, les cellules, les liposomes et les cyclodextrines.

Le deuxième volet s'attache à la partie expérimentale. Il se compose de 5 chapitres, chaque chapitre étant un article publié ou en soumission.

- Les deux premiers chapitres mettront en évidence l'efficacité de la technique de résonance paramagnétique électronique (RPE) pour quantifier l'extraction du cholestérol au sein de liposomes et de membranes cellulaires et ce, *in vitro*. La formation de complexes ainsi que d'agrégats et leur évolution en fonction de la concentration en cyclodextrine seront également mise en lumière.
- Les chapitre 3 et 4 présenteront les mécanismes d'actions d'une cyclodextrine sur des liposomes (dopés ou non en cholestérol) grâce à la technique de diffusion de neutrons aux petits angles. Une modélisation des sections efficaces liposomales a été menée afin de calculer l'évolution de tous les paramètres structuraux de liposomes mis en contact avec une cyclodextrine (taille, polydispersité, épaisseur de la membrane, adsorption de la cyclodextrine sur la surface liposomale,..). L'extraction croisée cholestérol/phospholipide par la cyclodextrine sera quantifiée.
- Le dernier chapitre prouvera, grâce notamment à la technique de spectrométrie de masse et à des mesures en microscopie de fluorescence, que les sondes utilisées en RPE se logent au niveau de la membrane plasmique donnant ainsi des informations uniquement sur cette dernière et non sur les autres membranes composant une cellule.

Dans le troisième volet, nous présenterons une conclusion générale faisant le point sur l'ensemble des résultats expérimentaux et les perspectives offertes par notre travail.



Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides able to form complexes with a wide variety of lipophilic molecules. This complexing property opens them up for a large field of applications in pharmaceutical, cosmetic fields as well as in food, chemical or textile industry. Among the cyclodextrins, there are natural  $\beta$ -cyclodextrins but also methylated  $\beta$ -cyclodextrins described as a new class of efficient and non-toxic absorption promoter. These cyclodextrins have the particularity to possess an inner hydrophobic cavity with a high affinity with cholesterol molecules. This property has been extensively studied and literature abounds in articles on methylated  $\beta$ -cyclodextrins. In recent years, scientists have studied their action in cell membranes and specifically on lipid rafts. These last ones have been recognized as specialized cell-signaling microdomains where cholesterol appears to be one of the major components.

Yet despite the numerous reviewed studies, few scientists actually quantify the effect of a cyclodextrin in cell membranes or in membrane models such as liposomes. In addition, to the best of our knowledge, only the cholesterol extraction within the membranes has been focused on. And if an effective quantification is to be done, it requires a heavy protocol. Indeed, extracting membrane cholesterol and lipid rafts takes time. As far as we know, measurements of the extraction of phospholipids or better still of the possible competitive phospholipid removal, which is also of great importance, have not been carried out yet.

Therefore, this work proposes to develop a simple, fast and efficient protocol to quantify in a non-invasive way first, the effects of cyclodextrins on membrane models such as liposomes, and then directly on cell membranes (*in vitro*). In addition, the cyclodextrin mechanisms action in the liposomes will be determined using an appropriate modelling of the experimental neutron scattering cross sections. The impact of the cyclodextrin on lipid rafts will be also discussed as well as the problem of cyclodextrin aggregation.

This work is thus divided into three parts. The first is an introduction highlighting the main actors of this thesis, namely, the membranes, the cells, the liposomes and the cyclodextrins.

The second part will focus on the experimental results. It consists of five chapters, each being an article in press or in submission:

- The first two chapters will show the effectiveness of the electron paramagnetic resonance (EPR) technique to quantify the cholesterol extraction in liposomes and cell membranes in a non-invasive way. The formation of complexes, as well as aggregates, and their evolution in function of cyclodextrin concentration will also be highlighted.

- Chapter 3 and 4 will present the mechanisms of cyclodextrination on liposomes (doped or not with cholesterol) using the small angle neutron scattering technique. A liposomal model cross sections has been carried out to calculate the evolution of all the structural parameters of liposomes in contact with a cyclodextrin (size, polydispersity, membrane thickness, adsorption of the cyclodextrin on the surface of liposome,...). Extraction of cross-cholesterol / phospholipid by the cyclodextrin will also be quantified.

- The final chapter will show, thanks to the technique of mass spectrometry and fluorescence microscopy, that the probes used in EPR are located in the plasma membrane giving information only on the latter and not on the other cell membranes components.

In the third section, we will present a general conclusion taking into account all the experimental results and we will end with the perspectives opened by our work.

# INTRODUCTION

---



# 1 La membrane

## 1.1 Composition

L'architecture moléculaire d'une membrane est constituée essentiellement de lipides, de protéines et de glucides (1). Ces lipides sont divisés en trois classes : les phosphoglycérides - les plus abondants- accompagnés de sphingolipides et de cholestérol (2). Tous sont des molécules amphiphiles, ce qui, en grec, signifie qu'ils ont deux amours. Ils possèdent d'une part un groupement de tête polaire hydrophile et d'autre part une queue hydrophobe.

Pour satisfaire leur besoin contradictoire, les lipides peuvent s'orienter de façon à former une bicouche : les parties hydrophobes sont en vis-à-vis et les pôles sont en contact avec le milieu aqueux qui borde la cellule.

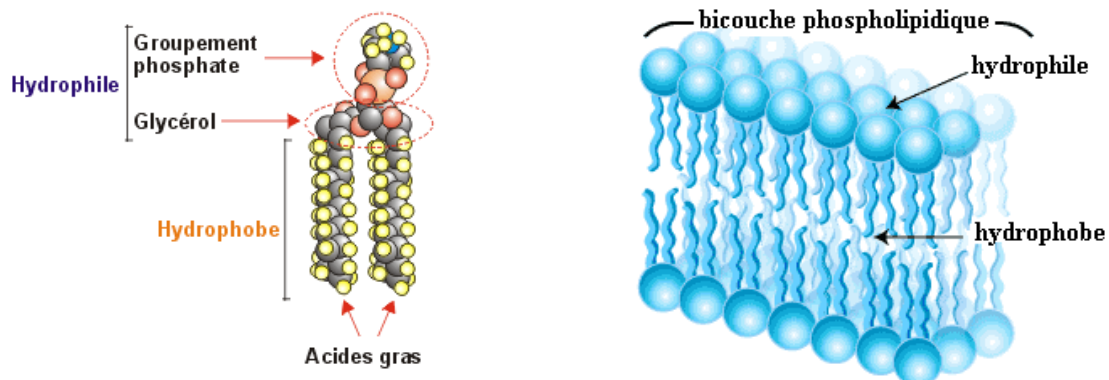


Figure 1: Structure d'un phospholipide et bicouche phospholipidique.

Les phospholipides sont des lipides qui possèdent au moins un groupement phosphate : les phosphoglycérides et la sphingomyéline (3).

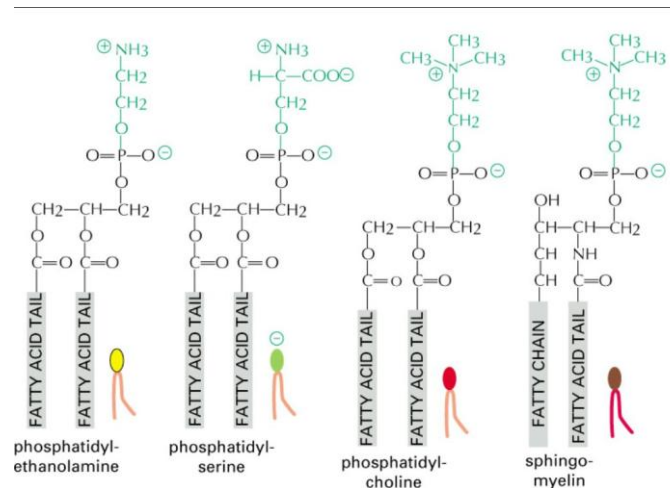
### 1.1.1 Les phosphoglycérides et sphingolipides

Un phospholipide type possède une tête polaire et deux queues hydrocarbonées hydrophobes. Ces queues peuvent être de longueurs variables (typiquement de 14 à 24 carbones) et alors qu'une branche est droite, l'autre possède une ou plusieurs doubles liaisons

## INTRODUCTION

*cis*. On dit alors que la branche est insaturée et chaque double liaison crée un coude dans la queue.

Les cellules eucaryotes possèdent une grande variété de phospholipides. Les principaux sont la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline (SM) représentées dans la figure 2 (1, 2).



**Figure 2 : Représentation des formules et des symboles des quatre phospholipides majeurs des membranes plasmiques.**

Les phosphoglycérides sont des dérivés du glycérol 3-phosphate et ils sont classés suivant la nature de leur groupement de tête. Le phosphoglycéride le plus abondant de la membrane plasmique est la phosphatidylcholine. Son groupement de tête est constitué, comme son nom l'indique, d'une choline, un alcool chargé positivement, estérifié avec un phosphate chargé négativement.

Les sphingolipides constituent une autre classe de lipides. Ils dérivent de la sphingosine, un alcool aminé avec une longue chaîne hydrocarbonée. Un acide gras à longue chaîne est attaché au groupement aminé de la sphingosine. La sphingomyéline est le sphingolipide le plus abondant et représente 10 à 20 % molaire des lipides membranaires (4). Sa structure globale ressemble fortement à la phosphatidylcholine dû à l'accroche d'une phosphocholine au groupement terminal de la sphingosine. Il en découle que la sphingomyéline est également un phospholipide. Bien que présents en plus faible quantité, les glycolipides font également partie de la famille des sphingolipides dont les groupements de tête polaire sont des sucres.

### 1.1.2 Le cholestérol

Le cholestérol est un lipide aux multiples facettes. Précurseur de nombreuses molécules tel la vitamine D<sub>3</sub> (intervenant dans la calcification des os), les hormones stéroïdes, les hormones sexuelles ou les acides biliaires (5), c'est surtout son rôle néfaste dans diverses maladies qui le rend tristement célèbre (thrombose, athérosclérose, maladie coronarienne).

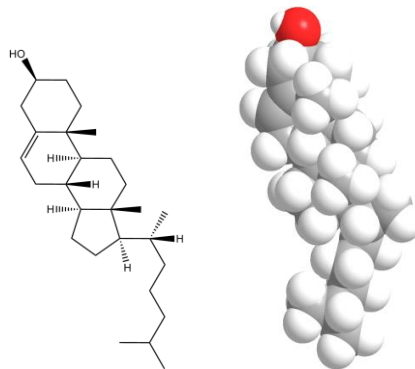


Figure 3 : Structure chimique du cholestérol.

Le cholestérol est un alcool de la famille des stérols. Cette molécule comprend quatre cycles carbonés (noyau cyclo – pentano – phénanthrénique), 8 carbones asymétriques et une fonction hydroxyle (voir figure 3). Tirant son nom du grec *chole-* (bile) et de *stereos* (solide), le cholestérol est présent dans la plupart des tissus des vertébrés, et en particulier le foie, le cerveau et la moelle épinière (6). C'est un composant majeur des membranes cellulaires. Son groupement hydroxyle et sa structure cyclique rigide lui confèrent un léger caractère amphiphile lui permettant de s'insérer dans la bicouche ainsi que de condenser les lipides en phase fluide et à l'inverse, de les espacer en phase « gel » (5, 7). En conséquence, la présence de cholestérol tient un rôle majeur dans la régulation de la fluidité membranaire ainsi que dans les propriétés structurales et dynamiques de la membrane (5). Cet aspect sera abordé dans le paragraphe 1.3.1 intitulé *phase liquide ordonnée*.

### 1.1.3 Les Protéines

Il existe un large nombre de protéines qui exercent diverses fonctions structurales et/ou fonctionnelles dans les membranes. En fait, elles jouent pour la plupart le premier rôle dans la vie cellulaire. L'étymologie même du mot nous le rappelle : protéine- du grec *protos-*

## INTRODUCTION

signifie premier et donc essentiel. Les protéines sont classées suivant trois catégories : les protéines intrinsèques, les protéines à ancrage lipidique et les protéines périphériques.

Les protéines intrinsèques, également appelées protéines transmembranaires, traversent la membrane. La plupart d'entre elles sont glycosylées et possèdent donc des chaînes sucrées essentiellement localisées dans les domaines extracytoplasmiques (8).

D'autres protéines sont liées via des liaisons covalentes à des phospholipides membranaires. Ces ancrages peuvent être transitoires ; l'ancre lipidique est réversiblement liée ou détachée de la protéine ce qui peut modifier ses affinités. La transduction des signaux chez les cellules eucaryotes est contrôlée de façon majeure par l'ancre lipidique (1). Un type d'ancrage peut par exemple se faire via les glycosylphosphatidylinositol, ou GPI (figure 4), qui est un groupe complexe présent uniquement dans les cellules eucaryotes.

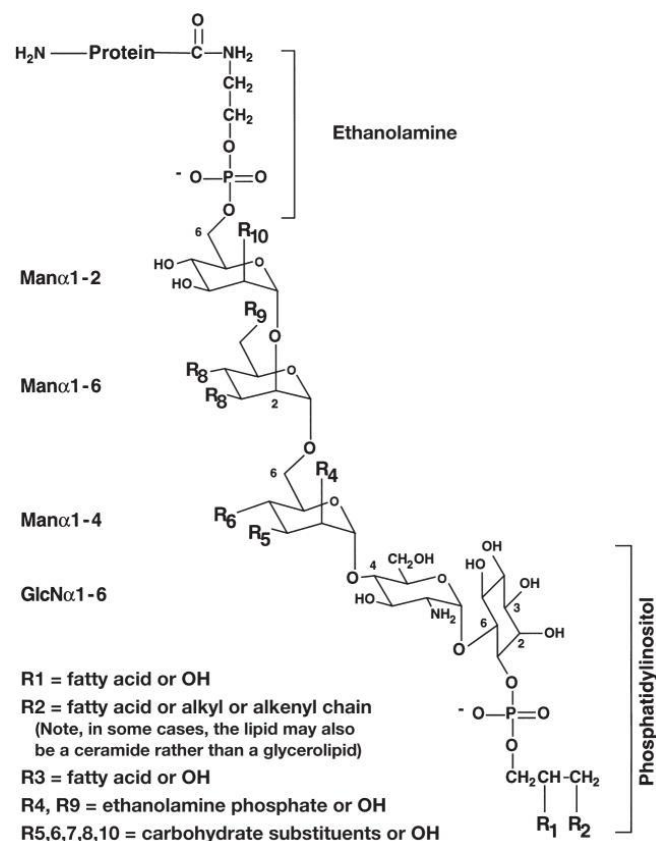


Figure 4 : Structure moléculaire d'une ancre GPI (9).



Les protéines périphériques quant à elles n'interagissent pas avec la partie hydrophobe de la membrane. Elles sont indirectement liées à la bicouche via les protéines intrinsèques ou directement par des interactions avec les têtes polaires des lipides.

## 1.2 Fluidité membranaire

Hautement dynamique, une membrane n'est pas une structure statique. Les lipides la constituant sont animés de divers mouvements et se réorganisent sans perdre les contacts qui satisfont leur attraction mutuelle ; la membrane est fluide. Les lipides interagissent les uns avec les autres via trois mécanismes différents : ils peuvent subir une flexion, une rotation et une diffusion latérale ou transversale (2, 8).

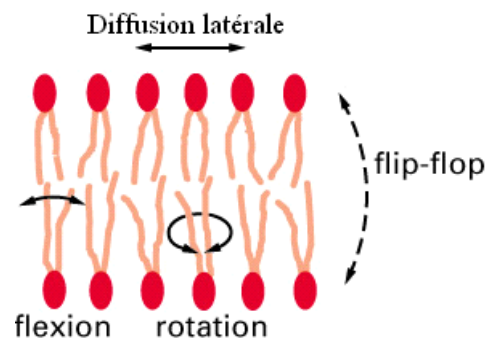


Figure 5 : Mouvements possibles des phospholipides dans une bicouche.

La diffusion transversale ou flip-flop est un mouvement qui prend du temps. Processus peu fréquent, il faut des heures, voire même des jours pour qu'un phospholipide migre d'un feuillet de la bicouche à l'autre (10-12).

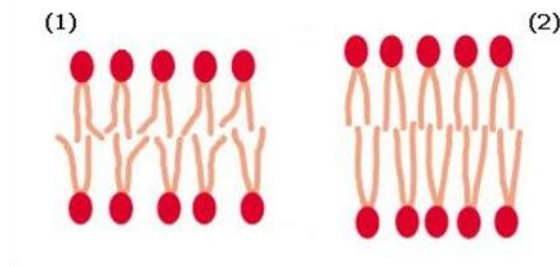
Les phospholipides préfèrent s'échanger leur place : la diffusion latérale est caractérisée par un coefficient de diffusion de l'ordre de  $10^{-7}$  à  $10^{-8}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  (13-15). En d'autres termes, un échange lipidique se fait  $10^7$  fois par seconde et un phospholipide diffuse de plusieurs micromètres en une seconde (à  $37^\circ\text{C}$ ). Il en découle que tel un fluide, la membrane est insensible à toute contrainte tangentielle (de cisaillement) puisque les molécules glissent librement les unes le long des autres.

## INTRODUCTION

---

Mais le mouvement le plus fréquent est la rotation définie par son temps de corrélation ( $\tau$ ). Ce dernier correspond au temps moyen pris par une molécule pour tourner d'un radian (16). Ainsi le phospholipide, tel un derviche, n'arrête pas de tourner. Il tourne autour de son axe qui, lui-même, tourne en délimitant un cône ( $10^{-10} < \tau < 10^{-9}$  s) (17). Même les liaisons carbone-carbone sont mises à contribution de ce phénomène et tournent avec un temps de corrélation de l'ordre de  $10^{-10}$  à  $10^{-11}$  s (17).

Enfin, le degré de saturation et la longueur des chaînes hydrocarbonées vont également influencer la fluidité membranaire (18, 19). Comme on peut le voir sur la figure 6, lorsque les queues hydrocarbonées sont insaturées, elles présentent des inflexions qui empêchent les molécules de s'entasser : la membrane est fluide. A l'inverse, à même température, lorsque les queues sont saturées, la membrane est plus visqueuse.



**Figure 6 : (1) Représentation d'une membrane fluide : les queues hydrocarbonées sont insaturées et présentent donc des inflexions. (2) Représentation d'une membrane visqueuse : les queues hydrocarbonées sont saturées.**

On peut également noter que la membrane dans son entièreté est capable d'onduler et que ce mouvement phospholipidique collectif a un temps caractéristique de l'ordre de la milliseconde à la microseconde (4, 15).

### 1.2.1 Température de transition

La température joue un rôle important dans la dynamique moléculaire de la membrane. En effet, chaque phospholipide constituant la membrane possède une température de transition ( $T_M$ ). En dessous de cette température, la membrane est dans un état de « gel » structuré et rigide (phase  $L_\beta$ ), au-dessus, dans un état plus fluide et donc moins ordonné (phase  $L_\alpha$ ) (20-22).

Au-dessus de la température de transition, la mobilité des phospholipides et la faculté d'incorporation de la membrane sont augmentées. Les molécules tel le cholestérol vont alors pouvoir s'insérer dans la membrane et interférer avec le glissement des chaînes hydrophobes (2, 5, 17, 23, 24).

De manière générale la température de transition d'un phospholipide va varier en fonction de la longueur et du degré d'insaturation de ses chaînes d'acide gras ainsi que de la nature de sa tête polaire (25). La  $T_M$  peut également dépendre du milieu aqueux dans lequel le phospholipide baigne (26). Les plus hautes températures de transition sont ainsi associées aux phospholipides ayant les plus longues chaînes d'acides gras (augmentation des interactions hydrophobes) et un faible degré d'insaturation (les chaînes sont plus proches les unes des autres).

**Tableau 1**

Type de phospholipides :	A	B	C	D	$T_M$ (°C)
Dioleoylphosphatidylcholine	DOPC	18	1	0	-22
Dimyristoylphosphatidylcholine	DMPC	14	0	0	23
Dipalmitoylphosphatidylcholine	DPPC	16	0	0	41.4
Dipalmitoylphosphatidylsérine	DPPS	16	0	-1	51
Dipalmitoylphosphatidyléthanolamine	DPPE	16	0	0	63

Colonne B : nombre de carbones dans les chaînes carbonées ; Colonne C : nombre de doubles liaisons dans les chaînes carbonées ; Colonne D : charge de la tête polaire à pH physiologique. (27)

### 1.2.2 Fluidité, viscosité et microviscosité

La fluidité est le reflet des possibilités de mouvement des constituants de la membrane (lipides et protéines) dans le plan de la membrane (28, 29). Tout changement dans l'architecture moléculaire de la membrane va engendrer une modification d'activité membranaire et par conséquent de sa fluidité. Ces changements peuvent être induits par une fluctuation de température (21), un régime alimentaire (30), ou l'introduction de drogues et d'agents chimiques (29, 31, 32). L'étude de ce paramètre physiologique qu'est la fluidité est essentielle pour une meilleure compréhension des membranes puisque ce sont les différents mouvements lipidiques qui permettent aux protéines d'interagir (19). Il est important de noter

## INTRODUCTION

---

que les mouvements latéraux, flip-flop ou autre, définis au point précédent, sont des mouvements anisotropiques et ne peuvent pas être considérés en termes de viscosité. En effet, la viscosité est la caractéristique d'une résistance isotropique à un écoulement (29).

Plusieurs techniques sont utilisées pour accéder aux paramètres liés à la fluidité membranaire. La technique la plus couramment utilisée pour déterminer les coefficients de diffusion des lipides dans le plan de la membrane est une méthode de fluorescence : la méthode de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP) (2).

La polarisation de fluorescence par sonde a également largement été utilisée. La sonde la plus connue étant la diphénylhexatriène (DPH) (33).

De nombreuses techniques physiques ont également été appliquées afin d'obtenir des informations sur la structure ou la dynamique moléculaire. Parmi celles-ci, nous pouvons citer par exemple la microscopie électronique et la diffraction des rayons X.

Dans les années 70, une autre technique spectroscopique a émergé et n'a cessé de prouver son efficacité : la résonance paramagnétique électronique (EPR) associée à la méthode de spin labelling (34-39). Cette technique se base sur l'incorporation d'une molécule paramagnétique au sein d'une bicouche membranaire. Le spectre RPE de cette molécule est sensible au degré d'ordre de son environnement proche et toute fluctuation de son spectre caractérise une modification du microenvironnement de la sonde. On ne parle plus dans ce cas de fluidité mais de microviscosité membranaire, qui est définie comme suit : « la microviscosité en un point du microenvironnement étudié est la viscosité d'une solution homogène dans laquelle le marqueur de spin utilisé présente le même spectre EPR que celui qu'il a dans le microenvironnement » (17, 40, 41). Au cours des années, la spectroscopie EPR a été développée pour mieux étudier la membrane et plus récemment les différentes phases lipidiques qui la composent (42).

### 1.2.3 Détermination de la microviscosité membranaire par EPR

L'EPR associée à la méthode de spin labelling est une des techniques principales de cette thèse. C'est pourquoi nous nous proposons d'en donner un bref aperçu.

Afin de déterminer la microviscosité membranaire, deux types de sondes ont été utilisées. Ce sont des acides doxylstéariques (n-DSA) possédant leur électron non apparié soit au niveau du 5<sup>ème</sup> carbone (5-DSA) soit au niveau du 16<sup>ème</sup> carbone (16-DSA), comme le montre la figure 7. Ces marqueurs de spins sont des molécules comportant un radical libre stable dans les conditions physico-chimiques habituellement utilisées pour l'étude de système biologique.

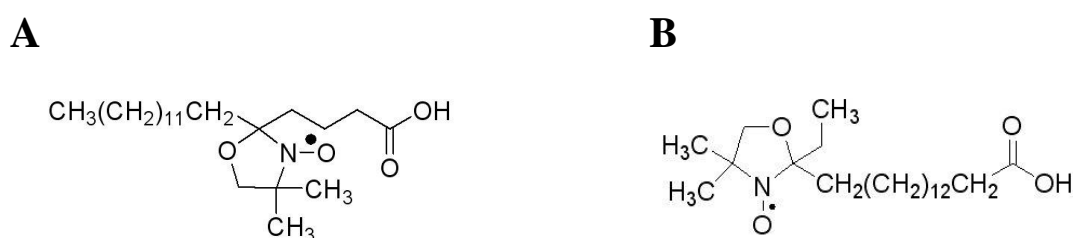


Figure 7 : Structure du (A) 5- et (B) 16-DSA.

Rappelons que l'EPR, en mode stationnaire, permet la mise en évidence d'espèces paramagnétiques présentes dans un échantillon, à condition que leur durée de vie soit assez longue. C'est pourquoi les sondes utilisées possèdent un radical nitroxyde comportant un électron célibataire. Cet électron est localisé sur une orbitale 2pz et est très sensible à l'anisotropie de l'environnement. Ainsi, si un échantillon est très fluide, le spectre RPE des sondes présentera trois raies fines (c'est le cas pour des solutions homogènes). Par contre, si le mouvement du radical est réduit, le spectre sera fortement déformé (i.e. bicouche liposomale, cellules). Ces changements sont quantifiés en termes de paramètre d'ordre ( $S$ ) et de temps de corrélation ( $\tau_c$ ) (43). Notons que le spectre EPR des sondes utilisées comporte trois raies caractéristiques car l'électron non apparié est localisé près de l'atome d'azote. Comme ce dernier possède un spin nucléaire égal à 1, il existera trois valeurs distinctes du champ d'induction magnétique pour lesquelles le système d'électron non apparié rentrera en résonance.

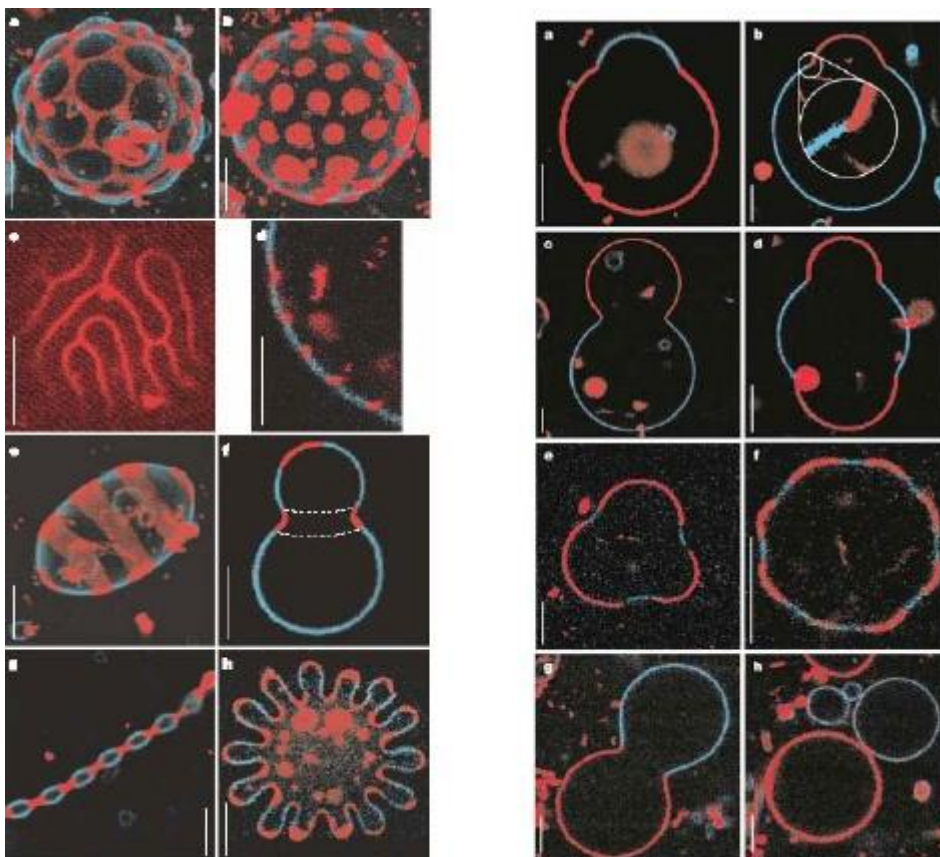
La figure 7 montre que le radical possédant l'électron célibataire est fixé à différents endroits de la chaîne hydrocarbonée : des renseignements sur la capacité de mouvement des sondes à différentes profondeurs au sein des bicouches sont donc obtenus (30). On parlera alors de microviscosité comme défini au point 1.2.1. Notons que c'est dans le travail de M. Bhari, que les grandeurs directement mesurées sur le spectre EPR (c'est-à-dire  $S$  et  $\tau_c$ ) ont été reliées à la microviscosité et ce, grâce à des courbes standard obtenues à l'aide de solution ethanol/glycerol (17, 41).

En raison de la complexité d'une membrane, un spectre EPR de sondes intégrées dans une bicouche est composé d'une surimposition de plusieurs composantes spectrales. Ces dernières années, la séparation de phase au sein des membranes biologiques a été prouvée, et on peut admettre que chaque composante du spectre se réfère à une zone sélectionnée de la membrane (voir 1.3 et 2.4). C'est pourquoi, nous nous sommes associée à l'équipe de recherche du laboratoire de biophysique du Jožef Stefan Institute situé à Ljubljana (et plus particulièrement à son centre de recherche en EPR), qui développe un programme de simulation de spectres tenant compte de cette particularité. Cette association nous a permis une analyse spectrale plus fine que par le passé (voir chapitre I et II).

### **1.3 Formation de domaines**

La miscibilité ou coexistence de plusieurs phases a toujours suscité de l'intérêt chez les physiciens et les chimistes. Déjà en 1939, Y. Oyama montrait dans sa célèbre expérience que des billes de tailles différentes ne se mélangeaient pas de manière homogène (44). H. Mc Connell montrait quant à lui la non miscibilité de deux lipides différents ou la coexistence de plusieurs phases au sein d'une même membrane (45, 46). Ce n'est pourtant que vers la fin des années 90 que les biologistes ont réellement compris l'impact de ces recherches grâce à la découverte des radeaux lipidiques par l'équipe pluridisciplinaire de K. Simons (47). Des avancements notables dans ces études ont été permis par différentes techniques telles que la microscopie électronique et de fluorescence ou la résonance paramagnétique électronique (48).

Ainsi, à ce jour, il est clairement admis que dans une membrane les lipides ne sont pas mélangés de manière aléatoire et statistique mais forment des domaines. Le terme domaine décrit la formation de domaines latéraux dans une membrane composée d'un, ou plusieurs composants lipidiques (49). L'origine de la formation de ces domaines peut être diverse. Un changement de température d'une membrane composée de deux types de phospholipides, dont la température de diffusion diffère grandement, va faire apparaître des domaines : une membrane fluide avec des domaines rigides (48). Un peu comme un glaçon flottant dans un verre de whisky.



**Figure 8 : Images de fluorescence montrant la coexistence de deux phases (Lo en rouge et La en bleu) dans des liposomes formés d'un mélange sphingomyéline, DOPC et cholestérol. L'échelle est de 5  $\mu$ m. Les images ont été obtenues côté gauche à : a, b et f 25°C ; c et d 40°C ; e 30 °C ; g 44°C ; h 50°C, côté droit : 25 °C excepté pour les figures g & h qui se sont respectivement réalisées à 30°C et 35°C (51).**

Une variation de la structure lipidique entraîne également la formation de domaines : les lipides présentant une longueur de chaîne compatible se redistribuent entre eux. L'équipe de Knoll a ainsi montré que pour qu'il y ait un mésappariement de chaînes hydrophobes il

fallait que la longueur des chaînes d'acides gras de deux lipides en présence varie d'au moins quatre groupements  $\text{CH}_2$  (50).

La partition latérale des lipides peut résulter de la présence de lipides ayant différents types de tête polaire. Par exemple, si la charge des têtes polaires de deux lipides en présence est différente cela pourrait induire une diminution des forces attractives des deux têtes voisines entraînant une ségrégation des lipides (26).

Mais un acteur de taille dans la formation de domaines est la molécule de cholestérol. Unique par son architecture en anneaux rigides et par sa longueur (17.5 Å), le cholestérol est en effet plus petit que la majorité des lipides autres que les stérols (52). Son incorporation au sein d'une membrane va entraîner l'apparition d'une nouvelle phase appelée la phase liquide ordonnée.

### 1.3.1 Phase liquide ordonnée $\text{I}_0$

Comme expliqué au point 1.2.1, une membrane formée d'un type de lipide peut se trouver dans 2 phases différentes :

- Une phase ordonnée gel ( $\text{L}_\beta$ ) où les chaînes carbonées des lipides sont dans une conformation *-trans* conduisant à une structure compacte et où les interactions de Van der Waals entre les chaînes d'acides gras sont optimisées (26). Cette phase est obtenue à basse température et la diffusion translationnelle des lipides est faible (53).
- Une phase fluide ou liquide désordonnée ( $\text{L}_\alpha$ ) dans laquelle la diffusion translationnelle des lipides est élevée (26). Cette phase est obtenue à plus haute température, et l'aire occupée par molécule est de l'ordre de  $0.65 \text{ nm}^2$  (54).

Lorsque deux types de lipides composent une membrane une coexistence de phase  $\text{L}_\alpha$  et  $\text{L}_\beta$  peut apparaître. Le diagramme de phase Dielaidoylphosphatidylcholine (DEPC)/Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) illustre cette cohabitation de phases (figure 9). En effet, entre 10 et 23°C une cohabitation  $\text{L}_\alpha$  et  $\text{L}_\beta$  apparaît pour différents pourcentages de



DMPC. En dessous de 10°C, la membrane quel que soit le pourcentage de DMPC incorporé, est sous la forme gel, alors qu'au dessus de 23°C elle est fluide.

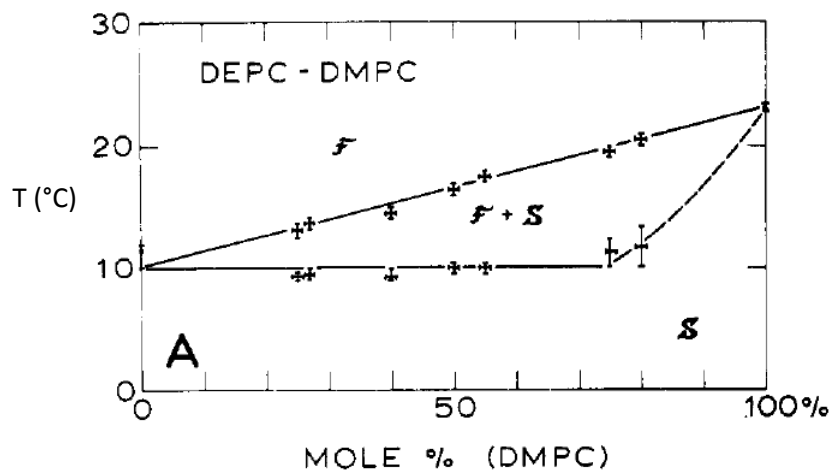


Figure 9 : Diagramme de phase d'un mélange DEPC-DMPC déterminé par McConnell (55). *F* et *S* symbolisant respectivement une phase fluide et solide.

Lorsque du cholestérol est ajouté à une membrane, une nouvelle phase apparaît : la phase ordonnée liquide. Cette phase, nommée également  $L_0$ , contient des lipides ordonnés, tout comme en  $L_\beta$ , mais présentant une diffusion rotationnelle et latérale du même ordre que dans la phase  $L_\alpha$  et ce, à des températures physiologiques (56).

En d'autres termes, le cholestérol, grâce à sa structure moléculaire plane et rigide, contraint les lipides à s'ordonner et en conséquence diminue le volume moléculaire occupé par les chaînes acyles des lipides en phase  $L_\alpha$  (57). Au contraire, lorsque les lipides sont dans une phase  $L_\beta$ , le cholestérol va rompre l'ordre translationnel cristallin mais sans perturber significativement l'ordre conformationnel, comme montré sur la figure 10.

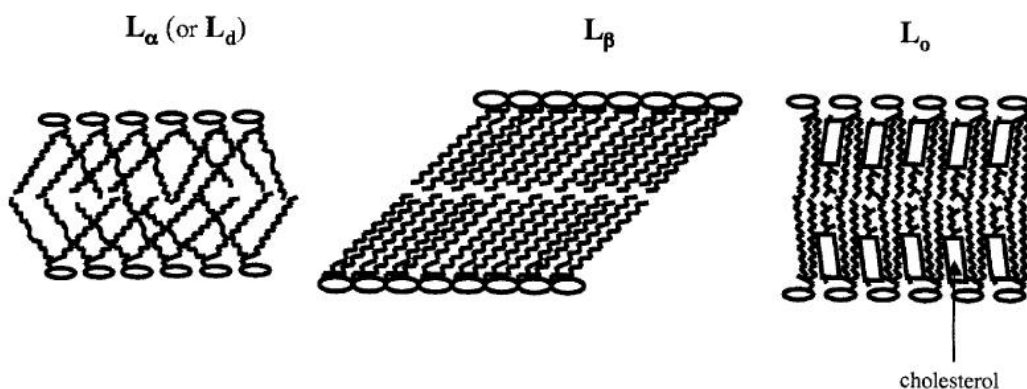


Figure 10: Différentes phases adoptées par une bicouche lipidique (56).

## INTRODUCTION

La figure 11 illustre le diagramme de phase DMPC/cholestérol déterminé par P. Almeida (57) ainsi que l'apparition de la phase  $L_0$ . On peut voir qu'au-dessus de 30 mol% de cholestérol, seule la phase  $L_0$  est adoptée dans la membrane, quelle que soit la température. En deçà de 10 mol%, la membrane est dans une phase liquide désordonnée au-dessus de la température de transition de la molécule de DMPC, et existe dans une phase ordonnée gel en dessous de cette même température. Une coexistence de phases apparaît entre 10 mol% et 30 mol% : liquide désordonné / liquide ordonné au-delà de 23°C et liquide gel / liquide ordonné en dessous de 23°C (58, 59).

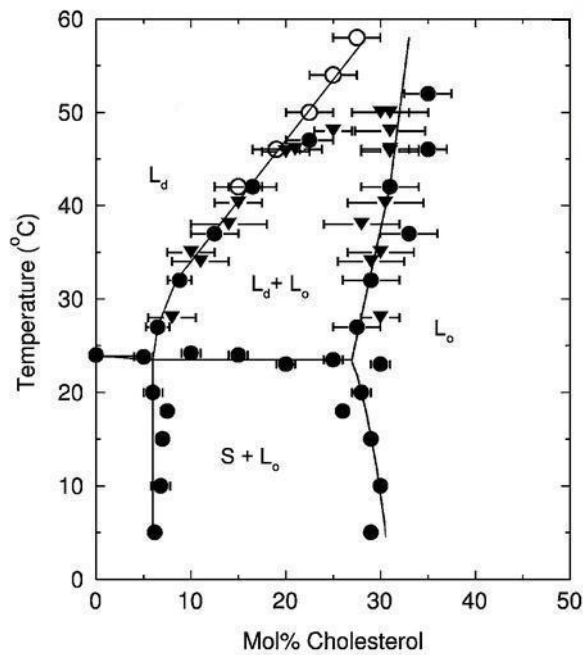


Figure 11: Diagramme de phase d'un mélange DMPC/cholestérol déterminé par P. Almeida et al. (57).

## 2 La cellule et ses organites

Une cellule type contient une multitude de membranes chacune ayant une fonction caractéristique. C'est la composition lipidique et protéique de la ou les membrane(s) qui entourent l'organite qui dicte sa fonction cellulaire (2). Dans cette section, nous introduirons plus particulièrement les organites de la cellule eucaryote. Cette cellule a la particularité de posséder en position centrale un noyau. Tel un fruit, ce dernier est en relation avec la pulpe (nommé cytoplasme), et le tout est maintenu par une membrane baptisée membrane plasmique. La charpente cellulaire qui occupe le cytoplasme sous la forme d'un réseau d'éléments fibreux s'appelle le cytosquelette. Il sert également de support au déplacement direct des organites (8).

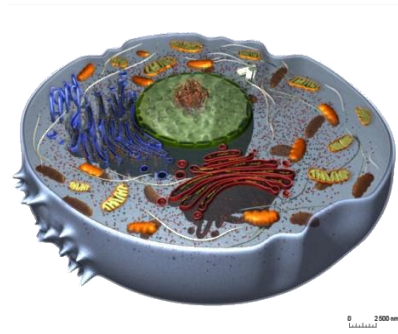


Figure 12: schéma d'une cellule eucaryote.

Sous le mot cytoplasme se cache l'ensemble organites - cytosol. Le cytosol est une gelée formée à 85% d'eau et son pH est égal à 7 (8). Les organites, comme le montre la figure ci-dessus, nagent dans ce liquide visqueux.

### 2.1 Le noyau

Le noyau possède la majorité du matériel génétique cellulaire. Il peut être assimilé à une centrale de contrôle et il a deux fonctions principales : il stocke l'information nécessaire à la division cellulaire et il contrôle les réactions chimiques du cytoplasme comme par exemple la synthèse des protéines. Le noyau est le plus gros organite des cellules animales ; il occupe en moyenne 10 % du volume total de la cellule (60).

## INTRODUCTION

Le transport de matériel du noyau vers le cytoplasme (et inversement) se fait à travers des pores (61). Ces derniers apparaissent grâce à la fusion des deux membranes qui enveloppent le noyau. Il faut noter que les membranes nucléaires, formées d'une double couche lipidique, sont richement tapissées de protéines et de ribosomes. La composition de l'enveloppe nucléaire est à peu près la suivante : 30% de lipides et 70% de protéines. Le cholestérol ainsi que les triglycérides représentent 10% des lipides totaux (62).

### 2.2 Le Réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi

Le réticulum endoplasmique (RE) est un réseau de structures membranaires divisé en deux parties: le réticulum endoplasmique rugueux (RER) qui est en continuité directe avec la membrane externe du noyau, et le réticulum endoplasmique lisse (REL). Avec l'appareil de Golgi, le RE peut être assimilé à une industrie exportatrice. Mais son rôle ne se limite pas au seul transport des molécules. Tapissé de ribosomes, le RER est un lieu de synthèse de protéines. Quant au REL, il synthétise les lipides. Pourtant source de fabrication de cholestérol, la membrane du RE en est pauvre : elle ne posséderait que 0.5 à 1 % du cholestérol cellulaire (63).

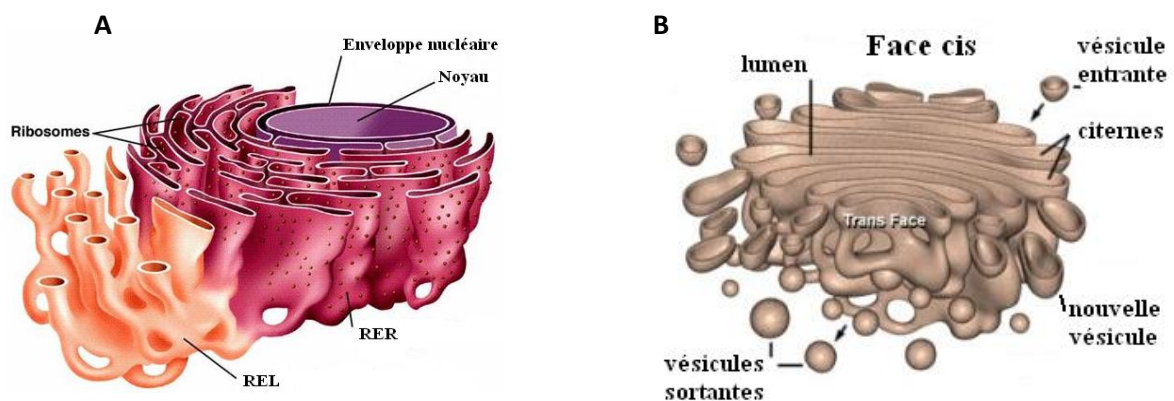


Figure 13 : Schéma du réticulum endoplasmique (A) et de l'appareil de Golgi (B).

L'appareil de Golgi est constitué d'un empilement d'environ une demi-douzaine de citernes membranaires pressées les unes contre les autres (figure 13). Une fois les protéines synthétisées, elles migrent, entre autres, du RER vers la face *cis* de l'appareil de Golgi (face proche du RE). Le transport se réalise dans des vésicules ayant bourgeonné à partir du RER.

Une fois arrivées à destination, les vésicules fusionnent avec la membrane de l'appareil de Golgi et larguent les protéines. Ces dernières subissent des modifications durant leur voyage depuis la face *cis* vers la face *trans* de l'appareil de Golgi afin d'être finalement larguées à travers de nouvelles vésicules vers leur destination finale (voir figure 13). Il faut noter que la composition même des membranes de l'appareil de Golgi change depuis la face *cis* vers la face *trans* ; elles s'enrichissent de plus en plus en cholestérol (63). L'appareil de Golgi ne sert pas uniquement de site de maturation pour les protéines, il est le site le plus important de transport lipidique à travers la cellule. Les sphingolipides y sont synthétisés et c'est ce qui explique pourquoi il y a six fois plus de sphingomyéline dans l'appareil de Golgi que dans le RE (64). Une étude récente aurait également montré que l'appareil de Golgi protégerait la cellule de l'apoptose grâce à des protéines type GAAP (Golgi anti-apoptotic protein) (65).

Tableau 2

Origine	Composition (% mol)			
	PC	PE+PS	SM	Cholestérol
Membrane plasmique (érythrocytes humains)	21	29	21	26
Membrane de myéline (neurones humains)	16	37	13	34
Membrane du réticulum endoplasmique (rat)	54	26	5	7
Membrane du Golgi (rat)	45	20	13	13
Membrane mitochondriale interne (rat)	45	45	2	7
Membrane mitochondriale externe (rat)	34	46	2	11

PC = phosphatidylcholine ; PE = phosphatidylsérine ; PS = phosphatidylsérine ; SM = sphingomyéline

Principaux composants de quelques biomembranes (2).

### 2.3 Les mitochondries

La cellule est un organisme vivant. Elle bouge, elle synthétise, elle se divise, elle assemble et modifie des produits à travers tout un labyrinthe de membranes. Tout ceci ne se fait pas sans dépense d'énergie. Ainsi la mitochondrie joue le rôle de « centrale énergétique » cellulaire (2, 64). Elle a une taille de l'ordre du micron et comme le noyau elle possède une double membrane. La membrane externe est constituée pour 40% de lipides et 60% de protéines (2, 64). Le cholestérol y est en très faible proportion (comme dans le RE). Même si

## INTRODUCTION

---

ils existent en d'autres quantités, les phospholipides de la membrane externe sont du même type que ceux du RE : la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine qui sont des phospholipides à chaînes d'acides gras très insaturés. La particularité de la membrane mitochondriale externe est sa richesse en *porines* ; des protéines qui rendent la membrane perméable à des molécules pouvant aller jusque 5000 Daltons (66).

La membrane mitochondriale interne quant à elle est beaucoup moins perméable et contient un grand pourcentage de protéines (environ 80% pour 20% de lipides) (64). Les lipides principaux sont les cardiolipides (20% du total lipidique) ainsi que la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine. Grâce aux plis ou crêtes qui se forment à l'intérieur de la matrice, la surface de cette membrane augmente et est en moyenne cinq fois plus grande que celle de la membrane externe (67).

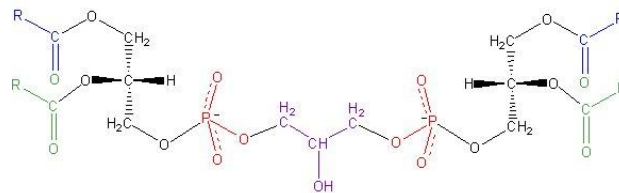


Figure 14 : Structure des cardiolipides (glycérol bisphosphatidyle).

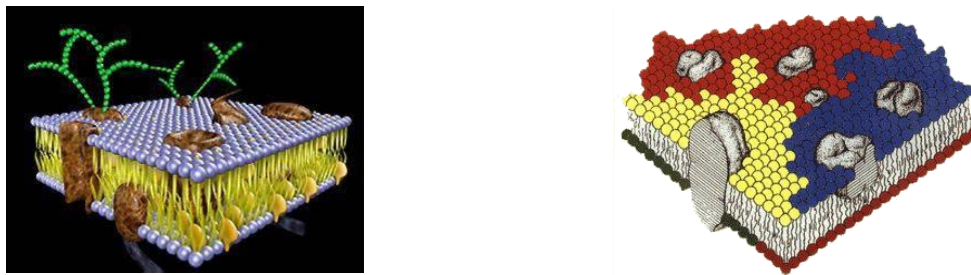
### 2.4 La membrane plasmique

La membrane plasmique est une interface entre le milieu intracellulaire et l'environnement extérieur. Mais son rôle ne se limite pas à une simple fonction de partition. Complexe, dynamique, elle est l'un des éléments les plus essentiels dans la vie cellulaire. Active dans de nombreux domaines tels que par exemple la locomotion cellulaire, l'exclusion de certains ions toxiques, l'interaction avec des molécules ou des cellules voisines (67), la membrane plasmique est souvent la première touchée lors de nombreuses maladies humaines (17, 31, 68).

A l'intérieur de cette membrane, la plupart des lipides sont généralement présents dans les feuilletts; ses composants principaux sont cependant les phosphoglycérides, les

sphingolipides et le cholestérol (2). Tous les lipides composant cette biomembrane s'organisent en une bicouche asymétrique (2). Par exemple, les deux monocouches ont une charge différente. En effet, la plupart des molécules lipidiques se terminant par une choline  $((\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})$  se localisent essentiellement dans la moitié externe de la double couche lipidique et les phosphatidylsérines (possédant une charge négative) se trouvent surtout dans la partie interne de la membrane (2, 67). Enfin, une nouvelle brisure de symétrie découle de la localisation des glucides (ancrés aux protéines membranaires) localisés uniquement dans le feuillet externe de la bicouche de la membrane plasmique (voir figure 15)(2). Le cholestérol joue également un rôle important dans cette brisure de symétrie membranaire. Elle dépend de l'affinité du cholestérol pour certains types de lipides et il a également été mis en évidence une répartition asymétrique dans les différents feuillettes dépendant du type cellulaire (23, 69).

### 2.4.1 Radeaux lipidiques



**Figure 15 : Schéma de la membrane plasmique. (A) modèle de la mosaïque fluide. (B) Modèle des lipids rafts.**

Pendant plus de 30 ans, la membrane plasmique a été perçue comme une mer de phospholipides où les protéines flottaient tels des icebergs : c'était le modèle de Singer et Nicolson (70). Dans les années 50, les cavéoles, invaginations membranaires riches en cholestérol et de taille ~ 100 nm (69, 71), ont été mises en évidence. Ces micro-domaines riches en protéine type cavéoline interviennent entre autres dans les mécanismes d'endocytose (26). Pourtant, même si ces domaines spécifiques avaient déjà été découverts, ce n'est qu'avec l'article de K. Simons et E. Ikonen à la fin des années 90, que l'hypothèse des radeaux lipidiques (lipid rafts) a été posée (47). La membrane n'est plus une mer désordonnée mais ordonnée, le modèle de Singer et Nicolson doit être abandonné.

## INTRODUCTION

---

Les radeaux lipidiques sont des micros-domaines ordonnés résistants à l'extraction par détergent non-ionique (i.e. Triton X-100) et riches en cholestérol et sphingolipides. Petits en taille (de 10 à 200 nm selon la technique utilisée) (72), il en existe une multitude dépendant du type de protéine qu'ils contiennent. Malgré leur taille en dessous de la résolution du microscope, ils peuvent, mis bout à bout, représenter la moitié de la membrane plasmique (69). Le cholestérol joue un rôle majeur dans leurs formations. Grâce à sa structure particulière, il aime s'apparier avec les chaînes acyles des lipides et plus particulièrement avec les sphingolipides à longue chaîne saturée. Une liaison hydrogène se forme entre la céramide des sphingolipides et le groupement hydroxyl du cholestérol, ce qui induit également une ségrégation des glycosphingolipides et du cholestérol en micro-domaines latéraux (73). Comme expliqué au point 1.3.1, le cholestérol augmente le degré d'ordre des chaînes acyles et diminue l'aire par molécule. Comme une sorte de « colle », le cholestérol rigidifie les radeaux lipidiques sans perturber la diffusion latérale des autres composants membranaires. La première protéine type trouvée dans les radeaux lipidiques de grande taille est la protéine à ancre GPI (voir figure 4) (47).

Une hypothèse posée pour expliquer la différence de taille trouvée pour les différents radeaux lipidiques est la suivante: sans stimulus, les radeaux - dépendants des protéines auxquels ils sont associés - sont minuscules (de l'ordre de quelques molécules) et leur temps de vie est de l'ordre de la milliseconde (39). Une fois la cellule stimulée (i.e ; en activant la protéine GPI) le radeau contenant la susdite protéine va diffuser le long de la membrane (temps de vie de l'ordre de la minute) entraînant dans son sillage une coalescence de petits rafts et donc la formation d'un plus grand domaine où les différentes protéines peuvent interagir (39, 74). Ces domaines sont le siège d'une grande variété de processus cellulaires encore mal connus mais dont le plus important semble être la transduction de signaux (69, 72).

Le cholestérol joue un rôle capital dans le maintien des radeaux lipidiques. Une manière détournée d'étudier ces micro-domaines est d'en modifier la composition (dont le pourcentage en cholestérol). C'est de cette manière que les scientifiques ont découvert que ces micro-domaines sont impliqués dans une quantité impressionnante de maladies (i.e ; Alzheimer, HIV-1, malaria...) (74). Les radeaux lipidiques jouent un rôle central dans de nombreux processus cellulaires tels que par exemple les signaux de transduction (75) ou la



croissance cellulaire (76). Ainsi, changer la composition de ces micro-domaines entraîne une modification des signaux de transductions ce qui induit diverses maladies. Les virus, bactéries, parasites ou d'autres groupes pathogènes, prennent aussi pour cible les radeaux lipidiques pour infecter la cellule.

### 3 Les liposomes

#### 3.1 Structure

Les lipides s'assemblent dans un milieu aqueux et prennent différentes conformations selon leur structure moléculaire. Afin de déterminer sous quelle forme les lipides s'organisent, un paramètre de forme  $P$  peut être calculé (17). Ce paramètre dépend de l'importance relative des parties hydrophobes et hydrophiles des lipides. Plus exactement, c'est le rapport entre le volume de la molécule et le produit de l'aire de la tête polaire par la longueur de la molécule. Ainsi, si la partie hydrophobe est plus importante que la partie hydrophile, une phase hexagonale va être adoptée. Au contraire, si c'est la partie hydrophile du lipide qui est la plus importante, une configuration micellaire sera choisie. Lorsque les parties hydrophiles et hydrophobes occupent des volumes équivalents, les lipides s'organisent alors sous forme de cylindres ou vésicules et adoptent la phase lamellaire  $L_{\alpha}$ . La figure 16 récapitule les différentes formes sélectionnées par les lipides.

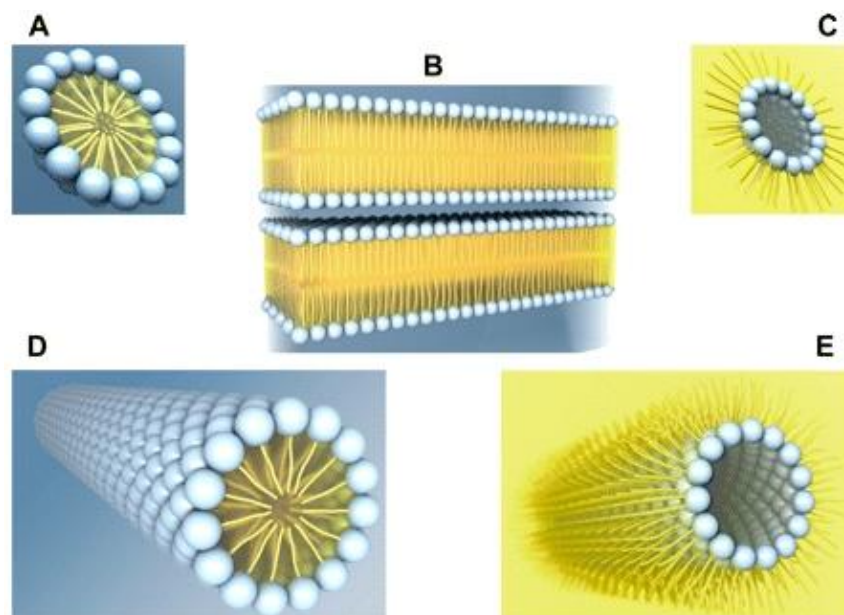


Figure 16 : Polymorphisme lipidique. (A) micelles ; (B) phase lamellaire ; (C) micelles inversée ; (D) phase hexagonale et phase hexagonale inversée (E) (77).

## INTRODUCTION

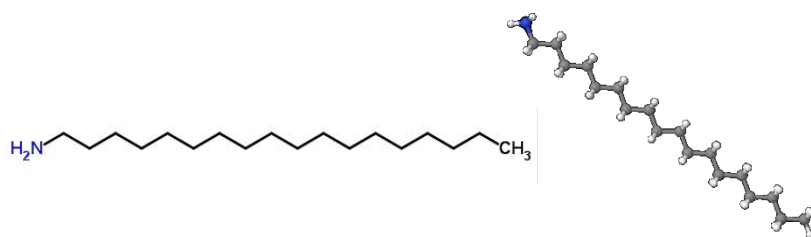
---

Les vésicules lipidiques également nommées liposomes sont largement utilisées comme modèle simplifié de la membrane cellulaire. Les phospholipides qui les constituent sont dès lors choisis pour mimer au mieux une membrane cellulaire. Il existe différents types de liposomes. Des liposomes multilamellaires (MLV, multilamellar large vesicle) qui tels des oignons présentent plusieurs bicouches concentriques séparées les unes des autres par le milieu aqueux et des liposomes unilamellaires formés d'une seule bicouche membranaire.

La taille de ces structures peut être contrôlée expérimentalement, et suivant celle-ci, les liposomes unilamellaire seront appelés : (i) SUV (small unilamellar vesicles) pour des diamètres allant de 40 à 100 nm, (ii) LUV (large unilamellar vesicles) pour des diamètres allant de 100 à 500 nm, et (iii) GUV (giant unilamellar vesicles) pour des liposomes allant de 500 nm à 1000  $\mu\text{m}$  de diamètre.

De même, on peut distinguer différents types de vésicules multilamellaires (78) : (i) les MLV décrites plus haut, (ii) les OLV (oligo lamellar vesicle) décrites comme des MLV possédant moins de bicouches, (iii) les MVV (multi vesicular liposomes) qui, comme leur nom l'indique, contiennent plusieurs vésicules en leur sein.

Des molécules peuvent être ajoutées aux liposomes afin de modifier leurs propriétés. Ainsi, si de la stéarylamine (figure 17) est insérée dans les membranes, une sédimentation liposomale est évitée (ce qui permet des mesures de longue durée). En effet, grâce à sa charge positive, cette molécule va entraîner une répulsion électrostatique qui empêchera les vésicules de fusionner au cours du temps (79). Un « edge activator », défini le plus souvent comme un surfactant à chaîne unique possédant un grand rayon de courbure (i.e. le déoxycholate sodique), peut également être incorporé aux vésicules. Cette molécule va déstabiliser la bicouche membranaire et aura pour conséquence de rendre les liposomes plus déformables (80).



**Figure 17 : Structure chimique de la stéarylamine.**

### 3.2 Applications

Découverts dans les années 60 par Bangham et al. (81), les liposomes ont trouvé un large panel d'applications. Vu leur structure et leur composition similaire à celle des membranes cellulaires, les liposomes sont de bons modèles membranaires. La perméabilité, la topologie, la fission ou fusion de membrane ont ainsi été mises en évidence et étudiées via les liposomes (20, 82). Une visualisation directe de domaines en phase ordonnée et désordonnée dans des GUVs composés d'un mélange ternaire de trois composants importants de la membrane cellulaire (DOPC/Chol/SM) a aussi été mise en évidence en microscopie à 2 photons (83). De même, des liposomes mimant la composition de lipid rafts et donc riches en cholestérol ont montré une forte résistance aux détergents (26).

Les liposomes sont utilisés dans le domaine de la médecine et de la pharmacologie pour des applications thérapeutiques ou des diagnostics. En effet, les vésicules peuvent véhiculer des médicaments dans l'organisme soit en encapsulant la molécule dans le volume intraliposomal soit en la dissolvant dans sa bicouche lipidique. Si la molécule est hydrophile, la taille du liposome, et donc du volume intraliposomal (ou la molécule active est emprisonnée), est crucial, ce qui n'est pas le cas pour des molécules hydrophobes (84). L'avantage de ces vésicules est qu'elles protègent la molécule active de la dégradation et peuvent ainsi délivrer le médicament passivement à l'endroit voulu. Par exemple, la morphine encapsulée dans des liposomes multilamellaires (MLV) va pouvoir se diffuser lentement au travers des nombreuses bicouches liposomales pour enfin être libérée dans le milieu voulu. La concentration locale de la molécule est donc réduite et son mode d'action est prolongé, réduisant ainsi les effets secondaires (20).

Les liposomes interagissent avec la cellule cible via quatre mécanismes différents (84): (i) endocytose dû à une phagocytose de cellules macrophages, (ii) adsorption sur la surface cellulaire, (iii) fusion dans la membrane plasmique, (iv) transfert de lipides liposomals dans les cellules membranaires, ou vice versa, sans pour autant avoir une association de tout le contenu liposomal avec la cellule. Les liposomes conventionnels, comme décrits dans cette section, peuvent atteindre passivement des tissus ou des organes dont l'endothélium est discontinu, comme le foie, la rate et la moelle osseuse (85). Par voie intraveineuse ces liposomes sont rapidement capturés par des systèmes phagocytères et éliminés de la

## INTRODUCTION

---

circulation sanguine. Une interaction avec les lipoprotéines à haute (HDL) et faible densité (LDL) libérant prématurément la drogue encapsulée dans le plasma a aussi été observée. Cependant, l'incorporation de cholestérol dans les liposomes réduit le transfert des phospholipides au HDL et stabilise la structure liposomale (85). De même, les petits liposomes sont éliminés moins rapidement que les grands dans la circulation sanguine (86).

Comme les liposomes sont des systèmes cibles pour les macrophages, ils sont des véhicules idéaux pour les atteindre. Des infections fongiques peuvent être ainsi traitées (i.e. Daunoxome<sup>®</sup> (Gilead Sciences) (87), Aroplatin<sup>®</sup> (Antigenics Inc.)) (88). Les macrophages sont également impliqués dans des processus d'immunisation, les liposomes servent alors de vaccins. Ils sont déjà exploités lors de vaccinations animales (82), et à l'échelle humaine, des vésicules encapsulant le vaccin de la malaria ont montré des effets prometteurs (89, 90).

Afin d'augmenter le temps de vie des liposomes dans la circulation sanguine, une nouvelle classe de vésicules a été mise au point ; les stealth liposomes. Ils sont obtenus en coquant la surface du liposome avec des molécules inertes formant une barrière spatiale (85). L'addition de gangliosides ou de polyéthylène glycol est connue pour augmenter le temps de circulation des liposomes (91, 92). Ces vésicules sont dès lors utilisées dans le traitement du cancer car leur long temps de circulation dans le sang leur permet de s'accumuler dans les tissus tumoraux (85, 93, 94). Ces liposomes peuvent également encapsuler un gène et dans ce cas ils sont utilisés comme vecteur de thérapie génique (95).

Les liposomes servent aussi lors de diagnostic notamment en imagerie (i.e. Scintigraphie gamma, tomographie,..). En effet, ils sont capables d'incorporer une large variété de molécules de contraste et de les délivrer à l'endroit voulu, ce qui a pour bénéfice d'augmenter le signal de contraste de la zone ciblée (85, 96).

Les liposomes ont envahi le marché de la cosmétologie car ils ont l'avantage de libérer les agents voulus (i.e. collagène, antioxydants) sans pour autant utiliser de l'alcool connu pour endommager la peau lors d'applications répétées (97). De grandes firmes tel que l'Oréal avec « Capture » introduit en 1987, Christian Dior avec son produit « Effet du soleil » ou Estée Lauder avec « Future perfect skin gel » utilisent des liposomes. Les liposomes classiques ne pénètrent cependant pas profondément dans la peau (80). C'est pourquoi les liposomes

déformables tels que décrits au point 3.1 sont préférés. Ces structures ne sont pas utilisées uniquement en cosmétologie mais également dans la promotion de vecteurs médicamenteux pour des infections de la peau (80).

Même si le marché du cosmétique se sert à profusion des liposomes, l'avenir de ces structures se trouve bien dans le domaine médical et pharmaceutique. La nanomédecine est un domaine en pleine expansion et les scientifiques font d'actives recherches dans la reconstitution de cellules sanguines. Des liposomes modifiés semblent être une approche prometteuse (98, 99).

### **3.3 Caractérisation des liposomes**

Les techniques utilisées pour caractériser les liposomes sont nombreuses. Chacune apportant une information différente, l'utilisation conjointe de plusieurs d'entre elles est nécessaire pour obtenir une étude complète des propriétés physicochimiques des vésicules (100). Mais pour savoir quelles techniques utiliser il faut d'abord connaître les caractéristiques importantes à analyser dans une structure liposomale. Edwards et Baumner en répertorient cinq (101): la taille, la lamellarité, le pouvoir d'encapsulation, la qualité des liposomes au cours du temps, et enfin une analyse lipidique quantitative.

La distribution de taille, ou polydispersité d'une population de vésicules, est communément mesurée par la technique de diffusion quasi-élastique de lumière (DLS) (96). Une autre technique commercialisée est la chromatographie sur gel perméable dont les colonnes sont capables de différencier des liposomes allant de 30 à 300 nm. Cependant les microscopies électroniques donnent également des informations sur la morphologie liposomale (100) comme par exemple la microscopie électronique à balayage ou la microscopie électronique en transmission. On peut aussi répertorier la diffractométrie de rayons X comme puissante technique d'analyse des composants lipidiques.

Le pouvoir d'encapsulation est généralement obtenu en encapsulant un marqueur hydrophile dans la vésicule. La technique de fluorescence tient le premier rôle dans ces études mais la résonance paramagnétique électronique peut également être utilisée (96).

De même, les transitions de phase au sein des bicouches, comme décrit précédemment, sont communément mesurées par ces deux mêmes techniques. La technique de Calorimétrie différentielle à balayage tient également un rôle important (100).

La stabilité des liposomes est améliorée en stockant les liposomes à basse température. Cependant des phénomènes d'agrégation, des fuites ou l'interaction des constituants lipidiques avec la solution sont souvent observés. Ce sont les techniques de fluorescence (en incorporant une sonde fluorescente au sein de la bicouche) qui sont le plus souvent utilisées pour déterminer la perméabilité ou la fluidité membranaire (102).

### ***3.4 Les liposomes dans ce travail***

Dans ce travail les liposomes ont été utilisés comme modèle membranaire cellulaire. Ces structures ont été soumises à une cyclodextrine et, afin de caractériser et quantifier les changements induits par cette molécule au sein de ces systèmes membranaires, nous avons travaillé principalement avec deux techniques : (i) la Résonance Paramagnétique électronique qui nous a permis d'obtenir des résultats sur la microviscosité membranaire et (ii) la Diffusion neutrons aux petits angles (SANS) qui, grâce à une modélisation appropriée (voir chapitre III et IV), nous a renseigné sur la géométrie des liposomes en donnant le rayon moyen des vésicules, l'épaisseur de leur membrane (partie hydrophile et hydrophobe) ainsi que la polydispersité de la population liposomale utilisée lors des différentes expériences.

Cependant les liposomes, comme cela est décrit dans cette partie introductive, peuvent également servir de vecteurs médicamenteux. Le protocole mis au point en EPR (et la modélisation en SANS), s'est voulu le plus général et rapide possible afin de pouvoir l'employer à un grand nombre de systèmes composé de membranes / cyclodextrines. Nous avons ainsi pu élargir notre champ de recherche et appliquer notre protocole et analyse spectrale à des liposomes déformables comportant différentes cyclodextrines. Ce travail, en collaboration avec l'équipe du professeur G. Piel, a donné lieu à une publication (103) mais ne sera pas développée dans cette thèse.

## 4 Les cyclodextrines

### 4.1 Historique

L'histoire des cyclodextrines commence en 1891 avec le scientifique français A. Villiers qui écrivit dans un compte rendu de l'Académie des Sciences :

« J'ai montré dernièrement que la fécule de pomme de terre peut, dans des conditions déterminées, fermenter sous l'action du *Bacillus amylobacter*, les produits principaux de cette fermentation étant constitués par des dextrines » (104).

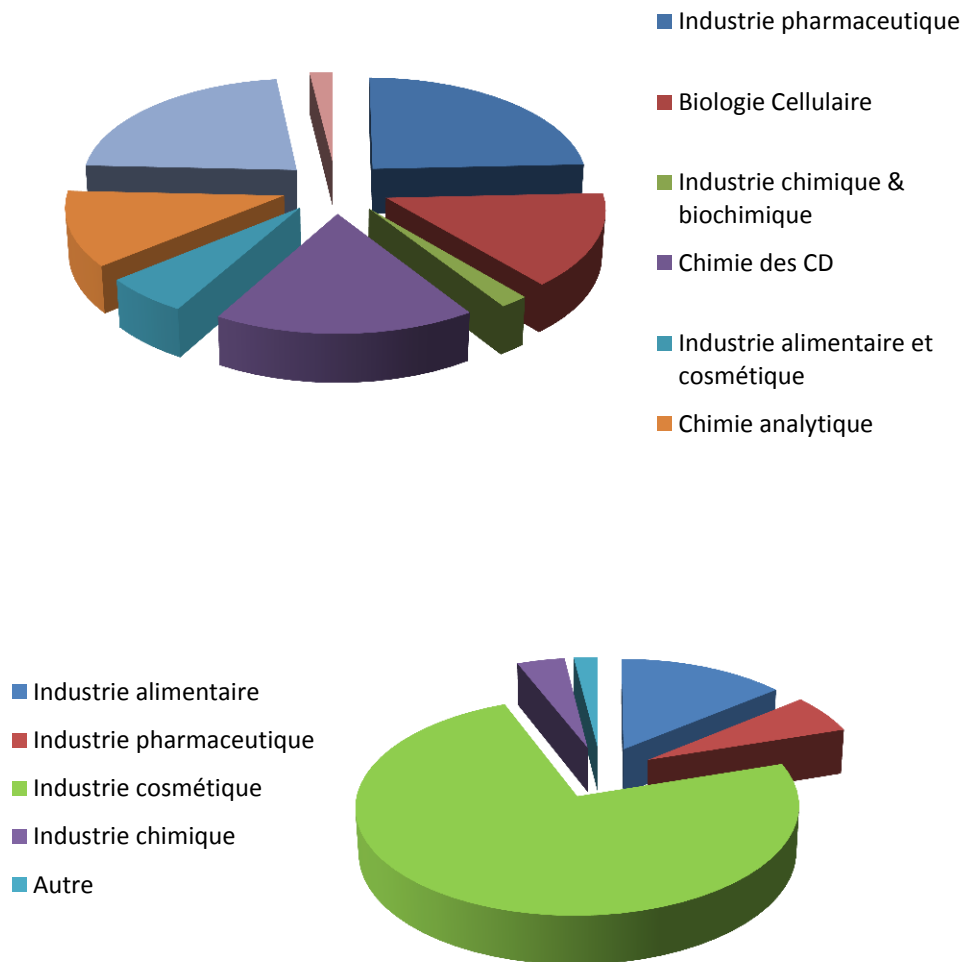
La période de découverte des cyclodextrines vient de débiter et va durer jusque dans les années 1930. La paternité des cyclodextrines n'est cependant pas attribuée à Villiers mais à F. Schardinger (105). C'est ce dernier qui isola au début des années 1900 le microorganisme *Bacillus macerans* qui, lorsqu'il est cultivé dans un milieu contenant de l'amidon, donne naissance de façon reproductible à deux substances cristallines. Le scientifique les appela  $\alpha$ - et  $\beta$ -dextrines, leur exacte architecture moléculaire n'étant pas encore connue à cette époque.

Ce n'est que dans les années 30 que la structure cyclique des dextrines fut élucidée, et elles sont maintenant communément appelées cyclodextrines. En 1935, Freudenberg et Jacobi (106) découvrirent un troisième type de cyclodextrine : les  $\gamma$ -cyclodextrines, et en 1948, avec l'aide cette fois de Cramer (107), Freudenberg suggéra l'existence de plus grandes structures. Cependant, ce n'est que dans les années 60 que ces plus grandes cyclodextrines furent réellement mises en évidence par French et al. (108). La période d'exploration des cyclodextrines a ainsi débuté dans les années 30 et a duré jusque dans les années 70. Leur structure, poids moléculaire, solubilité ainsi que leurs formidables propriétés de complexion furent déterminées durant ces années (109).

Avec l'industrialisation et les avancées biotechnologiques permettant la production de plus grandes quantités de cyclodextrines sans impuretés et à des prix plus accessibles, la « période d'utilisation » put enfin commencer. Ainsi, le premier symposium international des cyclodextrines naquit en 1981 et a toujours lieu (le 15<sup>ème</sup> fut donné à Vienne). Le nombre de publications sur les cyclodextrines n'a cessé de croître depuis les années 70. En 2010, le

## INTRODUCTION

centre de recherche Cyclolab répertorie 43 000 articles d'intérêt significatif (sans parler des autres..). La figure 18 résume les différents domaines de recherche et applications des cyclodextrines (110). Vu la quantité impressionnante de papiers publiés, nous ne pourrions être exhaustif sur le sujet.



**Figure 18 : En haut : distribution des domaines étudiés avec les CD sur un échantillon de 43 000 abstracts  
En bas : Répartition en 2009 des 94 000 tonnes de CD dans le secteur industriel. Données reprises de L. Szente (111).**



## 4.2 Structure

### 4.2.1 Les cyclodextrines naturelles

Les cyclodextrines naturelles (CD) sont obtenues par dégradation enzymatique de l'amidon. Ce sont des oligomères cycliques du glucose de formule brute  $(C_6H_{10}O_5)_n$  comportant 6 à 12 unités  $\alpha$ -D-glucopyranose. Les trois principales cyclodextrines notées  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyclodextrines, contiennent respectivement 6, 7 et 8 unités glucose (voir les figures 19 et 20).

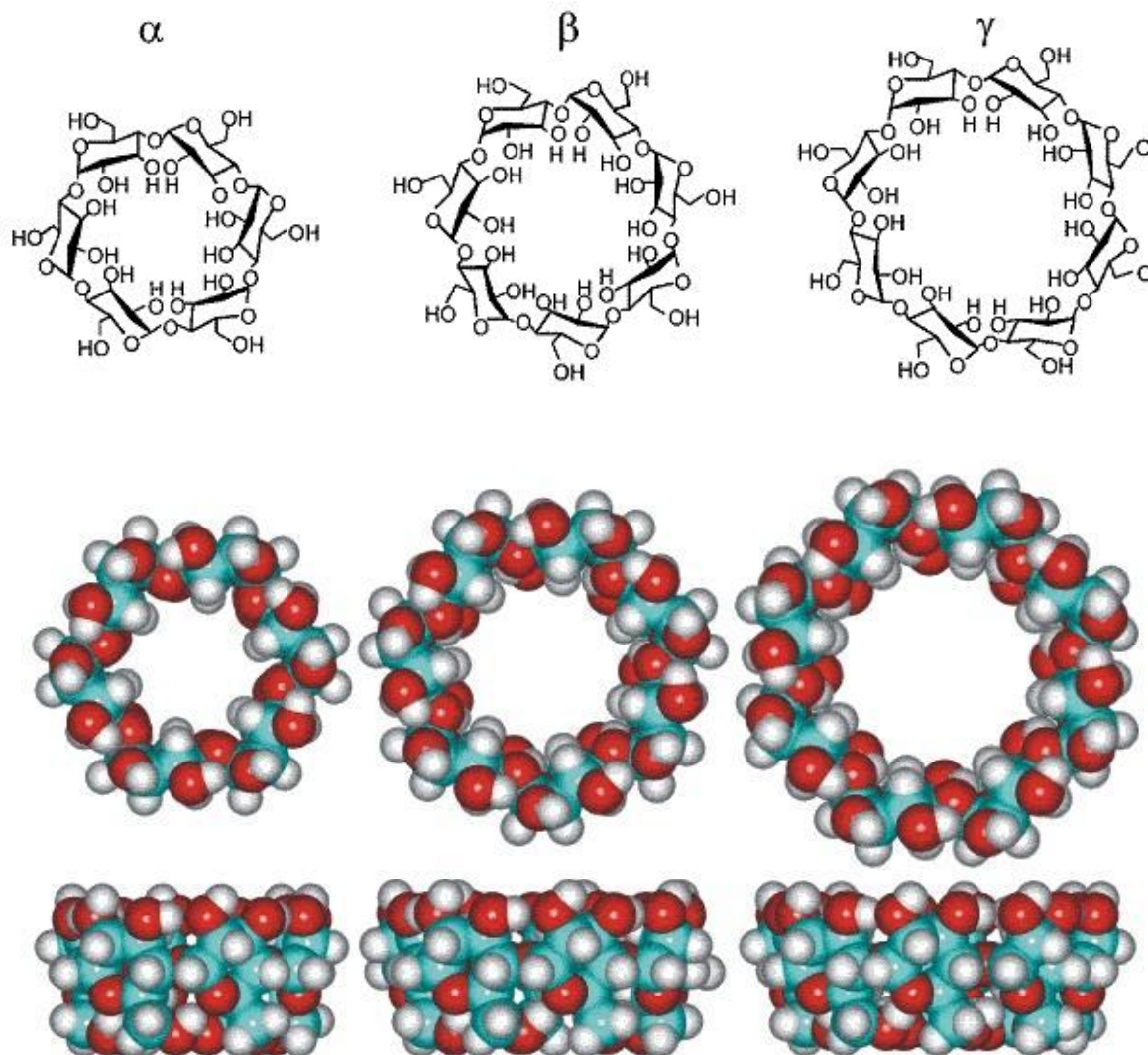


Figure 19 : Structure tridimensionnelle des cyclodextrines naturelles ( $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -CD) avec de haut en bas : Structure moléculaire, une vue de la face des hydroxyles secondaires (« grand côté ») et une vue latérale.

## INTRODUCTION

Par diffraction des rayons X, il a été permis de montrer que l'extérieur des CD est tapissé par les fonctions hydroxyles du glucose, tandis que les atomes de carbone et d'hydrogène tapissent l'intérieur de la cavité (112). C'est cette organisation moléculaire qui donne aux CD leur caractère amphiphile dû à un extérieur relativement hydrophile (surface de contact avec le solvant) et à un cœur relativement hydrophobe. Les cyclodextrines présentent donc une forme de cône tronqué ou de donuts (voir figures 19 et 20).

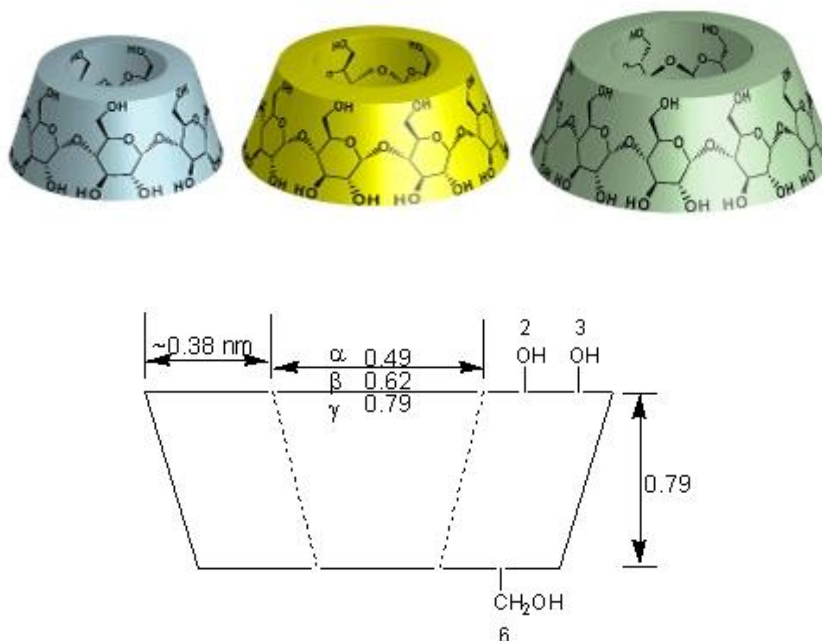


Figure 20 : Forme géométrique des CD ( $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -CD) et diamètre interne moyen donné en nm.

Le caractère hydrophobe de la cavité des CD permet d'inclure des molécules dites « invitées » dont l'hydrophobicité et la taille correspondent à celles de la cavité tandis que les fonctions hydroxyles assurent une bonne solubilisation des complexes dans l'eau. Les CD peuvent ainsi inclure partiellement ou en totalité un (ou des) composé(s) invité(s). Frömring et Szejtli ont comparé la cavité lipophile d'une cyclodextrine à une solution eau/éthanol (113).

Malgré leur structure chimique semblable, le degré de solubilisation varie d'une cyclodextrine à l'autre. La  $\beta$ -CD plus rigide comporte la solubilité la plus faible. Ce phénomène s'explique par la formation de liaisons hydrogène intramoléculaire entre les groupes hydroxyles secondaires (voir les figures 19 et 20) (114, 115) qui diminue la capacité des  $\beta$ -CD à former des liaisons hydrogènes avec le milieu qui les entoure. Dans la  $\alpha$ -CD, dû à

une distorsion d'une unité glycopyranose, seul quatre liaisons hydrogènes à la place des six supposées se forment, impliquant une plus grande solubilité de la cyclodextrine (114). La  $\gamma$ -CD est quant à elle flexible et présente le plus haut degré de solubilisation : 232 mg/ml versus 145 mg/ml pour les  $\alpha$ -CD et 18.2 mg/ml pour les  $\beta$ -CD (116).

#### 4.2.2 Les cyclodextrines modifiées

Dans ce travail, nous n'avons pas utilisé de cyclodextrines naturelles mais un type de  $\beta$ -CD synthétisée : la  $\beta$ -CD méthylée de façon randomisée plus communément appelée Rameb. Cette cyclodextrine a la particularité d'avoir une grande affinité pour les molécules de cholestérol (117, 118).

Le principal défaut de la  $\beta$ -CD naturelle est d'être peu soluble. Un moyen de casser l'anneau interne de liaison d'hydrogène est de substituer l'atome d'hydrogène d'un groupement hydroxyle ou de simplement remplacer tout le groupement par différents radicaux même si ceux-ci sont plus hydrophobes (tel que par exemple des fonctions méthyles). Dans le cas de la  $\beta$ -CD, 21 groupements hydroxyles peuvent être substitués. Il est intéressant de noter que, dans de l'eau froide, plus la cyclodextrine est méthylée mieux elle est solubilisée mais, lorsque les 2/3 de substitution de la cyclodextrine sont atteint, l'effet inverse est observé (113). La Rameb correspond quant à elle à un mélange de  $\beta$ -CD méthylées dont le degré moyen de méthylation est de 1.8 par unité de glucose.

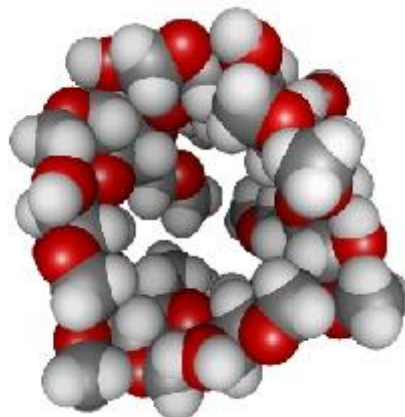


Figure 21 : Structure tridimensionnelle de la Rameb. (110)

## INTRODUCTION

---

La réactivité des trois groupes hydroxyles d'une unité glucose d'une cyclodextrine est légèrement différente d'un groupement à l'autre. La substitution n'est donc pas totalement randomisée mais dépend de la basicité du milieu aqueux (116). C'est ce qui explique notamment la différence de complexion d'une même cyclodextrine d'une firme à l'autre, voire de la même firme mais pour des lots différents.

Les cyclodextrines de synthèse ne sont pas uniquement fabriquées dans le but d'augmenter la solubilité des cyclodextrines parentérales. Elles peuvent aussi améliorer la stabilité du complexe formé en accroissant le lien hôte-invité. C'est le cas d'une  $\beta$ -CD méthylée qui possède une cavité plus hydrophobe que la  $\beta$ -CD elle-même. Il en résulte un complexe avec la molécule de cholestérol plus stable qu'avec la cyclodextrine naturelle (117).

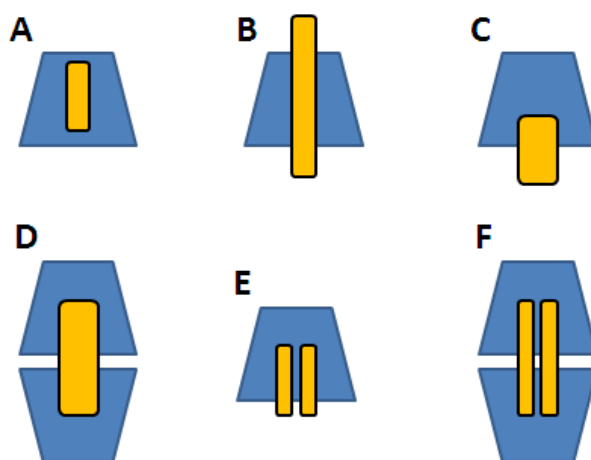
Ces dérivés peuvent également diminuer la toxicité parentérale de la  $\beta$ -CD. Les  $\beta$ -CD naturelles ont une affinité pour le cholestérol mais le complexe ne peut être métabolisé par l'organisme car ces derniers sont sous forme cristalline (et donc insoluble) au niveau des reins, ce qui entraîne des néphrites. Au contraire, les cyclodextrines méthylées à cause de leur hétérogénéité, ne peuvent se cristalliser mais forment un mélange amorphe de dérivés isomériques qui lui, par contre, est soluble (115, 116).

Notons que la biodégradabilité des cyclodextrines natives ( $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -CD) est rapide et complète alors que pour les cyclodextrines modifiées, elle est généralement plus faible et dépend du degré de substitution (119). Ainsi, la substitution par des groupements méthyls affecte la dégradation des CD. Une étude menée par Fava et al (120) a montré que la Rameb est une cyclodextrine faiblement dégradée par les bactéries en conditions aérobies. Verstichel a exposé quant à lui que 90% de CD natives sont biodégradées après 15 jours d'incubation (dans des conditions idéales) alors que seulement 5,6 % de CD acétylées sont dégradées après 45 jours. De même, la (2-hydroxy) propyl-  $\beta$ -CD (HP-  $\beta$  CD) atteint un plateau dans la biodégradation d'un pourcentage de 20% après 47 jours de compostage alors que les CD méthylées ne se décomposent pas durant ce même laps de temps (121).

### 4.3 Les complexes hôtes-invités

#### 4.3.1 Les complexes d'inclusions

Par leur structure amphiphile, les cyclodextrines sont des molécules de choix pour inclure dans leur cavité lipophile des molécules hydrophobes et former ainsi des complexes d'inclusions. Différents types de complexes sont possibles et une, deux, voire trois cyclodextrines peuvent inclure en leur sein une molécule dite invitée. L'essence même de l'encapsulation moléculaire correspond à un rapport hôte : invité égal à 1 : 1 et est généralement le plus fréquent. Mais d'autres associations tel celles décrites dans la figure 22 sont possibles. Ainsi des complexes 2 : 1, 1 : 2, 2 : 2 ou encore plus compliqués peuvent se former et généralement coexistent simultanément dans un même milieu (114). Une étude récente menée par D. Castagne a montré le mode préférentiel d'inclusion du cholestérol avec la Rameb, et la conformation déterminée comme la plus énergiquement favorable, est de type 2 : 1 (122).



**Figure 22 : Diverses structures de complexes cyclodextrine – invité en solution aqueuse ; (A) Inclusion complète ; (B) Inclusion « axiale » ; (C) Inclusion partielle ; (D) Complexe 2 :1 (le 1 correspond au nombre d'invité et le 2 correspond au nombre d'hôte); (E) Complexe 1 :2 ; (F) Complexe 2 :2.**

Les interactions mises en jeu lors de la complexation peuvent être de nature différente telles que (123): des interactions électrostatiques, les forces de Van Der Waals, des interactions hydrophobes ou des liaisons hydrogènes.

## INTRODUCTION

---

Un des facteurs déterminants est d'ordre géométrique : la partie incluse doit bien évidemment être plus petite que celle de la cavité de la cyclodextrine considérée.

Le phénomène d'inclusion – complexion ne fait donc intervenir aucune liaison covalente, mais uniquement des forces physiques. Ainsi, la stabilité énergétique des complexes est principalement gouvernée par le remplacement, dans la cavité, des molécules d'eau à haute enthalpie par des molécules hydrophobes qui créent des associations de type « apolaires – apolaires » (123). En conséquence, les molécules invitées ne sont pas fixées de manière statique dans la cyclodextrine mais se trouvent en équilibre dynamique entre leur état libre et complexé. Le contexte chimique du milieu est donc lui aussi directement relié à la stabilité du complexe. Une destruction de complexe peut se faire en augmentant la température ou en changeant le pH (124). De même, une molécule hydrophobe peut avoir une préférence pour un solvant apolaire plutôt que pour la cavité de la cyclodextrine entraînant la possibilité de régénérescence de cette dernière ; une décomplexion a lieu, la molécule invitée quitte la CD pour le solvant organique.

Plus de 20% des publications des cyclodextrines relate les phénomènes d'inclusions induits par les CD. Ces études sont à la base de toutes les applications pratiques des cyclodextrines. Il existe un grand nombre de techniques pour arriver à mettre en évidence la formation d'un complexe. Généralement, lorsqu'une molécule est incluse dans la cavité d'une cyclodextrine, ses propriétés physico-chimique vont être modifiées. Si la molécule est fluorescente elle verra son intensité de fluorescence augmenter car elle passera d'un milieu aqueux à un milieu apolaire. Parfois, le maximum d'absorption en UV se déplace de quelques nm lors de la formation d'un complexe. La technique de RMN est couramment utilisée pour montrer la formation de complexes avec les cyclodextrines car elle montre des variations de spectres lors de l'inclusion : une modification des déplacements chimiques des hydrogènes situés à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine et des hydrogènes de la partie incluse de la molécule seront observés. Si la molécule hôte est paramagnétique, son spectre EPR se modifiera lors de l'inclusion : la molécule ne sera plus libre en solution mais restreinte dans son mouvement et une variation du temps de corrélation sera calculée. La réactivité chimique de la molécule hôte peut se trouver également changée : généralement elle est diminuée par la stabilisation de la molécule dans la cavité de la cyclodextrine. De plus, la diffusion et la volatilité de la molécule peuvent être modifiées après son inclusion (115, 125).

### 4.3.2 Les complexes non inclusifs

Il est important de noter que toutes les molécules invitées ne se trouvent pas nécessairement emprisonnées dans la cavité des cyclodextrines. Les groupements hydroxyles se trouvant sur la surface extérieure des CD peuvent également former des ponts hydrogénés avec d'autres molécules. L'équipe de Gabelica (126) a ainsi montré que des complexes d'inclusions et de non-inclusion coexistaient lorsqu'une  $\alpha$ -CD était mise en contact avec des acides dicarboxyliques. Cependant, ce type de complexe est moins fréquent que les complexes d'inclusions (127).

### 4.3.3 Les agrégats

Ces dernières années les scientifiques se penchent sur une caractéristique des cyclodextrines connue mais encore inexploree : les agrégats et leur possible pouvoir complexant. Ce domaine d'étude est en pleine expansion grâce aux récents développements de puissantes techniques microscopiques. Cependant, la dimension des agrégats est, en principe, étudiée par les techniques de diffusion de lumière. Il a ainsi récemment été démontré que la taille des agrégats de CD native augmentait de façon dose-dépendante: les plus grands ayant été observés avec les  $\beta$ -CD et pouvant atteindre quelques micromètres (128).

La faible solubilité des  $\beta$ -CD est aussi reliée au phénomène d'agrégation qui est effective à partir d'une concentration de 2-3 mM (129). L'agrégation aurait lieu grâce à des ponts hydrogènes formés via les groupements -OH entre les cyclodextrines (128). De ce fait, les cyclodextrines méthylées ne s'agrègent pas aussi facilement que les CD natives. Une étude a montré que la Rameb s'agrège seulement (et faiblement) à partir de 12 mM et que le diamètre des agrégats formés n'excède pas les 70 molécules (130). Une large variété d'agrégats de  $\beta$ -CD a été rapportée par Bonini et al. (129) telle que des structures sphériques, des disques mais aussi de longues fibres formant des plans et qui sembleraient être leur arrangement le plus naturel.

Si les cyclodextrines seules s'agrègent, leurs complexes aussi bien inclusifs que non inclusif peuvent aussi participer activement à ce phénomène (128). Loftsson (131) a montré que des agrégats (façon micelles) de cyclodextrines type HP- $\beta$ CD étaient capables de

solubiliser des molécules de cholestérol. De même Auzely-Velty et al. (132) ont déterminé que des cyclodextrines méthylées conjuguées à du cholestérol s'assemblait en une population monodisperse de micelles dont le nombre d'agrégation moyen était égal à 24. Ce pouvoir complexant de certaines molécules avec les cyclodextrines est pressenti comme un nouveau type de système de délivrance de molécules actives (133). On peut également parler de l'équipe de Y. He qui travaille actuellement sur la détermination de molécules capables d'induire une architecture hôte-invité type nanotubes (127).

Malgré les informations que nous venons de donner, les formes, tailles et concentration d'agrégations critiques des cyclodextrines (et surtout des cyclodextrines de synthèse) sont toujours controversées, les résultats obtenus dépendant fortement de la technique utilisée.

### **4.4 Applications**

Grâce à leur propriété complexante les cyclodextrines sont déjà largement utilisées et envahissent notre vie quotidienne. Nous proposons un bref et non exhaustif tour d'horizon de leurs différentes applications.

#### **4.4.1 Pharmaceutique**

Malgré une première étude erronée (134) retardant les recherches sur l'emploi des cyclodextrines dans le domaine pharmaceutique, ces dernières sont aujourd'hui acceptées et occupent le marché.

La structure chimique et le haut poids moléculaire des cyclodextrines ne permettent pas à ces dernières de traverser les membranes biologiques (135). Des études ont montré que seule une quantité négligeable de cyclodextrines et de complexes cyclodextrine/drogue étaient capable d'endommager les membranes des muqueuses gastro-intestinales ainsi que la peau (136). Par voie orale les CD sont donc majoritairement non toxiques. Les CD qui doivent être utilisées en quantité limitée sont les  $\beta$ -CD méthylées car ce sont elles qui pénètrent (~10%) dans les parois gastro-intestinales (116). Cependant, la Rameb utilisée dans ce travail ne



provoque aucune irritation lorsqu'elle est administrée par voie nasale, cutanée (137) ou oculaire. Elle fait donc partie des CD ayant passé les tests de toxicité et pouvant être utilisée dans la formulation de médicaments (138).

La formation de complexe d'inclusion est mise à profit de diverses manières que nous nous proposons d'énumérer brièvement :

- Les CD augmentent la solubilisation de drogues comme par exemple la Brexin qui comporte le complexe piroxicam/ $\beta$ -CD ou la Prostavasin qui contient un dérivé de la prostaglandine E<sub>1</sub> connu pour être très peu soluble et extrêmement réactif à l'air libre.
- Les CD réduisent les effets astringents ou irritants des drogues tel que la nicotine qui ne peut être administrée pure. Ainsi les chewing-gums ou tablettes comportent des complexes nicotine/  $\beta$ -CD.
- Les CD masquent également les goûts qui peuvent parfois être trop amers comme dans l'ibuprofen.
- Des études se penchent sur l'emploi de cyclodextrines comme vecteurs de médicament. Le principe employé pour la vectorisation est identique dans toutes les approches relevées : on part de la structure de base des CD sur laquelle on greffe chimiquement une "antenne" destinée à assurer la fonction de ciblage. L'originalité des différentes approches réside dans le choix de l'antenne (139).
- Pour produire des vaccins, il faut étudier les microorganismes qui promeuvent la maladie. Il n'est pas toujours facile de les cultiver car ils peuvent avoir besoin de substances hautement hydrophobes ne pouvant être solubilisée dans un milieu. Les cyclodextrines en complexant les molécules voulues et en les solubilisant ont permis la création de vaccins tel le DAPTACEL (Diphtheria and tetanus Toxoids and acellular vaccine adsorbed, Sanofi Aventis, Pasteur)

### 4.4.2 Autre

Les CD encapsulent une large variété de molécules. Emprisonnées, ces dernières ne peuvent plus se volatiliser, être détruites par la lumière ou l'oxygène. Ces propriétés protectrices sont précieuses dans le domaine de la cosmétologie : les CD permettent aux crèmes et parfums d'exhaler durant de longues périodes leurs fragrances, et les vitamines mises en cage dans la cavité des CD se détériorent moins rapidement. En conséquence, les complexes sont largement incorporés dans les crèmes parfums et déodorants.

Les CD sont capables de masquer les mauvaises odeurs, un des premiers produits ayant usé de ce pouvoir est le febreze. Mais cette capacité d'annihiler les effluves inconfortables est également utilisée dans l'industrie du textile. Ainsi, en Allemagne, des rideaux captent les mauvaises odeurs de la maison et les relarguent après lavage en machine. Le même procédé est utilisé pour des sous-vêtements (140).

L'industrie de l'agroalimentaire est également friande des CD. Elle utilise par exemple ces dernières pour créer les produits dits pauvres en cholestérol : le lard, les œufs et le beurre ne sont plus gras grâce aux CD (141). Au Japon tout produit naturel peut être consommé. Le marché alimentaire utilise donc les CD naturelles à profusion. En effet, plus de 78.8% des CD sont consommées dans ce type d'industrie (142). Par exemple Nestlé a mis sur le marché du café en poudre au goût de vanille grâce aux CD. De même du thé vert en poudre peut être consommé sans pour autant être trop amer malgré le haut taux de théine (142). L'emballage même des produits alimentaires peut contenir non seulement des CD qui auraient des propriétés antibactériennes (141, 142) mais aussi et surtout, qui permettraient de garder le goût de l'aliment plus longtemps (114).

Les cyclodextrines complexent non seulement des drogues mais également des insecticides, herbicides, fongicides ce qui permet de réduire significativement les doses polluantes induites par le produit agrochimique synthétique. Un domaine qui ne se développe que depuis les années 90 est l'assainissement de sites pollués via les CD (124). Les Japonais comptent quant à eux remédier à ce vaste problème en faisant ingurgiter aux vaches des complexes Wasabi-CD diminuant leur production de méthane (142)...

#### **4.5 Les cyclodextrines et la littérature : que reste-t-il à faire ?**

Au vu du nombre impressionnant d'articles parus sur les cyclodextrines, on pourrait se demander : quel intérêt y a-t-il à effectuer un travail sur ces molécules ?

Même si on comprend rapidement que tous les couples cyclodextrines/molécule hôte(s) n'ont pas encore été déterminés, on sait que les diverses techniques et modes opératoires employés pour les étudier sont connus. Alors, même si ces travaux sont à la base de toute recherche appliquée, ils ne présentent pas d'intérêt pour la recherche fondamentale. Le lecteur continue dès lors à se plonger dans les articles et, lorsqu'il fait l'état de l'art, il se rend compte que des zones d'ombres persistent. Dans le domaine cellulaire, l'interaction des cyclodextrines avec les membranes n'est pas encore complètement élucidée. Pour étudier et quantifier ces interactions *in vitro*, il faudrait utiliser des techniques novatrices...



## REFERENCES

1. **Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and D. Watson.** 1986. *Biologie moléculaire de la cellule*. Flammarion, France.
2. **Lodish, M. L. Berkowitz, Matzudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, and Darnell.** 2005. *Biologie moléculaire de la cellule*. de Boek, Bruxelles.
3. **Lehninger.** 2005. *Principles of biochemistry*. Freeman, New York.
4. **Simons, K., and G. Van Meer.** 1988. *Lipid sorting in epithelial cells*. *Biochem* 27:6197-6202.
5. **Ohvo-Rekilä, H., B. Ramstedt, P. Leppimäki, and J. Peter Slotte.** 2002. *Cholesterol interactions with phospholipids in membranes*. *Prog Lipid Res* 41:66-97.
6. **Han, S., and J. Y. L. Chiang.** 2009. *Mechanism of Vitamin D Receptor Inhibition of Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase Gene Transcription in Human Hepatocytes*. *Drug Metab Disp* 37:469-478.
7. **Yeagle, P. L.** 1985. *Cholesterol and the cell membrane*. *Biochim Biophys Acta* 822:267-287.
8. **De Duve, C.** 1987. *Une visite guidée de la cellule vivante*. de Boek Université, Bruxelles.
9. **Varki, A., R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, and J. Marth.** 1999. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor laboratory Press, New York.
10. **Barsukov, L. I., A. V. Victorov, I. A. Vasilenko, R. P. Evstigneeva, and L. D. Bergelson.** 1980. *Investigation of the inside-outside distribution, intermembrane exchange and transbilayer movement of phospholipids in sonicated vesicles by shift reagent NMR*. *Biochim Biophys Acta* 598:153-168.
11. **Middelkoop, E., B. H. Lubin, J. A. Op den Kamp, and B. Roelofsen.** 1986. *Flip-flop rates of individual molecular species of phosphatidylcholine in the human red cell membrane*. *Biochim Biophys Acta* 855:421-424.
12. **Devaux, P. F., and A. Zachowski.** 1994. *Maintenance and consequences of membrane phospholipid assymetry*. *Chem Phys* 73:107-120.
13. **Picard, F., M. J. Paquet, E. J. Dufourc, and M. Auger.** 1998. *Measurement of the lateral diffusion of dipalmitoylphosphatidylcholine adsorbed on silica beads in the*

- absence and presence of melittin: a 31P two-dimensional exchange solid-state NMR study.* Biophys J 74:857-868.
14. **Tocanne, J. F., L. Dupou-Cezanne, and A. Lopez.** 1994. *Lateral diffusion of lipids in model and natural membranes.* Prog Lipid Res 33:203-237.
  15. **Frenske, D. B.** 1993. *Structural and motional properties of vesicles as revealed by nuclear magnetic resonance.* Chem Phys Lipids 64:143-162.
  16. **Cribier, S., G. Morrot, and A. Zachowski.** 1993. *Dynamics of the membrane lipid phase.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 48:27-32.
  17. **Bahri, M. A.** 2007. *Etude quantitative de la microviscosité membranaire de l'in-vitro aux membranes cellulaires.* In Physics. University of Liège, Liège.
  18. **Cullis, P. R.** 1976. *Lateral diffusion rates of phosphatidylcholine in vesicle membranes: effects of cholesterol and hydrocarbon phase transitions.* FEBS Lett 70:223-228.
  19. **De Kruijff, B., P. R. Cullis, and G. K. Radda.** 1975. *Differential scanning calorimetry and phosphorus-31-NMR studies on sonicated phosphatidylcholine liposomes.* Biochem Biophys Acta, Biomembrane 406:6-20.
  20. **Lorin, A., C. Flore, and A. Thomas.** 2004. *Les liposomes: descriptions fabrication et applications.* Biotechnol Agron Soc Environ 8 :163-166.
  21. **Caffrey, M., and J. Hogan.** 1992. *LIPIDAT: A database of lipid phase transition temperatures and enthalpy changes. DMPC data subset analysis.* Lipids 61:1-109.
  22. **Kiselev, M. A., E. V. Zemlyanaya, V. K. Aswal, and R. H. Neubert.** 2006. *What can we learn about the lipid vesicle structure from the small-angle neutron scattering experiment?* Eur Biophys J 35:477-493.
  23. **Coderch, L., J. Fonollosa, M. De Pera, J. Estelrich, A. De La Maza, and J. L. Parra.** 2000. *Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption.* J Control Release 68:85-95.
  24. **Campbell, N.-A., and J.-B. Reece.** 2004. *Biologie.* De Boek Université, Bruxelles.
  25. **Silvius, J. R.** 1986. *Solid- and liquid-phase equilibria in phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine mixtures. A calorimetric study.* Biochim Biophys Acta 857:217-228.
  26. **Coste, V.** 2006. *Formation de domaines de type "rafts" dans des vésicules unilamellaires et mécanismes physico-chimiques de l'extraction de domaines membranaires.* in Biophysics. Pierre et Marie-Curie, Paris.

27. **Heyne, B.** 2004. *Etude des potentialités antioxydantes du propofol vis-à-vis de l'oxygène singulet.* In Physics. University of Liège, Liege.
28. **Lê-Quôc, D. a. L.-Q. K.** 2000. <http://www.espacesciences.com/index.html>.
29. **Goldstein, D. B.** 1984. *The Effects of Drugs on Membrane Fluidity.* Annu Rev Pharmacol 24:43-64.
30. **Grammenos, A.** 2006. *Etude des modifications de microviscosité induites par voie médicamenteuse (cyclodextrines) ou alimentaire (rapport w3/w6) au sein de systèmes membranaires artificiels ou cellulaires.* In Physics. University of Liège, Liège.
31. **Ancel, D.** 2001. *Comparaison de la perméabilité intestinale entre cirrhose éthylique et cirrhose post-épatitique virale C.* In Medecine. University of henri poincare Nancy I, Nancy.
32. **Bahri, M. A., A. Seret, P. Hans, J. Piette, G. Deby-Dupont, and M. Hoebeke.** 2007. *Does propofol alter membrane fluidity at clinically relevant concentrations? An ESR spin label study.* Biophys Chem 129:82-91.
33. **M'Baye, G.** 2007. *Sondes fluorescentes ratiométriques dérivées de la 3-hydroxyflavone. Etude spectroscopique de nouveaux dérivés et application en biophysique membranaire.* In Sciences de la vie et de la santé. in Biophysics, University of Louis Pasteur, Strasbourg.
34. **McConnell, H. M.** 1969. *Spin-labeled membranes.* J Gen Physiol 54:277-286.
35. **McConnell, H. M., and W. L. Hubbell.** 1971. *Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes.* J Am Chem Soc 93:314-326.
36. **Arsov, Z., M. Schara, and J. Strancar.** 2002. *Quantifying the Lateral Lipid Domain Properties in Erythrocyte Ghost Membranes Using EPR-Spectra Decomposition.* J Magn Reson 157:52-60.
37. **Strancar, J., T. Koklic, Z. Arsov, B. Filipic, D. Stopar, and M. A. Hemminga.** 2005. *Spin label EPR-based characterization of biosystem complexity.* J Chem Inf Model 45:394-406.
38. **Kawasaki, K., J. J. Yin, W. K. Subczynski, J. S. Hyde, and A. Kusumi.** 2001. *Pulse EPR detection of lipid exchange between protein-rich raft and bulk domains in the membrane: methodology development and its application to studies of influenza viral membrane.* Biophys J 80:738-748.

## REFERENCES

---

39. **Subczynski, W. K., and A. Kusumi.** 2003. *Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy.* Biochim Biophys Acta - Biomembranes 1610:231-243.
40. **Chandar, P., P. Somasundaran, K. C. Waterman, and N. J. Turro.** 1987. *Variation in nitroxide probe chain flexibility within sodium dodecyl sulfate hemimicelles.* J Phys Chem B 91:148-150.
41. **Bahri, M. A., M. Hoebeke, A. Grammenos, L. Delanaye, N. Vandewalle, and A. Seret.** 2006. *Investigation of SDS, DTAB and CTAB micelle microviscosities by electron spin resonance.* Colloid Surface A 290:206-212.
42. **Arsov, Z., and J. Strancar.** 2005. *Determination of partition coefficient of spin probe between different lipid membrane phases.* J Chem Inf Model 45:1662-1671.
43. **Hubbell, W. L., and H. M. McConnell.** 1971. *Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes.* Journal of the american chemical society 93:314-326.
44. **Oyama, Y.** 1939. *179th Report.* Okochi laboratory IPCR. 7-23.
45. **Grant, C. W., S. H. Wu, and H. M. McConnell.** 1974. *Lateral phase separations in binary lipid mixtures: correlation between spin label and freeze-fracture electron microscopic studies.* Biochim Biophys Acta 363:151-158.
46. **McConnell, H. M.** 1991. *Structure and transitions in lipid monolayers at the air-water interface.* Ann Rev Phys Chem 42:171-195.
47. **Simons, K., and E. Ikonen.** 1997. *Functional rafts in cell membranes.* Nature 387:569-572.
48. **Binder, W. H., V. Barragan, and F. M. Menger.** 2003. *Domains and rafts in lipid membranes.* Angew Chem Int Ed Engl 42:5802-5827.
49. **Michael, E.** 2001. *Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane.* Trends in Cell Biol 11:492-496.
50. **Knoll, W., G. Schmidt, H. Rotzer, T. Henkel, W. Pfeiffer, E. Sackmann, S. Mittler-Neher, and J. Spinke.** 1991. *Lateral order in binary lipid alloys and its coupling to membrane functions.* Chem Phys Lipids 57:363-374.
51. **Baumgart, T., S. Hess, and W. Webb.** 2003. *Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension.* Nature 425:821-824.
52. **Wu, W. G., and L. M. Chi.** 1991. *Conformational change of cholesterol side chain in lipid bilayers.* J Am Chem Soc 113:4683-4685.



53. **Lees, I.** 1991. *The determination of the phase diagram for a DMPC/DSPC lipid mixture using <sup>2</sup>H NMR difference microscopy.* In *Physics.* University of new brunswick, new brunswick.
54. **Sackmann, E.** 1995. *Handbook of biological application: Physical Basis of self-organization and function of membranes: physics of vesicles.* Elsevier Science B.V., München.
55. **Wu, S., and H. M. McConnell.** 1975. *Phase Separations in Phospholipid Membranes.* *Biochem* 14:847-854.
56. **Devaux, P. F., and R. Morris.** 2004. *Transmembrane Asymmetry and Lateral Domains in Biological Membranes.* *Traffic* 5:241-246.
57. **Almeida, P. F. F., W. L. C. Vaz, and T. E. Thompson.** 1992. *Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis.* *Biochem* 31:6739-6747.
58. **Sankaram, M., and T. Thompson.** 1991. *Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes.* *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8686-8690.
59. **Filippov, A., G. Orädd, and G. Lindblom.** 2003. *The Effect of Cholesterol on the Lateral Diffusion of Phospholipids in Oriented Bilayers.* *Biophys J* 84:3079-3086.
60. **Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Robberts, and P. Walter.** 2002. *Molecular Biology of the cell.* Garland Science, New York.
61. **Paine, P., L. Moore, and S. Horowitz.** 1975. *Nuclear envelope permeability.* *Nature* 254:109-114.
62. **Berkaloff, A., J. Bourguet, P. N. Favard, and J.-C. Lacroix.** 1981. *Biologie cellulaire IV: chromosomes, Nucléoles, enveloppe nucléaire,* Hermann, Paris.
63. **Maxfield, F. R., and D. Wüstner.** 2002. *Intracellular cholesterol transport.* *J Clin Invest* 110:891-898.
64. **Berkaloff, A., J. Bourguet, P. N. Favard, and J.-C. Lacroix.** 1978. *Biologie et physiologie cellulaire II: appareil de Golgi, Lysosomes, Mitochondries, cellules et virus.* Hermann, Paris.
65. **Gubser, C., D. Bergamaschi, M. Hollinshead, X. Lu, F. J. M. Van Kuppeveld, and G. L. Smith.** 2007. *A New Inhibitor of Apoptosis from Vaccinia Virus and Eukaryotes.* *PLoS Pathog.* 3:246-259.
66. **Bruce, A., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter.** 1994. *Molecular biology of the cell.* John Wiley and Sons, New York.

## REFERENCES

---

67. **Berkaloff, A., J. Bourguet, P. N. Favard, and M. Guinnebault.** 1969. *Biologie et physiologie cellulaire*. Hermann, Paris.
68. **Weglarz, L., A. Koceva-Chyla, K. Gwoździński, Z. Dzierzewicz, and Z. Józwiak.** 2003. *Evaluation of hydralazine and procainamide effects on fibroblast membrane fluidity*. *Biochem* 85:549-556.
69. **Pike, L. J.** 2003. *Lipid rafts: bringing order to chaos*. *J Lipid Res* 44:655-667.
70. **Singer, S. J., and G. L. Nicolson.** 1972. *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. *Science* 175:720-731.
71. **Zajchowski, L. D., and S. M. Robbins.** 2002. *Lipid rafts and little caves*. *Eur J Biochem* 269:737-752.
72. **Pike, L. J.** 2006. *Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function*. *J Lipid Res* 47:1597-1598.
73. **Calder, P., and P. Yaqoob.** 2007. *Lipid rafts-Composition, Characterization and controversies*. *J Nutr* 137:545-547.
74. **Simons, K., and R. Ehehalt.** 2002. *Cholesterol, lipid rafts, and disease*. *J Clin Invest* 110:597-603.
75. **Cherukuri, A., M. Dykstra, and S. K. Pierce.** 2001. *Floating the raft hypothesis: lipid raft play a role in immune cell activation*. *Immunity* 14:657-660.
76. **Kolesnick, R.** 2002. *The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway*. *J Clin Invest* 110:3-8.
77. **Lee, D., N. Jamgotchian, S. Allen, M. Abeles, and H. Ward.** 2008. *A lipid-protein hybrid model for tight junction*. *Am J Physiol Renal Physiol* 295:F1601–F1612.
78. **Castagne, D.** 2010. *Etude des interactions entre les cyclodextrines et les membranes liposomales ou biologiques*. In *Pharmacy*. University of Liège, Liège.
79. **Kotyńska, J., and Z. A. Figaszewski.** 2007. *Adsorption equilibria at interface separating electrolyte solution and phosphatidylcholine–stearylamine liposome membrane*. *Biophys Chem* 127:84-90.
80. **Elsayed, M., O. Abdallah, V. Naggar, and N. Khalafallah.** 2007. *Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research*. *Int J Pharm* 332:1-16.
81. **Bangham, A., M. Standish, and J. Watkins.** 1965. *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. *J Mol Biol* 13:283-252.
82. **Lasic, D.** 1995. *Handbook of Biological physics: Applications of liposomes*. Elsevier Sciences.

83. **Dietrich, C., L. A. Bagatolli, Z. N. Volovyk, N. L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, and E. Gratton.** 2001. *Lipid rafts reconstituted in model membranes.* Biophys J 80:1417-1428.
84. **Shailesh, S., S. Neelam, K. Sandeep, and G. Gupta.** 2009. *Liposomes: A review.* J Pharm res 2:1163-1167.
85. **Immordino, M., F. Dosio, and L. Cattel.** 2006. *Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential.* Int J Nanomedecines 1:297-315.
86. **Senior, J.** 1982. *Is half-life of circulating liposomes determined by changes in their permeability?* FEBS Lett 145:109-114.
87. **Allen, T., and F. Martin.** 2004. *Advantage of liposomal delivery systems for anthracyclines.* Semin Oncol 31:5-15.
88. **Arikan, S. and J. Rex.** 2001. *Nystan LF (Aronex/Abott).* Curr Opin Investig Drugs 2:488-495.
89. **Chen, W., and L. Huang.** 2005. *Non-viral vector as vaccine carrier.* Adv Genet 54:315-337.
90. **Tiwari, S., A. Goyal, N. Mishra, K. Khatri, B. Vaidya, A. Mehta, Y. Wu, and S. Vyas.** 2009. *Development and characterization of novel carrier gel core liposomes based transmission blocking malaria vaccine.* J Control Releas 140:157-165.
91. **Correa, S., V. Rivero, N. Yranzo-Volonté, M. Romero-Piffiguer, M. Ferro, and C. Riera.** 1993. *Effect of gangliosides in the autoimmune response induced by liposome-associated antigens.* Autoimmunity 15:195-200.
92. **Klibanov, A., K. Maruyama, V. Torchilin, and L. Huang.** 1990. *Amphiphatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes.* FEBS Lett 268:235-237.
93. **Kunisawa, J., and T. Mayumi.** 2001. *Application of novel drug delivery system, fusogenic liposomes, for cancer therapy.* Gan To Kagaku Ryoho 28:577-583.
94. **Kim, H., and Y. Park.** 2002. *Gene transfection by quantitatively reconstituted Sendai envelope proteins into liposomes.* Cancer Gene Ther 9:173-177.
95. **Gupta, B., T. Levchenko, and V. Torchilin.** 2005. *Intracellular delivery of large molecules and cell penetrating proteins and peptides.* Adv Drug Deliv Rev 57:637-651.

## REFERENCES

---

96. **Jesorka, A., and O. Orwar.** 2008. *Liposomes: Technologies and analytical applications.* J rev anal chem 1:801-832.
97. **Redziniak, G.** 2003. *Liposomes et peau: passé, présent, futur.* Pathol Biol 51:279-281.
98. **Arifin, D., and A. Palmer.** 2005. *Physical properties and stability mechanisms of poly(ethylene glycol) conjugated liposome encapsulated hemoglobin dispersions.* Artif. Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 33:137-162.
99. **Sakai, H., K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, and E. Tsuchida.** 2008. *Haemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers: present situation and future visions.* Intern Med 263:4-15.
100. **Düzgüneş, N.** 2009. *Methods in enzymology: Liposomes part G.* Academic Press, San Diego, USA.
101. **Edwards, K., U. Lipprandt, A. Ruplecker, U. Borchert, A. Rank, R. Schubert, and S. Förster.** 2005. *Direct preparation and loading of lipid and polymer vesicles using inkjets.* Small 1:1177-1180.
102. **Giozzi, A., A. Relini, and P. Chong.** 2002. *Structure and permeability properties of biomimetic membranes of bolaform archaeal tetraether lipids.* J Membr Sci 206:131-147.
103. **Gillet, A., A. Grammenos, P. Compere, B. Evrard, and G. Piel.** 2009. *Development of a new topical system: drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome.* Int J Pharm 380:174-180.
104. **Villiers, A.** 1891. *Sur la transformation de la fécule en dextrine par le ferment butyrique.* Compt Rend Fr Acad Sci 112:536-538.
105. **Schardinger, F.** 1911. *Kristallisierter Polysaccharide (Dextrine) aus Starkekleister durch Microben.* Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk Abt 29:188-197.
106. **Freudenberg, K., and R. Jacobi.** 1935. *Über Schardinger dextrine aus stärke.* Liebigs Ann Chem 518:102-108.
107. **Freudenberg, K., and F. Cramer.** 1948. *Die konstitution der Schardinger-dextrine  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ .* Z. Naturforsch 3b:464.
108. **French, D., A. Pulley, J. Effenberger, M. Rougvie, and M. Abdullah.** 1965. *Studies on the Sharding dextrines. XII. The molecular size and structure of the  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\zeta$ -, and  $\eta$ -dextrins.* Arch Biochem Biophys 111:153-160.
109. **Cramer, F.** 1954. *Einschlussverbindungen.*, Springer-Verlag, Berlin.
110. **Cyclolab.** <http://www.cyclolab.hu/>.

111. **Szente, L.** 2010. *Cyclodextrins in 2010: "Unusual" Harmony between science technology and industry.* 15th International Cyclodextrin Symposium, Vienna.
112. **Saenger, W.** 1980. *Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry.* Angew. Chem-Int Ed Eng 19:344-362.
113. **Frömming, K. H., and J. Szejtli.** 1994. *Cyclodextrins in pharmacy.* Kluwer Academic, Dordrecht.
114. **Szejtli, J.** 2004. *Past, present and future of cyclodextrin research.* Pure Appl Chem 76:1825-1845.
115. **Piel, G.** 2000. *Etude de l'interaction entre les cyclodextrines et le miconazole: application au développement d'une solution injectable et d'un gel cutané.* In Pharmacy. University of Liège, Liège.
116. **Loftsson, T., and D. Duchene.** 2007. *Cyclodextrins and their pharmaceutical applications.* Int J Pharm 329:1-11.
117. **Piel, G., M. Piette, V. Barillaro, D. Castagne, B. Evrard, and L. Delattre.** 2007. *Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes.* Int J Pharm 338:35-42.
118. **Castagne, D., M. Fillet, L. Delattre, B. Evrard, B. Nusgens, and G. Piel.** 2008. *Study of the cholesterol extraction capacity of  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models.* J Incl Phenom Macrocycl Chem 63:225-231.
119. **Singh, M., R. Sharma, and U. Banerjee.** 2002. *Biotechnological applications of cyclodextrins.* Biotechnol Adv 20:341-359.
120. **Fava, F., D. Di Gioia, L. Marchetti, and E. Fenyvesi.** 2002. *Randomly Methylated  $\beta$ -Cyclodextrins (RAMEB) Enhance the Aerobic Biodegradation of Polychlorinated Biphenyl in Aged-Contaminated Soils.* J Inclusion phenomena 44:417-421.
121. **Verstichel S., B. De Wilde, E. Fenyvesie, and J. Szejtli.** 2004. *Investigation of the aerobic biodegradability of several types of cyclodextrins in a laboratory-controlled composting test.* J of Polym and the Envi 12:1-10.
122. **Castagne, D., G. Dive, B. Evrard, M. Frédérich, and G. Piel.** 2010. *Spectroscopic studies and molecular modeling for understanding the interactions between cholesterol and cyclodextrins.* J Pharm Pharm Sci 13:362-377.
123. **Liu, L., and Q.-X. Guo.** 2002. *The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins.* J of Incl Phenom 42:1-8.

124. **Khalil, A.** 2004. *Etude de faisabilité de l'utilisation de molécule "cage" dans la pollution des sols : solubilisation et extraction de polluants organiques par les cyclodextrines.* In Chemistry. Institut National des Sciences Appliquées, Lyon.
125. **Castagne, D.** 2010. *Etude des interactions entre les cyclodextrines et les membranes liposomales ou biologiques.* In Pharmacy. University of Liège, Liège.
126. **Gabelica, V., N. Galic, and E. De Pauw.** 2002. *On the specificity of cyclodextrin complexes detected by electrospray mass spectrometry.* J Am Soc Mass Spectrom 13:946-953.
127. **He, Y., P. Fu, X. Shen, and H. Gao.** 2008. *Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy.* Micron 39:495-516.
128. **Messner, M., S. V. Kurkov, P. Jansook, and T. Loftsson.** 2010. *Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles.* Int J Pharm 387:199-208.
129. **Bonini, M., S. Rossi, G. Karlsson, M. Almgren, P. Lo Nostro, and P. Baglioni.** 2006. *Self-assembly of  $\beta$ -cyclodextrin in water. Part 1: Cryo-TEM and dynamic and static light scattering.* Langmuir 22:1478-1484.
130. **Gonzalez-Gaitano, G., P. Rodriguez, J. R. Isasi, M. Fuentes, G. Tardajos, and M. Sanchez.** 2002. *The aggregation of cyclodextrins as studied by photon correlation spectroscopy.* J Incl Phenom Macrocyclic Chem 44:101-105.
131. **Loftsson, T., A. Magnusdottir, M. Masson, and J. F. Sigurjonsdottir.** 2002. *Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs.* J Pharm Sci 91:2307-2316.
132. **Auerly-Velty, R., F. Djedaini-Pilard, S. Desert, B. Perly, and T. Zemb.** 2000. *Micellization of hydrophobically modified cyclodextrins. 1. Micellar structure.* Langmuir 16:3727-3734.
133. **Messner, M., S. V. Kurkov, R. Flavià-Piera, M. E. Brewster, and T. Loftsson.** 2011. *Self-assembly of cyclodextrins: The effect of the guest molecule.* Int J Pharm 408:235-247.
134. **French, D.** 1957. *The Schardinger dextrans.* Adv Carbohydr Chem 12:189-260.
135. **Loftsson, T., P. Jarho, M. Masson, and T. Jarvinen.** 2005. *Cyclodextrins in drug delivery.* Expert Opin Drug Deliv 2:335-351.
136. **Irie, T., and K. Zekama.** 1997. *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation.* J Pharm Sci 86:147-162.
137. **Piel, G., S. Moutard, E. Uhoda, F. Pilard, G. E. Pierard, B. Perly, L. Delattre, and B. Evrard.** 2004. *Skin compatibility of cyclodextrins and their derivatives: a*

- comparative assessment using a corneoxenometry bioassay.* Eur J Pharm Biopharm 57:479-482.
138. **Loftsson, T., and M. Masson.** 2001. *Cyclodextrins in topical drug formulation: theory and practice.* Int J Pharm 225:15-30.
139. **Weisse, S.** 2002. *Complexe cyclodextrine/ester de vitamine A: stabilisation, solubilisation et promotion de l'absorption cutanée.* In Pharmacy. Paris XI University, Paris.
140. **Szejtli, J.** 2003. *Cyclodextrins in the Textile Industry.* Starch 55:191-196.
141. **Hedges, A. R.** 1998. *Industrial Applications of Cyclodextrins.* Chem Rev 98:2035-2044.
142. **Hashimoto, H.** 2002. *Present Status of Industrial Application of Cyclodextrins in Japan.* J Inclusion Phenom Macrocyclic Chem 44:57-62.





# CHAPITRE I

## Quantification of Randomly-methylated- $\beta$ -cyclodextrin effect on liposome: An ESR study

A. Grammenos, M.A. Bahri, P.H. Guelluy, G. Piel, M. Hoebeke  
Biochemical and Biophysical Research Communications, 390 (2009) 5-9

---



## Introduction

Diverses techniques ont mis en avant l'extraction de cholestérol par la Rameb au sein de systèmes membranaires tels que les liposomes. La plus courante est la diffusion dynamique de lumière qui permet d'obtenir la distribution de taille des liposomes. L'intégrité membranaire des modèles cellulaires s'étudie également via la libération d'un fluorophore. Pourtant, aucune de ces techniques ne permet d'obtenir une quantification effective de l'extraction du cholestérol membranaire de manière non invasive. C'est pourquoi l'EPR, associée au marquage de spin, a été utilisée afin de résoudre ce problème.

## Résumé des résultats

### • Effet du cholestérol sur la microviscosité membranaire

La microviscosité membranaire a été sondée dans la partie hydrophile et hydrophobe de la membrane grâce respectivement aux sondes 5- et 16-DSA. Il a été démontré qu'à 25°C, le cholestérol augmentait la microviscosité au niveau de la partie hydrophile alors qu'il la diminuait dans la partie hydrophobe. L'effet est fonction de la concentration en cholestérol.

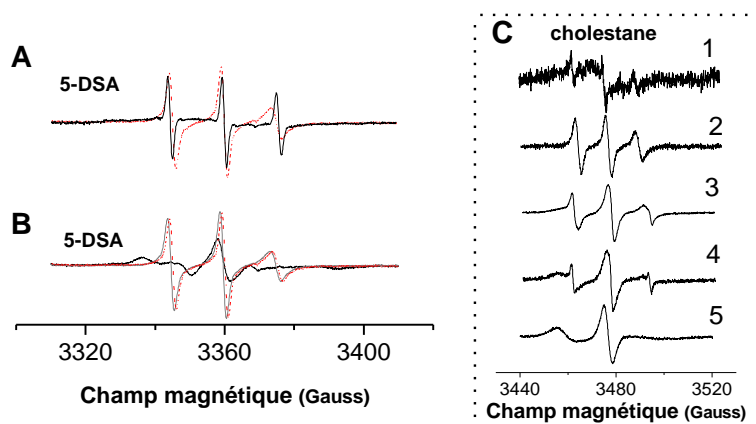
La microviscosité de liposomes dopés avec 30% de cholestérol ne change pas en fonction de la température. Ce résultat confirme que la présence de 30% de cholestérol dans la membrane liposomale abolit la transition de phase observée pour des liposomes non dopés.

La simulation des spectres EPR, réalisée suivant la méthode de Z. Arsov, a montré que les radicaux nitroxides du 16-DSA sondaient deux régions distinctes de la membrane. L'analyse des spectres simulés nous a permis de déduire que ce phénomène était lié à un repliement de la sonde au sein de la bicouche membranaire.

### • Effet de la Rameb sur les sondes EPR

Les liposomes ont été marqués par différentes sondes et mis en contact avec de la Rameb. L'analyse des spectres a mis en évidence une extraction des sondes n-DSA ainsi que de la sonde cholestane, dont l'architecture moléculaire est presque identique au cholestérol.

De plus, il a été observé que les sondes extraites par la cyclodextrine n'étaient pas libres dans la solution mais restreintes dans leur mouvement ce qui serait dû à la formation d'agrégats micellaires composés de Rameb et de sondes (figure 23).



5

Figure 23 : (A) Spectre du 5-DSA ( $10^{-2}$  M) dans du PBS (noir) et dans du PBS contenant 50 mM de Rameb (rouge). (B) Noir: spectre du 5-DSA ( $10^{-2}$  M) incorporé dans des liposomes. Gris: spectre du 5-DSA ( $10^{-2}$  M) incorporés dans des liposomes et ayant été mis en contact avec  $5 \cdot 10^{-2}$  M de Rameb. Rouge : Spectre de  $10^{-2}$  M de 5-DSA dissout dans du PBS contenant  $5 \cdot 10^{-2}$  M de Rameb. (C) Spectre de  $10^{-4}$  M cholestane dans du PBS (1); spectre du cholestane ( $10^{-4}$  M) dissout dans du PBS contenant 2.5 mM de Rameb (2) ; spectre du cholestane ( $10^{-4}$  M) incorporés à des liposomes dopés en cholestérol ayant été mis en contact avec  $3 \cdot 10^{-2}$  M de Rameb (3), avec  $2.5 \cdot 10^{-3}$  M de Rameb (4); spectre du cholestane ( $10^{-4}$  M) incorporé à des liposomes dopés en cholestérol (5).

• Effet de la Rameb sur la microvisité membranaire

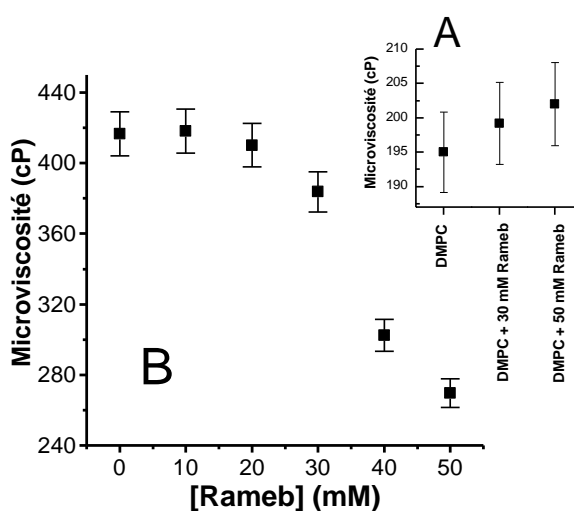


Figure 24 : Influence de la Rameb sur la microviscosité membranaire de liposomes de DMPC (A) ainsi que de liposomes de DMPC dopés en cholestérol (B).

Comme l'analyse des spectres EPR obtenus avec la sonde 16-DSA est complexe, l'effet de la Rameb sur la microviscosité membranaire a été étudié à l'aide des sondes 5-DSA.

Il a d'abord été montré que la Rameb ne modifiait pas de manière significative la microviscosité de liposomes formés uniquement de DMPC. Par contre, une diminution de microviscosité a été calculée pour des liposomes de DMPC dopés à 30 % avec du cholestérol. Cette fluidification est fonction de la concentration de la cyclodextrine mais seulement au delà de 20 mM (figure 24). Comme la microviscosité est directement reliée à la concentration de cholestérol dans la membrane, la quantité de cholestérol extrait par la Rameb a pu être quantifiée.

### **Conclusion**

Ce travail présente l'EPR, associée au spin labelling, comme une technique spectroscopique novatrice dans l'étude des interactions entre les cyclodextrines et les liposomes.

L'effet extracteur de cholestérol de la Rameb sur la membrane liposomale a été démontré et quantifié. L'étude des spectres EPR a également mis en évidence que le cholestérol extrait par la cyclodextrine n'était pas libre en solution mais sous forme d'agrégat avec la Rameb. Même si une affinité entre la Rameb et les molécules de DMPC a été pressentie (extraction des sondes n-DSA), celle-ci n'est pas assez forte pour induire une modification de microviscosité membranaire.

### ABSTRACT

In the present work, the effect of Randomly-methylated-beta-cyclodextrin (Rameb) on the microviscosity of dimyristoyl-L- $\alpha$  phosphatidylcholine (DMPC) bilayer was investigated using the Electron Spin Resonance (ESR) technique. The ability of Rameb to extract membrane cholesterol was demonstrated. For the first time, the percentage of cholesterol extracted by Rameb from cholesterol doped DMPC bilayer was monitored and quantified throughout a wide Rameb concentration range. The effect of cholesterol on the inner part of the membrane was also investigated using 16-doxy stearic acid spin label (16-DSA). 16-DSA seems to explore two different membrane domains and report their respective microviscosities. ESR experiments also establish that the presence of 30% of cholesterol in DMPC liposomes suppresses the jump in membrane fluidity at lipids phase-transition temperature (23.9°C).

## INTRODUCTION

Cyclodextrins (CDs) have a large field of applications including in cosmetic, food and pharmaceutical industry [1]. CDs are formed by six, seven or eight D-glucopyranose units named, respectively, as  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrin. These molecules are a truncated cone constituted by an internal hydrophobic cavity and an external hydrophilic surface. This particular structure confers to the CDs the ability to include a large number of organic molecules [2]. Methylated  $\beta$ -CDs are also well known for cholesterol and lipids extraction from both cell and monolayer membranes [2, 3]. Moreover, Randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrins (Rameb) are also known for their ability to penetrate through skin [4] and nasal mucosa [3].

Lipid vesicles such as liposomes are now routinely used not only as a good cell membrane model [5], but also as a medical drug vector [6, 7]. Recently, CDs have been described as a drug release modulator within liposomes [3]. The understanding of the mechanism of interaction between CDs and classical liposomes or liposomes doped with cholesterol would improve the potentiality and the efficiency of CDs in this new field of pharmaceutical applications.

Previous and recent researches have focused on the mechanism of action of the CD on liposomes and on the influence of the CD on physical stability as well as on the integrity of the vesicle bilayer [2, 8-11].

Some teams have also studied the mechanism of cholesterol removal by CD by means of a liposomal stability kinetic analysis [11, 12]. However, despite a wide range of methods explored, none, to the best of our knowledge, has been able to quantify precisely and in a noninvasive way the percentage of cholesterol extracted by the CD. Electron spin resonance (ESR) is not commonly used in the study of cyclodextrin. However this is a highly efficient technique able to give information concerning the structure and the dynamics of biological systems in a non-destructive way. Spin labelling fits well in with the study of membranes and particularly with the changes in lipid bilayer organisation induced by drug [13]. Nitroxide labelled fatty acid probes (n-DSA) can be useful for determining the order degree of the probe surrounding. Absolute values of microviscosity have been obtained after prior calibration of

the ESR spectra of nitroxide probes in solvent mixture of known microviscosity [14]. Microviscosity is then defined as the homogenous solution viscosity, which results in the same spectrum as that in the microenvironment [14]. In this work, we will show that ESR is a noninvasive, easy, rapid and reproducible method to quantify accurately the damage caused by cyclodextrin on liposomes doped in cholesterol.

In the present work, we have investigated the CD action in well-defined liposomes systems composed of only one sort of phospholipid and doped with a well-known percentage of cholesterol.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of liposomes labelled with n-DSA.

Stearic acid derivatives (Aldrich, USA) labelled by stable doxyl radical ring at the C-5 (5-DSA) or at the C-16 (16-DSA) position (counted from the carboxylic group of the stearic acid derivative) were used to study the membrane properties. The location of the spin labels (n-DSA) in liposomes is well known and it is established that 5-DSA explores the polar part of liposome while 16-DSA explores the hydrophobic core [15].

The n-DSA were added to a chloroform solution (Merck, Germany) of 5 mg/ml dimyristoyl-L- $\alpha$  phosphatidylcholine (DMPC) (Sigma, USA) which corresponded to a total lipid concentration of 7.4 mM. The probes were also added to a chloroform solution of a DMPC: Cholesterol (Merck, Germany) mixture (i.e. 70:30 mol %). The mixture consisted of a total lipid cholesterol concentration of 7.4 mM. The mixture was stirred for 5 min and the solvent was evaporated under vacuum. The formed lipid film was suspended in a phosphate buffer solution pH 7.0 (1/15 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, from Riedel-de Haën, Belgium) at a temperature above the DMPC phase-transition temperature (23.9 °C), and stirred by vortex mixer in order to obtain large multilamellar vesicles (MLV) [13]. After this hydration, five freeze-thaw cycles using liquid nitrogen were carried out to allow a better incorporation of the labelled stearic acid or cholesterol into the liposomes phospholipidic bilayers. The MLV suspensions were transferred into an extruder (Lipex Biomembrane, Canada), in which the unilamellar liposomes were formed by passing the suspensions through polycarbonate filters (0.1  $\mu$ m pore size, Nucleopore, CA), under a pressure up to 6895 Pa of nitrogen. The procedure was repeated ten times at a temperature above the phospholipids phase transition



temperature and it resulted in unilamellar liposomes with a mean size of about 90 nm and a very low polydispersity [16]. Randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrins (Rameb) kindly donated by Dr. G. Piel (Laboratory of pharmaceutical technology, Belgium) were dissolved in PBS solution and sterilized using an Acrodisc syringe filter of 22 mm (VWR, Belgium) in order to obtain a 35 mM stock solution. Liposomes were then incubated with Rameb at the desired concentration during 5 minutes.

### **Liposome preparation for microviscosity measurements.**

As the addition of beta-cyclodextrins to membranes is able to expulse phospholipids [3, 8, 9], and so n-DSA out of the membrane (see Results), a special protocol was used to measure liposomes microviscosity: liposomes without n-DSA were prepared as described above and then incubated with the desired Rameb concentration for one hour at 37° C. In order to remove the residual Rameb, liposomes solutions were ultra-centrifuged three times for two hours at 120000g. The resulting pellet was suspended in the buffer solution and incubated with  $10^{-4}$  M of DSA during 5minutes.

### **Preparation of liposomes labelled with cholestane.**

3 $\beta$ -Doxyl-5 $\alpha$ -cholestane (cholestane) (Sigma, USA) solubilized in chloroform was used as a probe to investigate liposomes membranes. Liposomes doped with 30% of cholesterol and not labeled with n-DSA were prepared as described above. Once created, the vesicles were incubated for 20 minutes with 0.1 mM of cholestane. The suspension was then incubated with Rameb in the desired concentration during 5 minutes.

### **ESR experimental conditions.**

All ESR experiments were performed at 9.5 GHz using a Bruker ESR 300E spectrometer (Bruker, Germany) equipped with a variable temperature controller accessory and operating at a centre field strength of 3360 G with 120 G as scan range, a modulation amplitude of 2.0 G and 20 mW microwave power. These parameters were used for all the liposomes containing different concentration of cholesterol.

### **ESR spectra simulation.**

The modelization of ESR n-DSA spectra was carried out according to the method presented by Arzov et al. [17, 18] while experimentally acquired spectra were simulated using

the software EPRSIM (version 4.99 2005) based on experimental data. The spectrum-simulation model assumes that each spectrum can be a superimposition of the spectral components that identify the membrane heterogeneity. Each component reflects the properties of a particular type domain which is highlighted by the values of the chosen parameter set. The set corresponds with order parameter  $S$ , effective rotational correlation time  $\tau_c$ , hyperfine and Zeeman tensor's polarity correction factors and weighting factors  $w$ . EPRSIM allowed to decompose a spectrum into at most five different spectral components.

### **Microviscosity determination.**

The simulated spectra were used to obtain  $\tau_c$  or  $S$ . These two values quantify the mobility of n-DSA in the explored medium (liposomes)[19]. They are expressed in function of the microenvironment's anisotropy. In the case of weakly to moderately immobilized probes ( $\tau_c < 3 \cdot 10^{-9}$  s),  $\tau_c$  is used, whereas, for strongly immobilized ones ( $\tau_c > 3 \cdot 10^{-9}$  s)  $S$  is better suited [19]. Recently we have established standard curves of microviscosity versus correlation time or order parameter that enable to convert measured parameters into membrane microviscosity [14]. Each measure was repeated at least four times and standard deviation of the microviscosity was calculated to be 4 %.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

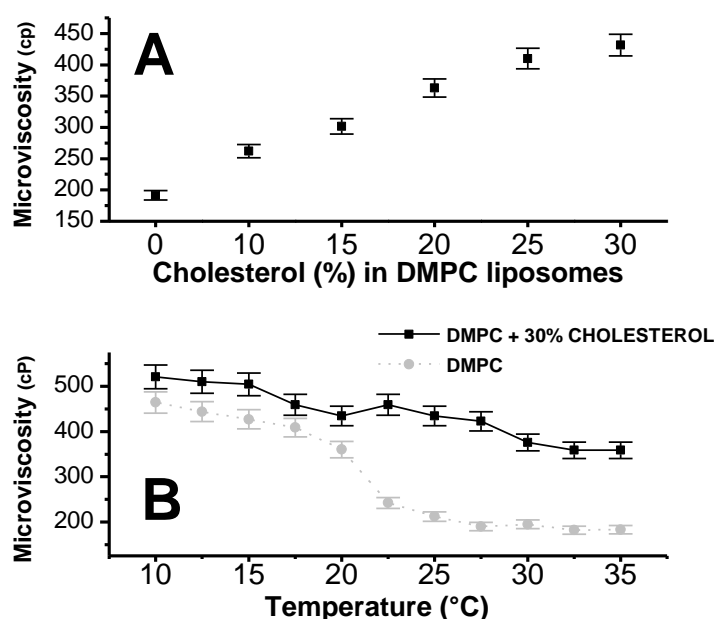
The n-doxyyl stearic acid spin labels (n-DSA) have been used as probes to investigate the membrane fluidity of liposomes at different depths at 25°C. ESR spectra were collected for both 5-DSA and 16-DSA probes. The first step was the evaluation of microviscosity changes induced by the incorporation of cholesterol in DMPC unilamellar liposomes.

### **Cholesterol effects on the hydrophilic part of the membrane.**

Local microviscosities of liposome membranes measured near the polar head group (5-DSA) were calculated using the  $S$  parameter.

Figure 1A shows the increase of the DMPC bilayer microviscosity induced by the addition of cholesterol at varying percentages. These results highlight the idea that cholesterol can act as a bulky group and that it reduces the mobility of phospholipids and DSA head groups, which consequently reduces the local fluidity.

The highest condensing effect of cholesterol on the membrane is observed for liposomes doped with 30% of cholesterol. Therefore, we used that value to assess the role of cholesterol on the microviscosity variation of liposomes related to the temperature. This finding is in agreement with previous works showing that cholesterol condenses the membrane above the transition temperature [13].



**Fig. 1. (A) Modification of microviscosity of liposomes bilayer in function of their cholesterol content. (B) Dotted line: influence of temperature on the microviscosity of DMPC liposomes. Full line: Influence of temperature on the microviscosity of (70:30 mol %) liposomes.**

Figure 1B shows both microviscosities explored by 5-DSA of DMPC bilayer doped or not with cholesterol in function of temperature. The microviscosity of (70:30 mol %) bilayer revealed a tidy linear decrease (Fig. 2. solid line) in function of temperature. However, no real microviscosity change was observed. On the contrary, for the DMPC liposomes, an abrupt decrease of microviscosity was observed near the gel-to-fluid transition temperature (23.9 °C) (Fig. 1B, dotted line). When the temperature ( $T > 25$  °C) raised over the transition temperature, the DMPC bilayer reached a lower and constant microviscosity value that is about 200 cP (Fig. 1B, dotted line).

These ESR experiments confirm that the presence of 30% of cholesterol in DMPC liposomes abolishes the endothermic transition of DMPC. These findings are in accordance with the fluorescent study of V.G. Bieri et al. [20].

### Cholesterol effects on the hydrophobic part of the membrane

The effect of cholesterol on the inner part of the liposome membrane was also investigated using 16-DSA at 24°C. Thanks to its nitroxide radical brought on by the doxyl stearic acid chain at the sixteenth carbon position, 16-DSA explores the hydrophobic part of the bilayer [13]. ESR spectra of 16-DSA incorporated inside liposomes were simulated.

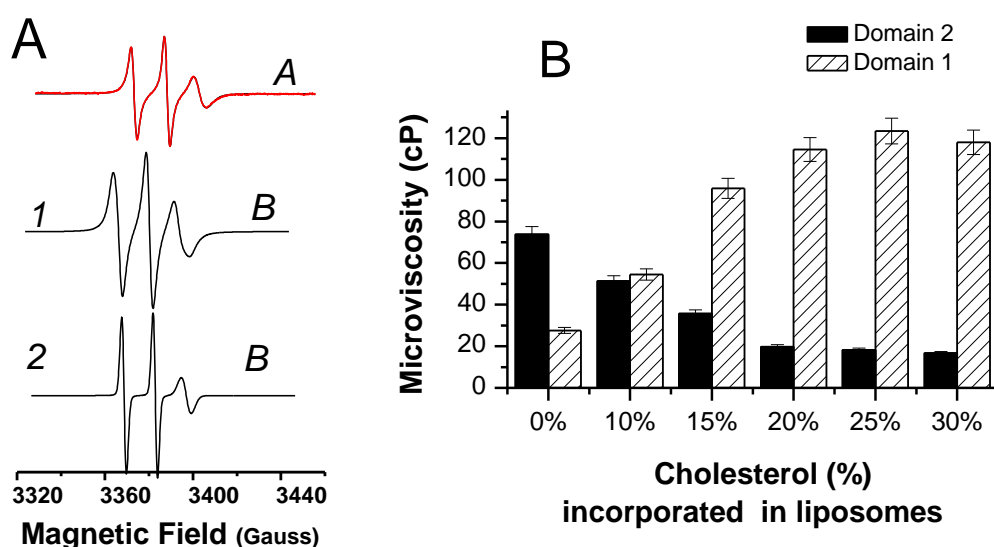


Fig. 2. (A) A: Typical ESR spectrum of 16-DSA in the bilayer of (90:10 mol %) liposomes. Black line: experimental spectrum. Red line: the best fit to the experimental spectrum, taking into account the superimposition of spectra of two coexisting domains shown in Fig B. B: computer simulation of the specific spectra of the two coexisting domains: 1; first domain ( $S=0.19$ ,  $\tau_c = 0.69$  ns,  $W = 1.88$ ), 2; second domain ( $S = 0.02$ ,  $\tau_c = 1.11$  ns,  $W = 0.33$ ). (B) The columns represent the influence of cholesterol on the microviscosity of the two coexisting domains explored by the 16-DSA.

Figure 2A (A) (black line) shows the 16-DSA experimental spectrum inside DMPC liposomes doped with 10% of cholesterol. Superimposed in red on the Figure 2A (A), we set the best fit to the experimental spectrum. To obtain the best simulation, we were obliged to consider that 16-DSA were in two different areas. Figures 2A (B1 and B2) show the spectra of the two components of the simulation. Each component corresponds to domains which have two distinct microviscosities. The existence of these two microdomains explored by the

16-DSA remains valid whatever the percentage of cholesterol inside the lipid bilayer is (even 0%) (Fig. 2B). ESR results confirm that 16-DSA explores mainly the hydrophobic part of the bilayer but has a non-zero probability of being located in the bilayer polar part. Indeed it has been shown that the 16-DSA probe is oriented and linked like the lipids in the membrane and is flexible in DMPC liposomal membrane. This flexibility leads to a change in the radical position: the fatty acid chain tilts and carries the radical nitroxide closer to the polar head group [21, 22].

Figure 2B shows the evolution of the microviscosities of the two microdomains in function of the increase of the percentage of cholesterol (from 0% to 30 %) in DMPC liposomes. At 25°C, the microviscosities sensed by 16-DSA in these two microdomains varies differently in function of the cholesterol incorporation. In the first microdomain, microviscosity increases from 27.6 to 198 cP. Inversely, for the second microdomain microviscosity decreases from 73.8 to 16.7 cP. A possible explanation could be that the more cholesterol is embedded in the membrane the closer the probe (which is in the “tilt” mode) is of the bulky cholesterol steroid and the more it perceives a stiffening of the membrane. That leads to an increase of microviscosity as for the 5-DSA. We can assume that cholesterol condenses the top of the membrane where steroid rings take place and lets more freedom to the end of the phospholipidic carbon chain which is very flexible [23]. This could be an explanation of the second microviscosity of the nitroxide which is positioned deeper into the membrane and so could sense its microviscosity lessening due to the increase of carbon chains disorder.

From Figure 2B we can also notice that the microviscosity of each domain explored by 16-DSA is always lower than the microviscosity near the polar head group region explored by 5-DSA. This observation is in accordance with the fact that even if 16-DSA is able to tilt, the nitroxide always remains positioned deeper in the membrane. It concords with the fact that 16-DSA gives information about the hydrophobic part of the membrane which is more fluid than the hydrophilic part [24]. To summarize, 16-DSA is a flexible probe able to give informations on a microdomain positioned deep in the membrane (extended probe) but also on a microdomain close to the polar head group (bended probe). This last microdomain is still deeper than the microdomain explored by the 5-DSA. Both microdomains are sensitive to the cholesterol presence in the membrane. The complex analysis of the microviscosities explored

by the 16-DSA probe will not allow an interpretation of the Rameb action on liposomes as easily as for the 5-DSA probe.

### Rameb effects on n-DSA and cholestane probes

Our method relies on the presence of probes in the bilayer. In this section all liposomes were formed with 30% of cholesterol. We were first interested in studying the possible action of the Rameb on n-DSA and cholestane which is a membrane spin label with a chemical structure similar to cholesterol.

The comparison between the spectrum of probes (cholestane and n-DSA) dissolved in PBS and probes solubilized in PBS containing Rameb shows a significant difference especially for the n-DSA (Fig. 3A and Fig. 3C: spectrum 1 and 2).

Indeed, the spectrum of probes in PBS containing Rameb is asymmetric and distorted (Fig. 3A: dotted line and Fig 3C: spectrum 2). Our results show that a higher amount of cyclodextrin (from 0 to 50 mM) in the PBS solution induces a higher distortion in the n-DSA spectrum (see supplementary data). These kinds of spectra are typical of the n-DSA embedded in micelles structures [25].

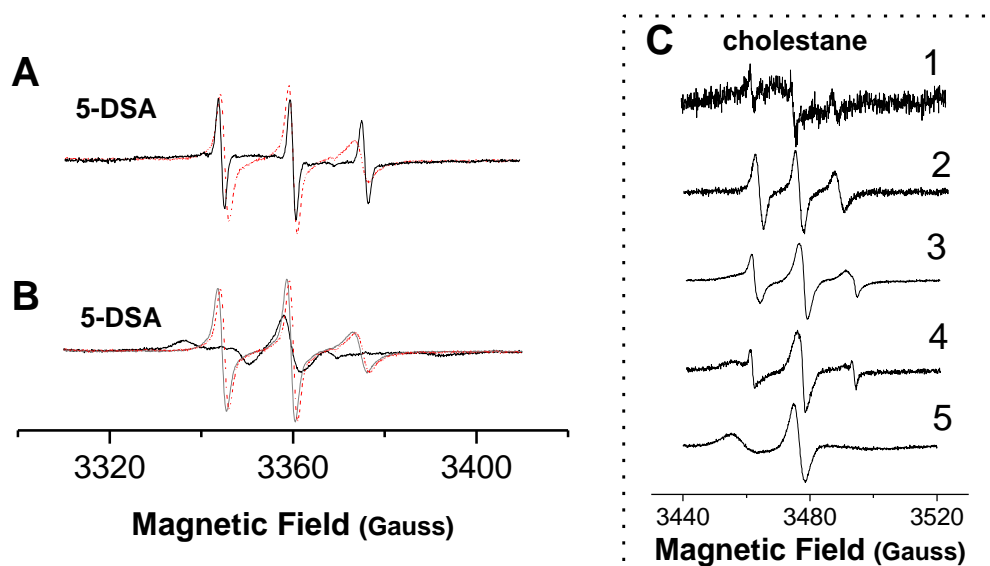


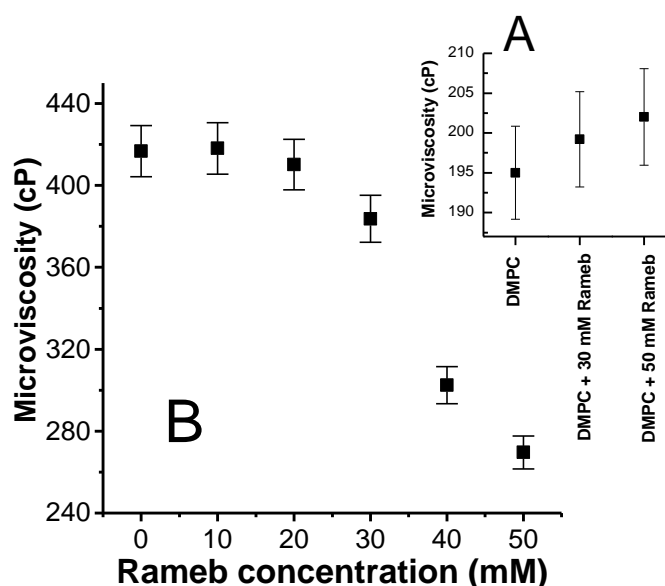
Fig. 3. (A) Full line: typical spectrum of 0.01M 5-DSA in PBS. Dotted line: spectrum of 0.01M 5-DSA dissolved in PBS containing 50 mM Rameb. (B) Black line: spectrum of 0.01M 5-DSA in DMPC liposomes bilayer. Gray line: spectrum of 0.01M 5-DSA in DMPC liposomes bilayer and in contact with 50 mM Rameb. Red dotted line: spectrum of 0.01M 5-DSA dissolved in PBS containing 50 mM Rameb. (C) 1; spectrum of 10<sup>-4</sup> M cholestane in PBS. 2; spectrum of cholestane (10<sup>-4</sup> M) distilled in PBS containing 2.5 mM of Rameb. 3; ESR spectrum of 10<sup>-4</sup> M cholestane after preincubation with 30 mM Rameb on liposomes (70:30 mol %). 4; ESR spectrum of 10<sup>-4</sup> M cholestane after preincubation with 2.5 mM Rameb on liposomes (70:30 mol %). 5; spectrum of 10<sup>-4</sup> M cholestane incorporated in liposomes (70:30 mol %).

Figure 3B (full line) and Figure 3C [5] respectively show the ESR spectrum of 5-DSA and cholestane in lipid bilayer at 25°C. Both spectra are characteristic of the spin label strongly immobilized in the membranes. The addition of increasing concentrations of Rameb to DMPC liposomes containing probes induces 3-line ESR spectra (Fig. 3B and Fig. 3C: spectrum 3 and 4).

The resulting ESR spectrum is similar to those obtained with probes solubilized in PBS containing Rameb. We can also notice that the extraction of cholestane probes from the bilayer increases with Rameb concentration (Fig. 3C: spectrum 3 and 4). Our results show that Rameb is able to extract cholestane and n-DSA initially embedded in the liposomal membrane in a dose- dependant manner. The extracted probes are not free in solution but aggregate with Rameb in a micellar structure. This behaviour is in perfect agreement with the literature data [26].

### Rameb effects on the microviscosity of the microdomain explored by 5-DSA

As Rameb is able to extract phospholipids [3, 8, 9] like n-DSA probes from the vesicle, we have first studied the influence of this phospholipidic extraction on the microviscosity.



**Fig. 4. (A) Influence of Rameb on microviscosity of DMPC liposome membrane. (B) Microviscosity change induced by different Rameb concentration on the membrane of liposomes (70:30 mol %). Vesicles have been in contact with Rameb during one hour at 37°C.**

Figure 4A shows that the addition of Rameb did not modify significantly the microviscosity of DMPC bilayer. Even if we pay attention to this little microviscosity variation, we observe a restriction of the probes movement (corresponding to a microviscosity increase). As Rameb is not known for penetrating into the membrane bilayer [26], the increase of microviscosity can not result from a congestion of the CD at the polar head group. So, the variation could be due to the phospholipids extraction by cyclodextrin leading to a reduction of the vesicle size. This reduction compacts the phospholipids and consequently decreases the movement of probes.

Figure 4B shows the variation of (70:30 mol %) bilayer microviscosity as a function of Rameb concentration. The addition of Rameb up to  $2 \times 10^{-2}$  M into liposomes at 25 °C did not modify significantly the microviscosity. However, above this concentration range, a clear decrease of bilayer microviscosity was observed. Our results mentioned above show that the microviscosity modification does not result from lipids extraction by Rameb. So, this microviscosity modification observed in Figure 4B can only result from a cholesterol extraction. Figure 1A shows clearly that microviscosity is directly correlated with cholesterol concentration in the bilayers. The combined analysis of Figure 1A with Figure 4B allows us to estimate the cholesterol remaining inside the bilayers after Rameb effect. After one hour of 0, 30, 40 and 50 mM Rameb exposure, we obtain liposomes containing respectively 30% (2.22 mM), 22% (1.63 mM), 15% (1.11 mM) and 10% (0.74 mM) cholesterol.

## CONCLUSION

In this work, we have confirmed the ability of Rameb to extract cholesterol. Aggregates resulting from this extraction were observed. Moreover, for the first time, our experimental method allows to quantify the amount of cholesterol extracted by Rameb as a function of its added concentration.

These results clearly show that ESR is a reproducible technique which presents the advantage to explore the membrane bilayer in a non-invasive way. Therefore any drug action able to modify the cholesterol content of a membrane can easily be studied and quantified by this method.



## ACKNOWLEDGEMENTS

A special thanks to Zoran Arsov, from the Department of Solid State Physics (“Jozef Stefan” Institute, Ljubljana, Slovenia), for his advices in term of expert knowledge in the field of evolutionary optimization. The autors also thank Mr Mouithys Mickalad and Ms Deby for their contstructive advices and for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- [1] Thorsteinn Loftsson, Cyclodextrin in skin delivery, *Cosmetics and Toiletries*, 115 (10) (2000) 59-66.
- [2] G. Piel, M. Piette, V. Barillaro, D. Castagne, B. Evrard, L. Delattre, Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrin and their effect on the integrity of liposomes, *Int. J. Pharm* 338 (2007) 35-42.
- [3] L. Boulmedarat, G. Piel, A. Bochot, S. Lesieur, L. Delattre, and E. Fattal, Cyclodextrin-Mediated drug release from liposomes Dispersed Within a Bioadhesive Gel, *Pharm. Res.*, 22(6) (2005) 962-970.
- [4] G. Piel, S. Moutard, E. Uhoda, F. Pilard, G.E. Piérard, B. Perly, L. Delattre, B. Evrard, Skin Compatibility of cyclodextrins and their derivative: a comparative assessment using a corneoxenometry bioassay, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 479-482.
- [5] Xue-Ying Liu, Qing Yang, Naoki Kamo, June Miyake, Effect of liposome type and membrane fluidity on drug–membrane partitioning analyzed by immobilized liposome chromatography, *J. Chromatogr. A.*, 913 (2001): 123-131.
- [6] K. Vrhovnik, J. Kristl, M. Sentjerc, and J. Smid-Korbar, Influence of Liposome Bilayer Fluidity on the transport of Encapsulated Substance into the Skin as Evaluated by EPR, *Pharm. Res.*, 45 (4) (1998) 525-530.
- [7] A.S.L. Derycke, P. A.M. de Witte, Liposomes for photodynamic therapy, *Adv. Drug Delivery Rev.* 56 (2004) 17-30.
- [8] I. Puskas, F. Csempesz, Influence of cyclodextrin on the physical stability of DPPC-liposomes, *Colloids Surf. B*, 58 (2007) 218-224

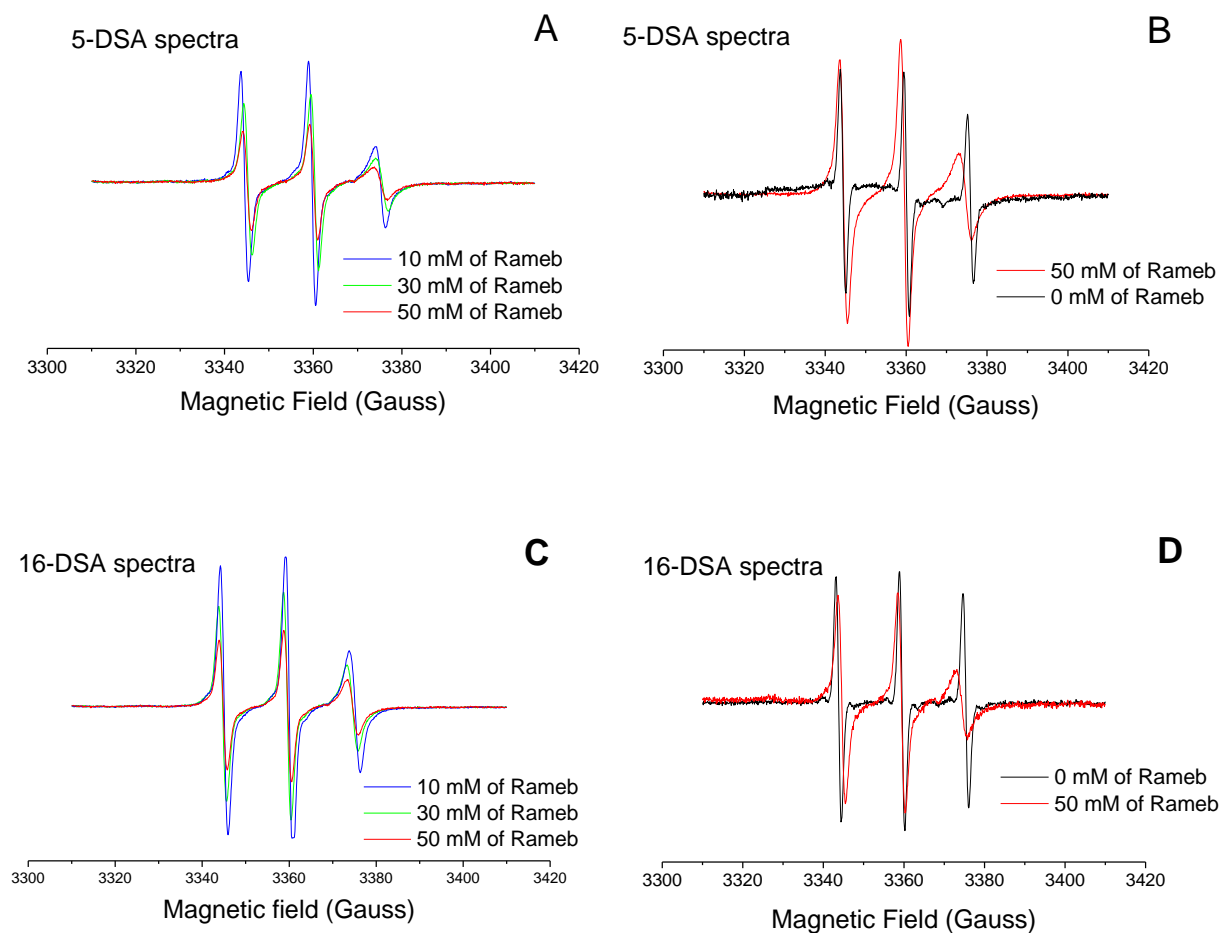
- [9] G. Piel, M. Piette, V. Barillaro, D. Castagne, B. Evrard, L. Delattre, Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposomes: The effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics, *Int. J. Pharm* 312 (2006) 75-82.
- [10] P. Hatzi, S. Mourtas, P.G. Klepetsanis, S.G. Antimisiaris, Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: Effect of liposome type and lipid composition, *International Int. J. Pharm* 333 (2007) 167-176.
- [11] I. Puskas, L. Barcza, L. Szente and F. Czempesz, Features of the interaction between Cyclodextrins and Colloidal Liposomes, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 54 (2006) 89-93.
- [12] R. Zidovets and I. Levitan, Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies, *Biochim Biophys Acta.* 1768(6) (2007) 1311-1324.
- [13] L. Coderch, J. Fonollosa, M. De Pera, J. Estelrich, A. De La Maza, J.L. Parra, Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR Relationship with percutaneous absorption, *J. Controlled Release* 68 (2000) 85-95.
- [14] M.A. Bahri, B.L. Heyne, P. Hans, A.A. Mouithys-Mickalad, M.D. Hoebeke, Quantification of lipid bilayer effective microviscosity and fluidity effect induced by propofol, *Biophys. Chem.* 114 (2005) 53-61.
- [15] P. Jost, L.J. Libertini, V.C. Hebert, O.H. Griffith, Lipid spin labels in lecithin multilayers. A study of motion along fatty acid chains, *J. Mol. Biol* 59 (1971) 77-98.
- [16] F. Olson, C.A. Hunt, F.C. Szoka, W.J. Vail, D. Papahadjopoulos, Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes, *Biochim Biophys Acta.* 557 (1979) 9-23.
- [17] Z. Arzov and J. Strancar, Determination of Partition Coefficient of Spin Probe between Different Lipid Membrane Phases, *J. Chem. Inf. Model.* 45 (2005) 1662-1667
- [18] J. Strancar, T. Kocklic, Z. Arzov, B. Filipic, D. Stopar and M.A. hemminga, Spin Label EPR-Based Characterization of Biosystem Complexity, *J. Chem. Inf. Model.* 45 (2005) 394-406.
- [19] H.M. McConnell, W.L. Hubell, Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 314-326.
- [20] V.G. Bieri, D.F. Wallach, Fluorescence quenching in lecithin and lecithin/cholesterol liposomes by paramagnetic lipid analogues. Introduction of a new probe approach. , *Biochim Biophys Acta* 389 (3) (1975) 413-427.

- [21] PC Jost, L.J. Libertini, V.C. Hebert, O.H. Griffith, Lipid spin labels in lecithin multilayers. Motion along fatty acid chains, *J. Mol. Biol.* 59(1) (1971) 77-98.
- [22] M. Hoebeke, A. Seret, J. Piette and A. Van de Vorst, Destruction of stearic acid nitroxyl radicals mediated by photoexcited merocyanine 540 in liposomal and micellar system, *J. Biochem.* 32 (1993) 2730-2736
- [23] R. Costanzo, T. De Paoli, J.E. Ihlo and A.A. Hager, ESR study of order and dynamics in lecithin liposomes with high cholesterol content, *Spectrochim. Acta A*: 50 (2) (1994) 203-208
- [24] M. Hoebeke, M. Enescu and L. Lindqvist, Quenching of merocyanine 540 triplet state by nitroxyl radicals in liposomal systems: a laser flash photolysis study, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 22 (1994) 229-233
- [25] M.A. Bahri, M. Hoebeke, A. Grammenos, L. Delanaye, N. Vandewalle, A. Seret, Investigation of SDS, DTAB and CTAB micelle microviscosities by electron spin resonance, *Colloids Surf. A* 290 (2006) 206-212.
- [26] Mileo, P. Franchi, R. Gotti, C. Bendazzoli, E. Mezzina and M. Lucarini, An EPR method for measuring the rate of distribution of organic substrates between cyclodextrin, micelles and water, *Chem. Commun.* (2008) 1311-1313



## Supplementary data

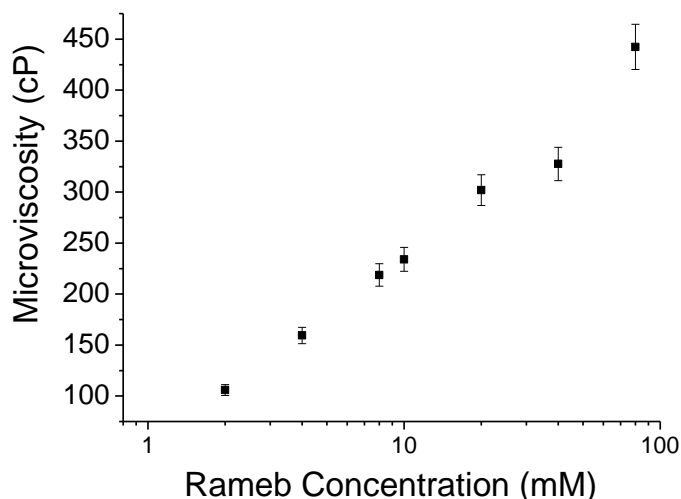
Figure 25 shows the n-DSA spectra dissolved in PBS and containing different concentrations of Rameb (from 10 to 50 mM).



**Figure 25:** (A & B) ESR spectra of 5-DSA ( $10^{-2}$  M) in PBS containing different concentration of Rameb (0, 10, 30 and 50 mM); (C & D) ESR spectra of 16-DSA ( $10^{-2}$  M) in PBS containing different concentration of Rameb (0, 10, 30 and 50 mM).

A significant evolution of the ESR spectrum is observed when Rameb is added in the solution: the peaks of the n-DSA spectrum become larger in a Rameb dose-dependent way involving a decrease of the probe correlation time. This is characteristic of a progressive probe restriction movement. An explanation of these results could be that a formation of mixed aggregates (made of n-DSA and cyclodextrins) becomes larger in a Rameb dose dependent way. This is in accordance with the literature (1).

Previous work done in the laboratory highlights that correlation time is directly linked to the microviscosity of the probe's microenvironment (2). Figure 26 points out the microviscosity increase obtained for the 5-DSA spectrum dissolved in PBS and Rameb as concentration increases from 0 to 80 mM.



**Figure 26: Microviscosity calculated on ESR spectrum of 5-DSA ( $10^{-2}$  M) diluted in PBS containing increasing concentrations of Rameb (0-80 mM).**

If we make the assumption that the aggregates are spherical, we can calculate their size from the Stokes law, where the correlation time ( $\tau_c$ ) is related to a sphere of radius  $a$ :

$$\tau_c = \frac{4 \pi \eta a^3}{3 k T}$$

$\eta$  is the viscosity of the PBS solution;  $k$  represents the Boltzman constant and  $T$  is the room temperature. Consequently, a diameter aggregate size from  $1.52 \pm 0.28$  to  $2.01 \pm 0.37$  nm was determined for respectively 1.5 and 80 mM of Rameb.

1. **Messner, M., S. V. Kurkov, P. Jansook, and T. Loftsson.** 2010. *Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles*. Int J Pharm 387:199-208.
2. **Bahri, M. A., B. J. Heyne, P. Hans, A. E. Seret, A. A. Mouithys-Mickalad, and M. D. Hoebeke.** 2005. *Quantification of lipid bilayer effective microviscosity and fluidity effect induced by propofol*. Biophys Chem 114:53-61.

## CHAPITRE II

# ESR technique for noninvasive way to quantify cyclodextrins effect on cell membranes

A. Grammenos, A. Mouithys-Mickalad, P.H. Guelluy, M. Lismont, G. Piel  
M. Hoebeke

Biochemical and Biophysical Research Communications, 398 (2010) 350-359

---





## Introduction

Après avoir montré l'utilité de l'EPR dans l'étude des effets de la Rameb sur les liposomes, nous avons voulu aller plus loin et proposer d'appliquer cette technique sur des cellules. Il est connu que la Rameb extrait du cholestérol au sein des membranes cellulaires. Cependant, la plupart du temps, la quantité de cholestérol extraite est quantifiée en analysant le surnageant des cellules mises en contact ; ce mode opératoire ne permet pas de différencier le cholestérol effectivement extrait des cellules et emprisonné dans les cyclodextrines, de celui contenu dans les cellules mortes (ou lysées) flottant dans le surnageant. D. Castagne a très récemment évité ce problème grâce à un protocole permettant de mesurer le cholestérol résiduel au niveau des monocouches cellulaires. Mais cette méthode peut s'avérer fastidieuse car elle nécessite l'extraction du cholestérol cellulaire, ce qui prend du temps. Ce travail présente donc une fois de plus l'EPR, associée au marquage de spin, comme nouvelle technique permettant d'obtenir des quantifications rapides et *in vitro* sur l'extraction de cholestérol par la Rameb au sein des membranes cellulaires.

## Résumé des résultats

### • Effet de la Rameb sur les sondes EPR

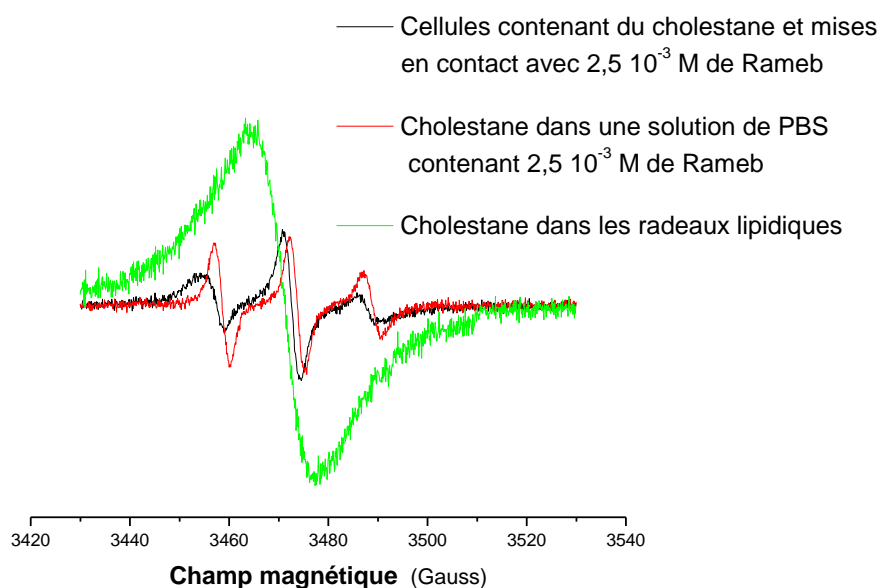


Figure 27 : Influence de la Rameb sur les sondes cholestane ( $10^{-4}$  M).

Tout comme pour les liposomes, une extraction des sondes 5- DSA, dépendant de la concentration en Rameb, a été observée sur les membranes cellulaires. Grâce à l'analyse des meilleures simulations spectrales (tout comme présenté dans le chapitre précédent), on a pu réaliser une quantification de leur extraction. L'analyse montre également que le 5-DSA extrait forme des agrégats micellaires avec la Rameb.

L'analyse des spectres EPR du cholestane montre que celui-ci se positionne au sein des radeaux lipidiques de la membrane. Cette sonde, comme cela a déjà été exposé dans le chapitre précédent, est également extraite en fonction de la concentration de Rameb pour former des agrégats.

### • Effet de la Rameb sur la microvisité membranaire

Il a été calculé que la Rameb diminuait la microviscosité membranaire en fonction du temps d'incubation et de sa concentration. Un dosage en cholestérol des membranes cellulaires a permis de démontrer la corrélation directe entre la microviscosité membranaire et le pourcentage de cholestérol compris dans les membranes (figure 28).

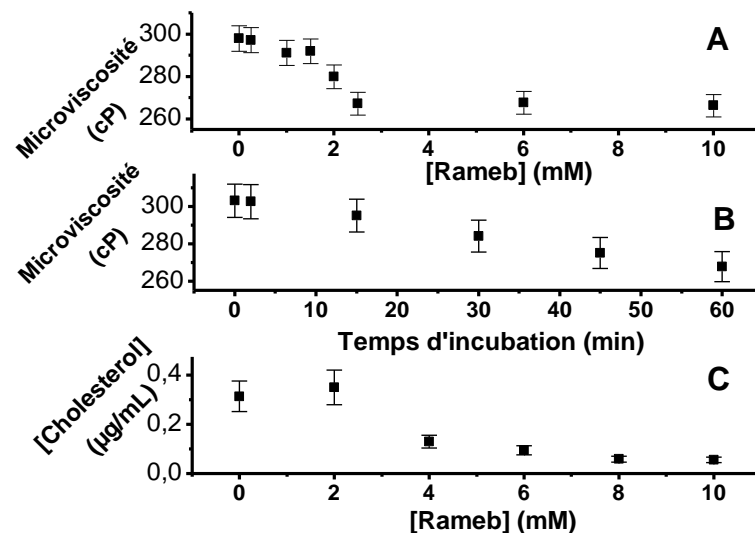


Figure 28 : Influence de la concentration de Rameb (après une heure d'incubation à 37°C) (A) et du temps d'incubation de la Rameb ( $6 \cdot 10^{-3}$  M) (B) sur la microviscosité membranaire. (C) Cholesterol résiduel contenu dans les cellules HCT-116 ayant été traitées à différentes concentrations de Rameb pendant une heure à 37°C.

## Conclusion

Ce travail révèle que l'action de cyclodextrines au sein des membranes cellulaires peut être étudiée de manière non invasive grâce à la technique de RPE. Cet article s'est plus particulièrement attaché à l'étude de la Rameb sur des cellules cancéreuses du colon. Les résultats obtenus sont similaires à ceux du chapitre précédent. A savoir : la Rameb extrait le cholestérol d'autant plus que sa concentration croît, et la molécule extraite n'est pas sous forme libre, mais sous forme d'agrégat avec la cyclodextrine. Même si une extraction phospholipidique a également été pressentie, elle n'a pas d'influence sur la microviscosité membranaire qui est directement reliée au pourcentage de cholestérol inclus dans la membrane cellulaire.

L'extraction du cholestérol en fonction du temps par la Rameb a également été quantifiée. De plus, l'étude des spectres EPR des sondes de cholestane a montré que cette dernière réside dans des microdomaines type raft et que la Rameb était capable de l'extraire d'autant plus que la concentration de la cyclodextrine est élevée. Vu la structure chimique similaire du cholestérol et du cholestane, ce travail en déduit que la cyclodextrine extrait du cholestérol logé dans les radeaux lipidiques. Tout comme les résultats exposés dans le chapitre précédent, les sondes extraites par la Rameb forment des agrégats.

### ABSTRACT

A new way to study the action of cyclodextrin was developed to quantify the damage caused on cell membrane and lipid bilayer. The Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy was used to study the action of Randomly-methylated-beta-cyclodextrin (Rameb) on living cells (HCT-116). The relative anisotropy observed in ESR spectrum of nitroxide spin probe (5-DSA and cholestane) is directly related to the rotational mobility of the probe, which can be further correlated with the microviscosity. The use of ESR probes clearly shows a close correlation between cholesterol contained in cells and cellular membrane microviscosity. This study also demonstrates the Rameb ability to extract cholesterol and phospholipids in time- and dose- dependent ways. In addition, ESR spectra enabled to establish that cholesterol is extracted from lipid rafts to form stable aggregates. The present work supports that ESR is an easy, reproducible and non invasive technique to study the effect of cyclodextrins on cell membranes.

## INTRODUCTION

Cyclodextrins (CD) are widely used in the pharmaceutical field and known for their ability to increase the aqueous solubility and the chemical stability of different drugs [1, 2]. There are three types of natural CDs which are formed by six, seven or eight D-glucopyranose units denominated respectively as  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD. These molecules look like truncated cones constituted by an inner internal hydrophobic cavity and a hydrophilic surface. Among them,  $\beta$ -CD derivatives ( $\beta$ -CDs) are known to possess the efficacy to make complexes with several drugs [1]. Within this family, the randomly methylated  $\beta$ -CD derivative (Rameb) has received much attention and has shown a great pharmaceutical interest as it's efficient for its ability to penetrate through nasal mucosa [3] and skin [4].

Therefore, Rameb can readily enter in the composition of different nasal spray (for instance estradiol nasal spray sold as Aerodiol<sup>®</sup> in Europe). Even if this kind of CDs is one of the most studied and commercialized for its ability to enhance drug delivery, Rameb might still be of a great interest when investigating various membranes.

Numerous works have demonstrated that the plasma membrane contains different domains [5-9], indicating that membranes cannot be defined by only the fluid mosaic model as described by Singer and Nicholson [10]. Recently, it was highlighted that cholesterol distribution in the membrane is heterogeneous and concentrated in cholesterol- and sphingomyelin-rich domains (lipid rafts). These lipid rafts are involved in significant cell function and can be isolated in the form of patches resistant to cold non ionic detergent [5, 11].

However, the existence of these domains is still the subject of an intense debate in the scientific community and their morphology, size, density and molecular composition are also under consideration. Known for their cholesterol affinity, the  $\beta$ -CDs like Rameb [3, 12] may interact with lipid rafts and could become an interesting tool to understand the function of lipid rafts.

The most common way to quantify the cholesterol depletion due to  $\beta$ -CDs is to make a lipid extraction and use a cholesterol assay kit [13]. In order to obtain the percentage of cholesterol into the membrane rafts which are identified as low density membrane fraction, a separation of these domains is generally realized by a sucrose gradient (with or without detergent extraction) [14]. One of the main disadvantages of the cholesterol extraction is that

different amounts of cholesterol are obtained depending on the experimental protocol used to isolate the membrane [14]. Electron Spin Resonance (ESR) is a unique technique able to provide information about the structure and the dynamics of biological systems in a non invasive way [15]. However, despite this great advantage, no study has been undertaken by ESR to accurately investigate the interaction between  $\beta$ -CDs and membranes. The present work demonstrates that ESR is an easy and reproducible technique to quantify the damage caused by the  $\beta$ -CDs and could be a new advantageous tool for a better understanding of these actions on cell membrane.

## MATERIAL AND METHODS

### Cell cultures.

The human colon carcinoma (HCT-116) cell line was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Belgium) supplemented with 10% foetal calf serum (Invitrogen, Belgium), 2 mM of L-glutamine, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 U/ml) (Invitrogen, Belgium) and was maintained in a humidified 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cells were not used at passages higher than 20.

### Exposure of HCT-116 cells to Randomly methylated $\beta$ -cyclodextrin (Rameb).

Cells from two T175 flasks (90% confluent) were collected by trypsinization, centrifuged for 7 minutes at 240g and suspended in 10 ml of medium (DMEM) containing Randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin (Rameb) which was sterilized by filtration in aseptic conditions at desired concentration. The cells ( $15 \times 10^6$ ) were then incubated at 37 °C for one hour in a humidified atmosphere with 5% of CO<sub>2</sub>. Rameb was obtained from Wockes Chemie GmbH (Munich, Germany)

### Cell viability.

After one and two hours of Rameb incubation (10 mM), as described above, cells were centrifuged for 5 minutes at 200 x g and the pellet was resuspended in 10 mM of fresh DMEM. The cell viability was then determined using both a Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, Germany) and the Trypan blue dye exclusion assay.

In order to perform the WST-1 cell-viability assay according to the manufacturer instructions [16], the cells ( $10^4$  cells by well by 100 $\mu$ l) were placed in microtiter plates (10 minutes after

one hour period of incubation). Absorbance of the colored formazan was determined using an automated microplate reader at 450 nm wavelength. The mean absorbance of control wells (cells not incubated with Rameb) represented 100% cell viability. Viability of cells treated with Rameb was measured in triplicate and compared to the absorbance of control cells.

### **Cell sample preparation for ESR measurements.**

It is known that addition of  $\beta$ -CDs to membrane models expels phospholipids [3, 17, 18]. Consequently stearic acid derivative labelled by stable doxyl radical ring (n-DSA) is also expelled out of the cell membrane (see results, Fig.1). This property helped us to define an appropriate protocol in order to measure the microviscosity. The one-hour incubation of cells with Rameb (as described above) was ended by centrifugation for 5 minutes at 200 x g. After dilution of the cell pellet in 1 ml of sterile phosphate buffer saline solution (PBS), an amount of stearic acid derivative labelled by stable doxyl radical ring at the C-5 level (5-DSA)(Aldrich, USA) was added to achieve  $10^{-4}$  M concentration and incubated less than 5 minutes. A 5-DSA stock solution was first obtained in ethanol ( $10^{-2}$  M) and the added 5-DSA solution was less than 1% of total volume. Final solutions were then transferred into a quartz cell (500  $\mu$ l) for ESR measurements.

3 $\beta$ -Doxyl-5 $\alpha$ -cholestane (cholestane) (Sigma, USA) dissolved in chloroform was also used as a probe on HCT116 membranes. In these experiments, collected and centrifuged cells ( $15 \times 10^6$ ) were suspended in 1ml of PBS containing  $10^{-4}$  M cholestane and incubated for 10 minutes. The incubation was ended by the addition of sterilized stock Rameb solution ( $10^{-1}$  M in PBS) to achieve the final concentration of  $2.5 \times 10^{-3}$  M. HCT116 suspensions were then transferred into a quartz flat ESR cell.

### **Liposome preparation.**

Lipid vesicles were prepared from Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) (Sigma, USA) and cholesterol (CHOL) (Merck, Germany). Made from DMPC: CHOL (70:30 mol %), the liposomes were prepared by hydration of lipid films. Briefly, the required amount of lipids (3.51 mg/ mL of DMPC and 0.86 mg/mL of CHOL) was dissolved in chloroform. The total lipid cholesterol concentration was 7.4 mM. The mixture was then stirred for 5 min and the solvent was evaporated under vacuum. The resulting lipid film was suspended in PBS pH 7.0 (1/15 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, from Riedel-de Haën, Belgium) at 35 °C, and stirred by vortex mixer in order to obtain large multilamellar vesicles (MLV) [19]. The MLV

suspensions were transferred into an extruder (Lipex Biomembrane, Canada), in which the unilamellar liposomes were formed by passing the suspensions through polycarbonate filters (0.1  $\mu\text{m}$  pore size, Nucleopore, CA), under a pressure up to 6895 Pa of nitrogen (Air Liquid, Belgium). The procedure was repeated ten times at 35°C and resulted in unilamellar liposomes [20]. Once the liposomes were made, cholestane (stock solution in chloroform ( $10^{-1}$  M)) was added and the final solution ( $10^{-4}$  M) was then transferred for ESR experiments.

### **ESR experimental conditions.**

All ESR experiments were performed at 9.56 GHz using a Bruker ESR 300E spectrometer (Bruker, Karlsruhe-Germany) equipped with a variable temperature controller accessory and operating at center field strength of 3480 G with 100 G as sweep width, modulation amplitude of 2.55 G and 20.2 mW microwave power. The time constant and the conversion time were respectively 2.56 and 163.84 ms. Three scans were acquired for each measurement.

### **ESR spectra simulation.**

ESR n-DSA modelling spectra were carried out according to the method reported by Arsov and al. [21, 22]. The experimentally acquired spectra were simulated using the software EPRSIM (version 4.99 2005). The spectrum-simulation model assumes that each spectrum can be a superimposition of the spectral components that identify the membrane heterogeneity. Each component reflects the properties of a particular domain type which is highlighted by the values of the chosen parameter set. This one corresponds to order parameter  $S$ , effective rotational correlation time  $\tau_c$ , hyperfine and Zeeman tensor's polarity correction factors and weighing factors  $w$ .

### **Microviscosity determination.**

The mobility of n-DSA in the explored medium (liposomes and HCT-116 cells) was quantified by order parameter ( $S$ ) as described in point 2.4. In the case of weakly to moderately immobilized probes ( $\tau_c < 3 \cdot 10^{-9}$  s)  $\tau_c$  is used, whereas, for strongly immobilized labels ( $\tau_c > 3 \cdot 10^{-9}$  s),  $S$  is better suited [23, 24]. Previously established standard curves of microviscosity versus correlation time or order parameter [25] were used to convert measured parameters into membrane microviscosity. Each measure was repeated at least five times and microviscosity standard deviation was calculated to be 3 %.



**Membrane cholesterol measurement.**

Cells from two T175 flasks (90% confluent) were collected by trypsinization, centrifuged for 7 minutes at 240 g and suspended in 10 ml DMEM containing Rameb sterilized by filtration in aseptic conditions at desired concentration. The cells ( $15 \times 10^6$ ) were then incubated at 37 °C for one hour in a humidified atmosphere with 5% of CO<sub>2</sub>. The one-hour incubation was ended by centrifugation during 5 minutes at 200 x g in order to remove the Rameb. The cell pellet was then suspended in DMEM to be able to count the required amount of cells to perform a lipidic extraction. Briefly, cells (750 000) were put in contact with 300 µl of 1% Triton distilled in water. After 5 minutes of incubation, 1.8 ml of a chloroform /methanol (2:1) mixture was added. The mixture was stirred for 10 minutes. To obtain a good phase separation, 300 µl of Tris (0.2M) at pH 6.5 was added, and the mixture was centrifuged for 10 minutes (240 g) at 37°C. To isolate the lipidic phase, the chloroform phase was recovered and evaporated under a flow of nitrogen. The membrane cholesterol levels were then measured using an Amplex Red Cholesterol Assay Kit according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes). Briefly, the membrane fractions were dissolved within 800 µl of buffer (PBS, pH 7.4) then incubated with Amplex Red reaction mixture for 30 min at 37 °C and analyzed using a fluorimeter with an excitation wavelength of 570 nm and emission wavelength of 590 nm.

**RESULTS AND DISCUSSION****Cell viability study**

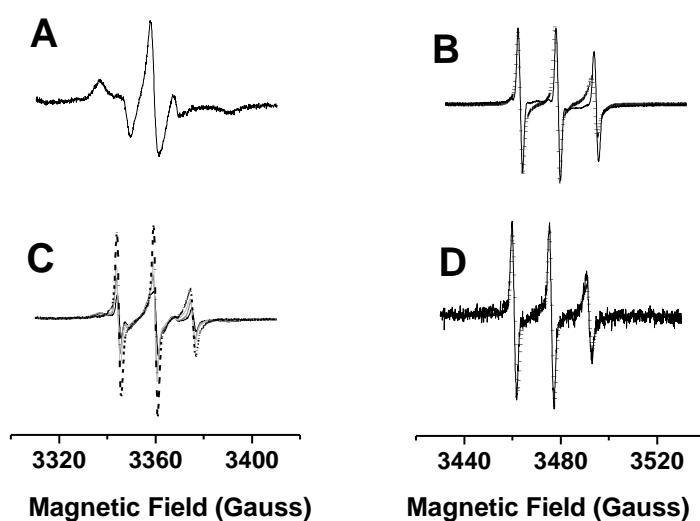
Based on WST-1 assay, fluorometric measurements revealed that the cell viability was more than 94% after an incubation of the highest concentration of Rameb (10 mM) for one and two hours (data not shown). Moreover, at the concentration used to obtain an optimized ESR signal ( $10^{-4}$  M 5-DSA), no cytotoxic effect of the spin probe was observed (98% of cell viability). These results were also confirmed by Trypan blue exclusion assay. It is important to notice that another type of cell could reveal much higher mortality with similar concentration of Rameb [13]

### Effects of Rameb on 5-DSA probe

Stearic spin labels (5-DSA) were used as probes to analyze the interaction between Rameb and the cell membrane fluidity. Spectrum on Figure 1A is characteristic of a probe which invested the hydrophilic cell membrane compartment at 25°C [26].

Figure 1B highlights the affinity of the 5-DSA with the Rameb. Indeed, a significant difference has been observed between the probe spectrum in PBS (Figure 1B, full line) and the one obtained for 5-DSA in PBS containing Rameb (Figure 1B, dotted line) which is asymmetric and distorted; such a spectrum is characteristic of probe aggregates in micelle structures as previously reported [17, 27, 28].

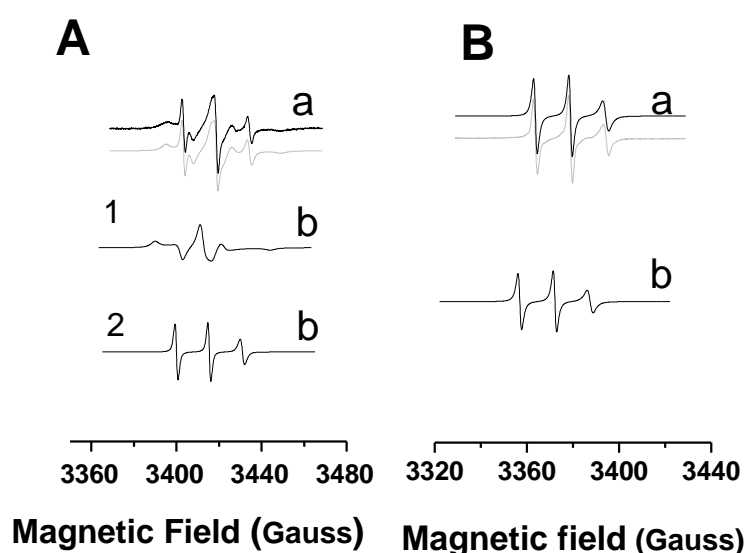
The addition of increasing concentrations of Rameb (1.5, 2, 6 and 10 mM respectively) to HCT-116 cells containing 5-DSA induces a progressive transformation of the ESR spectrum (Figure 1C) which tends to be similar to the spectrum shown in figure 1B (dotted line).



**Fig. 1.** Rameb influence on 5-DSA ESR spectra: (A) 0.001 M 5-DSA in cells membrane. (B) 0.001 M 5-DSA dissolved in PBS (full line) or in PBS containing 10 mM of CD (dotted line). (C) Spectral ESR evolution of 5-DSA initially embedded in cell membranes and incubated with 1.5 mM (black line), 2 mM (gray line), 6 mM (light gray line) and 10 mM of Rameb (dotted line). (D) ESR spectrum of 5-DSA in the supernatant of cells incubated with 10 mM of CD (full line) and 5-DSA solubilised in PBS containing 10 mM of CD.

This result reveals that the Rameb affinity with 5-DSA is strong enough to lead to the extraction of all the probes initially embedded in the membrane bilayer and that the extracted probe is not free in solution but aggregates in micellar structure. This was confirmed by the analysis of the ESR spectrum of the cell supernatant that has been in contact with Rameb (Figure 1D, full line) which is similar to the 5-DSA spectrum in PBS and containing Rameb (Figure 1D, dotted line).

Figure 1C also puts in evidence that 5-DSA are extracted in a dose-dependent way. Indeed, the highest the Rameb concentration is, the most intense the three peaks of the ESR spectrum are.



**Fig. 2.** ESR spectra of 5-DSA in the supernatant of cells being in contact with 1.5 mM (A) and 10 mM of Rameb (B) . (a) black line: experimental spectrum. Gray line: the best fit to the experimental spectrum, taking into account the superimposition of possible coexisting domains shown in (b). (b) A: computer simulation of the specific spectra of the two coexisting domains explored by the 5-DSA: 1; first domain ( $S = 0.906$ ,  $\tau = 0.419$  ns  $W= 0.702$ ), 2; second domain ( $S=0.631$ ,  $\tau= 0.557$  ns,  $W=1.714$ ). (b) B: computer simulation of the specific spectrum of the only one domain ( $S= 0.028$ ,  $\tau= 0.557$  ns,  $W= 0.728$ ) explored by the probe.

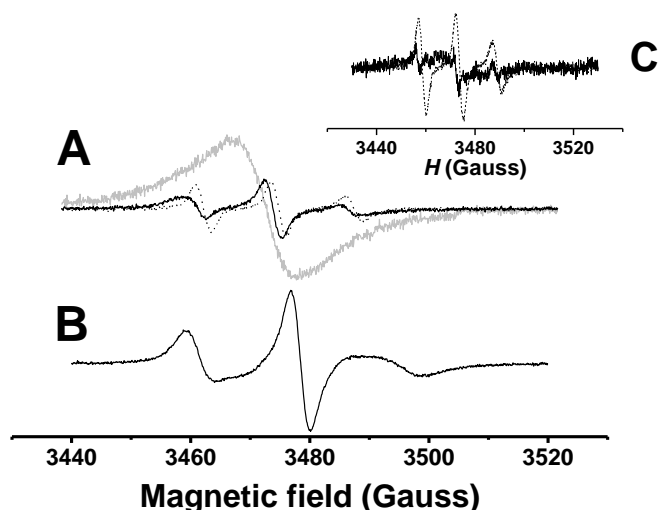
A spectral simulation has been done to confirm this behaviour (Figure 2A<sub>a</sub> and 2B<sub>a</sub>, gray line). The simulated spectrum of 5-DSA incorporated into cell membranes, which were in contact with 1.5 mM of Rameb, corresponds to the addition of two components

characteristic of two different domains. The first one (Fig 2A<sub>1b</sub>) corresponds to probes embedded into the cell membrane and the second domain (Fig 2 A<sub>2b</sub>) to probes extracted from the cell membrane and aggregated within micelles (20% for this Rameb concentration). The spectral simulation obtained with cell membranes in contact with 10 mM of Rameb has only one component indicating that all the probes are extracted from the membrane (Figure 2B<sub>b</sub>). This result is consistent with the fact that Rameb acts in a dose-dependent manner.

### Effects of Rameb on cholestane probes

The ESR spin labelling method relies on the presence of probes inside the bilayer. The n-DSA spin label (which has almost the same behaviour as the phospholipids) has been first used, confirming that the Rameb is able to interact with them. To better apprehend the CDs action on membranes another kind of probe has been used: the cholestane, a membrane spin label with a chemical structure similar to cholesterol.

Figure 3A shows the ESR spectrum of cholestane embedded in cell membrane (light gray line). The large distorted peak observed results in an important spin-spin nitroxide interaction favoured by a high local concentration of cholestane.



**Fig. 3. (A) :** ESR spectra of cholestane (0.1 mM) in cell membrane (gray line), in cell membrane being in contact with 2.5 mM of CD (black line) and solubilised in PBS containing 2.5 mM of CD. **(B):** Spectrum of cholestane (0.1 mM) embedded in liposomal bilayer (70:30 mol %). **C :** Spectra of cholestane (0.1 mM) solubilised in PBS (black line) and in PBS containing 2.5 mM of Rameb (dotted line).

Available knowledge indicates that cellular membranes manage their vast chemical diversity by sorting into specialized microdomains [29] which are referred to under the general heading of lipid raft. Cholesterol plays a fundamental role in maintaining their structure and function [30]. The cholestane spin probe probably lies close to each other in these lipid rafts, leading to this kind of self-broadening.

To support this hypothesis, DMPC liposomes doped with 30% percent of cholesterol and containing cholestane have been prepared (Figure 3B). These structures have been made to incorporate the cholesterol uniformly in the membrane (no raft). The corresponding ESR spectrum is reported in Figure 3B; no broad peak as in figure 3A is observed indicating that probes are not close to each other like in cell membrane. This result tends to confirm that cholesterol might be organized in rafts within cell membrane and that cholestane like cholesterol has an affinity for these microdomains. As probe and cholesterol have almost similar chemical structure, the cholestane probably reflects the cholesterol behaviour.

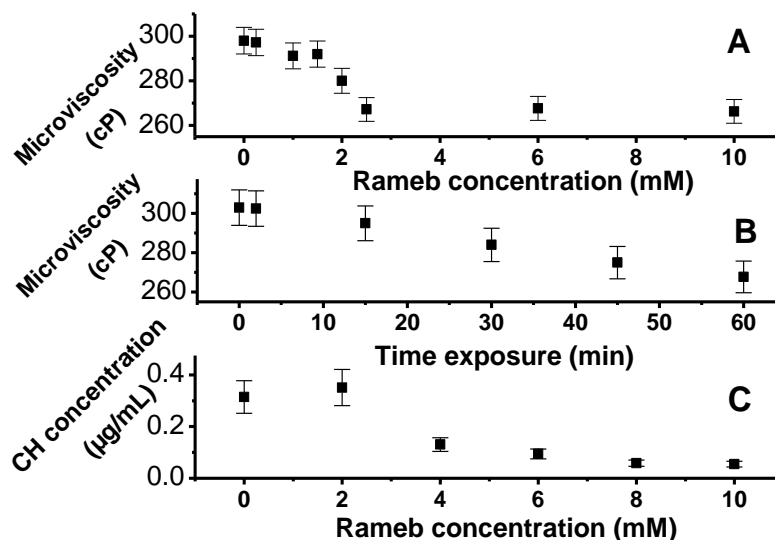
The evolution of probe ESR spectrum in cells incubated with Rameb (Figure 3A) clearly demonstrates that cholestane is no more embedded in membrane. The resulting spectrum is close to the spectrum of cholestane solubilised in PBS containing Rameb (Figure 3C dotted line). The difference between cholestane ESR spectrum in PBS and the one obtained in PBS containing Rameb (Figure 3C) reflects once again the ability of Rameb to form micellar aggregates with the probes. To sum up, ESR results show that Rameb not only extracts different components from the plasma membrane to form stable aggregates but it is also able to interact with lipid rafts.

### **Effects of Rameb on membrane microviscosity**

As cholesterol and phospholipids are essential constituents of the membrane, their extraction ought to necessarily affect the degree of order of the bilayer, and so the microviscosity.

Figure 4A shows the microviscosity sensed by 5-DSA probes incorporated in HCT116 cell membrane in function of the Rameb concentration. In the absence of Rameb, the microviscosity measured on HCT116 membrane, near the polar head group, is 298 cP. This value decreases as the Rameb concentration increases and stabilizes when reaching 265 cP at

$2.5 \times 10^{-3}$  M of cyclodextrin. Up to  $10^{-2}$  M of Rameb, the microviscosity remains nearly constant.



**Fig. 4. (A) Influence of various concentrations of Rameb on the microviscosity of HCT 116 membranes. Cells have been in contact with the CD during 1h at 37°C. (B) Influence of 6 mM Rameb time exposure on microviscosity of cell membranes. (C) Residual cholesterol content of HCT 116 after treatment with Rameb for 1h at 37°C.**

Figure 4B puts in evidence the microviscosity sensed by 5-DSA probes incorporated in HCT116 cell membrane as a function of time exposure for unique Rameb concentration of 6 mM. It appears that the more the cyclodextrin is in contact with the cells the more the microviscosity is low. A linear decrease of 35 cP is measured during the first hour. In order to correlate this microviscosity decrease with the membrane cholesterol extraction, the membrane cholesterol concentration was measured using a cholesterol assay kit.

Figure 4C shows that the cholesterol concentration of cells without Rameb is  $0.31 \pm 0.06$  µg/mL. This concentration decreases when cells were incubated in presence of Rameb. Beyond an exposure of 6mM of CD, the cholesterol level remains nearly constant ( $0.054 \pm 0.011$  µg/mL). The comparison between figures 4A and 4C clearly shows that the microviscosity and the cellular concentration of cholesterol decrease with a similar Rameb dose dependence, supporting the hypothesis that the membrane microviscosity is directly linked to the cholesterol cell concentration. ESR microviscosity results corroborate our

previous work using liposomes as a membrane model and confirm that the cholesterol extraction due to the Rameb is the major cause of the membrane microviscosity decrease [17].

## CONCLUSION

This study allows to confirm the ability of Rameb to extract cholesterol and 5-DSA in cells in a dose-dependent way. ESR results demonstrate that the extracted cholesterol and 5-DSA formed stable aggregates and that the lipid rafts microdomains are damaged by the CD. Moreover, this work shows that the membrane microviscosity is directly linked to the cholesterol content of the cell. Interestingly, based on our ESR results, Rameb appears as efficient agent to extract cholesterol depending on time and concentration. In summary, this study has demonstrated that ESR is an easy and reproducible tool able to give a lot of information on the ability of a drug to interact with cell membranes.

## ACKNOWLEDGEMENTS

A special thanks to Zoran Arsov, from the Departement of Solid State Physics (“Jozef Stefan” Institute, Ljubljana, Slovenia), for his advices in terms of expert knowledge in the field of evolutionary optimization.

## REFERENCES

- [1] T. Loftsson and M. E. Brewster, Pharmaceutical application of Cyclodextrins. 1. Drug solubilisation and Stabilization, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 1017-1024.
- [2] T. Loftsson, Cyclodextrin in skin delivery, *Cosmetics and toiletries*, 115 (10) (2000) 59-66.
- [3] L. Boulmedarat, G. Piel, A. Bochot, S. Lesieur, L. Delattre, and E. Fattal, Cyclodextrin-Mediated drug release from liposomes Dispersed Within a Bioadhesive Gel, *Pharm. Res.*, 22 (2005) 962-970.

- [4] G. Piel, S. Moutard, E. Uhoda, F. Pilard, G.E. Piérard, B. Perly, L. Delattre, B. Evrard, Skin Compatibility of cyclodextrins and their derivative: a comparative assessment using a corneoxenometry bioassay, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 479-482.
- [5] K. Simons and E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387 (1997) 569-572.
- [6] L D. Zajchowski and S. M. Robbins, Lipid rafts and little caves, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 737-752.
- [7] W K. Subczynski and A. Kusumi, Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy, *Biochem. Biophys. Acta* 1610 (2003) 231-243.
- [8] M.G. Rivas, A.M. Gennarlo, Detergent resistant domains in erythrocyte membranes survive after cell cholesterol depletion: an EPR spin label study, *Chem. Phys. Lipids* 122 (2003) 165-169.
- [9] K. Kawasaki, W.K. Subczynski, J.S. Hyde and A. Kusumi, Pulse EPR Detection of Lipid Exchange between Protein-Rich Raft and Bulk Domains in the membrane: Methodology Development and Its Application to Studies of Influenza Viral Membrane, *Biophys. J.* 80 (2001) 738-748.
- [10] S.J. Singer and GL. Nicholson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Sciences* 175 (1972) 720-731.
- [11] N.M. Hopper, Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae, *Mol. Membr. Biol.* 16 (1999) 145-156.
- [12] G. Piel, M. Piette, V. Barillaro, D. Castagne, B. Evrard and L. Delattre, Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrin and their effect on the integrity of liposomes, *Int. J. Pharm.* 338 (2007) 35-42.
- [13] D. Castagne, M. Fillet, L. Delattre, B. Evrard, B. Nusgens and G. Piel, Study of the cholesterol extraction capacity of  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 63 (2008), 225-231.
- [14] R. Zidovetzki and I. Levitan, Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 1311-1324.
- [15] K. Witold, Subczynski and A. Kusumi, Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labelling and single optical microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1610 (2003) 231-243.



- [16] H. Suttmann, M. Retz, F. Paulsen, J. Harder, U. Zwergel, J. Kamradt, B. Wullich, G. Unteregger, M. Stöckle and J. Lehmann, Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells, *BMC Urol.* 8 (2008) 1-7.
- [17] A. Grammenos, M.A. Bahri, P.H. Guelluy, G. Piel and M. Hoebeke, Quantification of Randomly-methylated- $\beta$ -cyclodextrin effect on liposome: An ESR study, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390 (2009) 5-9.
- [18] G. Piel, M. Piette, V. Barillaro, D. Castagne, B. Evrard, L. Delattre, Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposomes: The effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics, *Int. J. Pharm.* 312 (2006) 75-82.
- [19] L. Coderch, J. Fonollosa, M. De Pera, J. Estelrich, A. De La Maza, J.L. Parra, Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR Relationship with percutaneous absorption, *J. Controlled Release* 68 (2000) 85-95.
- [20] F. Olson, C.A. Hunt, F.C. Szoka, W.J. Vail and D. Papahadjopoulos, Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes, *Biochim. Biophys. Acta.* 557 (1979) 9-23.
- [21] Z. Arsov and J. Strancar, Determination of Partition Coefficient of Spin Probe between Different Lipid Membrane Phases, *J. Chem. Inf. Model.* 45 (2005) 1662-1667.
- [22] Z. Arsov, M. Schara, M. Zorko and J. Strancar, The membrane lateral domain approach in the studies of lipid-protein interaction of GPI-anchored bovine erythrocyte acetylcholinesterase, *Eur. Biophys. J.* 33 (2004) 715-725.
- [23] H.M. McConnell, W.L. Hubell, Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 314-326.
- [24] N.S.P. Deo, Electron spin resonance study of phosphatidylcholine vesicles using 5-doxyl stearic acid, *Colloids Surf. B*, 25 (2002) 225-232.
- [25] M.A. Bahri, B.J. Heyne, P. Hans, A.E. Seret, A.A. Mouithys-Mickalad and M. D. Hoebeke, Quantification of lipid bilayer effective microviscosity and fluidity effect induced by propofol, *Biophys. Chem.* 114 (2005) 53-61.
- [26] L. Coderch, J. Fonollosa, M. De para, J. Estelrich, A. De La Maza, J.L. Parra, Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR Relationship with percutaneous absorption, *J. Controlled Release* 68 (2000) 85-95.
- [27] E. Mileo, P. Franchi, R. Gotti, C. Bendazzoli, E. Mezzina and M. Lucarini, An EPR method for measuring the rate of distribution of organic substrates between cyclodextrin, micelles and water, *Chem. Commun.* (2008) 1311-1313.

- [28] M.A.Bahri, M. Hoebeke, A. Grammenos, L. Delanaye, N. Vandewalle, A.Seret, Investigation of SDS, DTAB and CTAB micelle microviscosities by electron spin resonance, *Colloids Surf. A* 290 (2006) 206-212.
- [29] L.Weglarz, A. Koceva-Chyla, K. Gwodzdziński, Z. Dzierzewicz, Z. Jozwiak, Evaluation of hydralazine and procainamide effects on fibroblast, *Biochem. J.*, 85 (2003) 549-556.
- [30] D.H. Nguyen and D. Taub, Cholesterol is essential for macrophage inflammatory protein 1b binding and conformation integrity of CC chemokine receptor 5, *Blood* 12 (2002) 4298-4360.

## CHAPITRE III

# Investigation of the interaction between cyclodextrin and DMPC liposomes: a small angle neutron scattering study.

A. Grammenos, A. Joset, M. Hoebeke, B. Leyh  
Manuscrit soumis (European Biophysics Journal)

---



## Introduction

Dans les précédents chapitres, une affinité entre les phospholipides de DMPC et la Rameb a été pressentie mais n'a pu être mise en évidence de manière directe par spectroscopie RPE. C'est pourquoi la technique de diffusion de neutrons aux petits angles (Small-Angle Neutron Scattering SANS) a été appliquée à un système composé de Rameb et de liposomes constitués uniquement de DMPC. Une modélisation des sections efficaces macroscopiques expérimentales de diffusion neutronique a été mise au point. Cette dernière a permis une analyse fine et détaillée de l'action de la Rameb (de 0 à 30 mM) sur les paramètres structuraux des liposomes. Une étude en diffusion quasi-élastique de lumière (DLS) a également été menée afin de vérifier la concordance des deux approches expérimentales. Le travail a été réalisé à deux températures distinctes : 14 et 34 °C, c'est-à-dire respectivement dans les phases gel et fluide de la membrane liposomale.

## Résumé des résultats

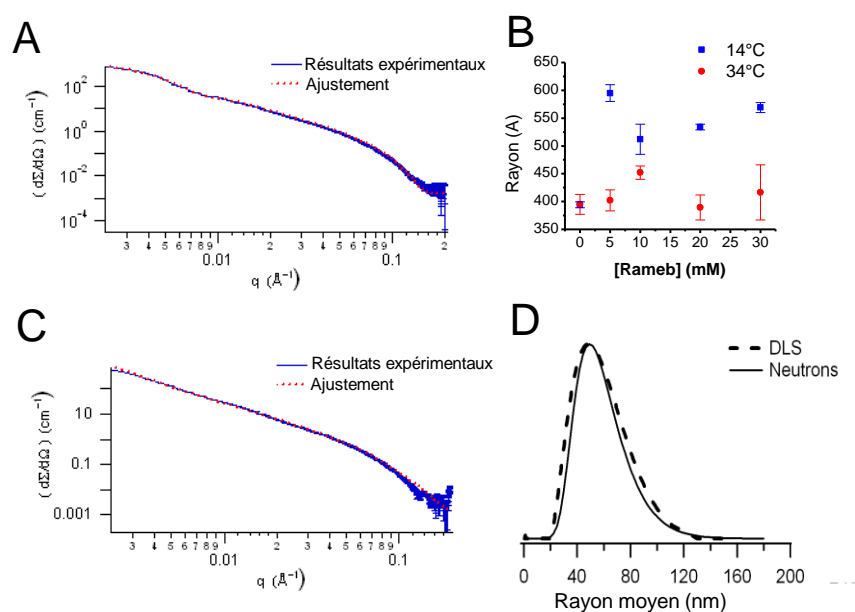
### • Effet de la Rameb sur l'intégrité des liposomes

Nous avons observé une diminution régulière de la fraction de molécules de DMPC contenues dans des liposomes unilamellaires en fonction d'une concentration croissante de Rameb. Une extraction phospholipidique et/ou une destruction de liposomes doit donc avoir lieu. Des mesures de tensions de surfaces ont également été menées et ont montré que la Rameb était capable de s'agréger faiblement lorsqu'une concentration de  $15 \pm 2$  mM de Rameb était atteinte, impliquant une possible participation des agrégats de cyclodextrines dans la destruction des liposomes.

### • Effet de la Rameb sur la taille des liposomes

L'évolution au contact de la Rameb (0–30 mM) du rayon moyen (figure 29), du nombre d'agrégation ainsi que de la polydispersité de la population de liposomes se présente différemment selon la température choisie. En dessous de la température de transition gel-fluide (23.9°C) de la bicouche de DMPC (soit à 14°C), les vésicules voient leur taille, leur nombre d'agrégation et leur polydispersité augmenter, alors qu'à 34°C ces paramètres restent

constants sauf pour le nombre d'agrégation qui diminue légèrement. Des résultats identiques ont été observés en DLS quant à la distribution de taille liposomale (figure 29).



**Figure 29 :** Section efficace macroscopique de diffusion neutronique à 14°C de liposomes (A) et de liposomes mis en contact avec 20 mM de Rameb (C) ; Évolution du rayon moyen des liposomes en fonction de la concentration de Rameb (B) ; Distribution du rayon des liposomes à 14°C (D).

En dessous de la température de transition, l'énergie de Helfrich (ou l'énergie élastique de la membrane) varie considérablement à travers la gamme des rayons moyens des liposomes échantillonnés ; les plus petites vésicules sont tendues et donc beaucoup moins stables. Dès lors, elles sont plus susceptibles de subir des perturbations induites par la Rameb, et une réorganisation de la bicouche avec une formation de plus grandes vésicules ne peut être exclue.

Au-dessus de la température de transition, l'énergie de Helfrich est beaucoup plus petite et les différences de stabilité sont sensiblement atténuées. En conséquence, l'extraction des chaînes de DMPC par la Rameb est vraisemblablement favorisée par la mobilité accrue des chaînes de phospholipides mais toutes les vésicules (petites et grandes) ont tendance à être affectées de façon similaire, laissant la distribution de taille des liposomes inchangée.

### • Effet de la Rameb sur l'épaisseur de la membrane des liposomes

La simulation des données SANS a montré l'importance de la température sur l'épaisseur membranaire : à 14°C, la membrane est dans une phase rigide structurée alors qu'à 34°C, elle

se trouve dans un état fluide entraînant une diminution de l'épaisseur de la bicouche de DMPC.

Une diminution, liée à la concentration de cyclodextrine, de l'épaisseur membranaire a été mise en évidence lors de l'incubation de liposomes de DMPC avec différentes concentrations de Rameb. Comme la cyclodextrine extrait des molécules de phospholipide, les molécules de DMPC restantes disposent d'un espace plus grand dans la bicouche. Les chaînes hydrocarbonées adoptent dès lors des conformations gauches entraînant une diminution de l'épaisseur membranaire.

Une adsorption de Rameb sur la surface des vésicules a aussi été mise en évidence. Elle s'amplifie lorsque la concentration de Rameb augmente. Lorsque celle-ci atteint 30 mM, la moitié de la surface d'un liposome est recouverte.

## Conclusion

Une extraction de phospholipides par les molécules de Rameb a été mise en évidence à partir d'une concentration de cette cyclodextrine égale à 10 mM. La diminution de l'épaisseur de la membrane liposomale a également confirmé l'effet extracteur de molécules de DMPC par la cyclodextrine, et les simulations des données expérimentales ont montré une adsorption progressive de la Rameb sur les liposomes.

L'importance de la température dans les mécanismes d'action de la cyclodextrine a été mise en évidence. Ainsi, à 14°C, les liposomes de petite taille sont préférentiellement détruits ce qui entraîne une réorganisation lipidique où des vésicules de plus grande taille pourraient être formées. Par contre, à 34°C, toutes les vésicules sont affectées de la même manière et laissent donc une distribution de taille liposomale inchangée. Ces phénomènes ont été expliqués en analysant l'énergie élastique des membranes, encore appelée énergie de Helfrich.

Grâce à la modélisation des données SANS, une analyse fine des interactions entre la Rameb et les liposomes de DMPC a ainsi pu être menée à bien. La démarche est tout à fait transposable à l'étude de liposomes variés interagissant avec différents types de cyclodextrines.

### ABSTRACT

The Small Angle Neutron Scattering technique (SANS) was applied for the first time to investigate the interaction between a cyclodextrin (CD) and liposomes. From the modelling of the experimental neutron scattering cross sections, the detailed structure of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) liposomes was assessed upon addition of increasing amounts of randomly methylated  $\beta$ -CD (Rameb). This study was performed at two temperatures bracketing the phase transition of the DMPC bilayers. The dose-dependent phospholipidic extraction by Rameb was quantified as well as the concomitant decrease of the thickness of the hydrophobic and hydrophilic parts of the membrane. The determination of the average radius and polydispersity of the vesicles highlighted the important role of temperature on the mechanism of action of Rameb. The Rameb dose-dependent adsorption on the liposome was also demonstrated. SANS appears to be a unique technique to characterise and quantify the detailed effects induced by CD interactions with liposomes.



## INTRODUCTION

Cyclodextrins (CD) were first described by Villiers in 1891 (Ohvo-Rekilä and Slotte 1996; Villiers 1891). However, Schardinger and Cramer, in the beginning of the 20<sup>th</sup> century, really laid the foundations of cyclodextrin chemistry (Cramer 1954; Schardinger 1911). They discovered three types of natural cyclodextrins (CD),  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD, which consist respectively of six, seven and eight glucopyranose units linked head-to-tail to build a ring and which adopt each the shape of a truncated cone. CD present an hydrophilic surface and a lipophilic central cavity leading to inclusion and non-inclusion complexes for a variety of host molecules (Gabelica et al. 2002; Loftsson and Brewster 1996). Intensively investigated due to their cavitant properties, CD are nowadays widely used in the food, cosmetic, textile or pharmaceutical industry (Buschmann and Schollmeyer 2002; Hashimoto 2002; Hedges 1998; Loftsson and Duchene 2007; Szejtli 2003).

Cyclodextrins like  $\beta$ -CD are prone to include cholesterol because their cavity size is sufficiently large (Brewster and Loftsson 2007). Consequently, they are relevant tools to investigate the plasma cell membrane and particularly the lipid raft function (Castagne et al. 2008; Graham et al. 2003; Zidovetzki and Levitan 2007). Several studies showed that cholesterol-containing membranes are more sensitive to methylated cyclodextrins than to natural CD (Castagne et al. 2008; Hatzi et al. 2007; Loftsson and Masson 2001). Among the former, the randomly methylated  $\beta$ -CD (Rameb) passed all toxicological tests (Castagne et al. 2008; Grammenos et al. 2010; Hatzi et al. 2007; Loftsson and Masson 2001; Piel et al. 2004; Piel et al. 2007).

Despite several studies (Lê-Quôc 2000), the mechanism of action of Rameb on cell membranes is still not well understood. Most measurements focused only on the cholesterol extraction and did not address the possible competitive phospholipid removal which is also of great importance.  $\beta$ -CD are widely used indeed in the presence of phospholipids and some recent investigations have pointed out that lipid desorption induced by CD can lead to the formation of aggregates with solubilising properties (He et al. 2008; Messner et al. 2010). The understanding of CD action on phospholipid membranes is thus of the highest importance. In this paper, we propose for the first time to the best of our knowledge, an investigation on the interaction between a methylated  $\beta$ -CD and a model membrane using the Small-Angle Neutron Scattering technique (SANS). This technique will first be applied to analyse the

interaction between Rameb and liposomes built only with phospholipids. In a second paper, the interaction between cyclodextrins (Rameb) and cholesterol-doped liposomes will be addressed.

In a previous work, our group focused on the evaluation of the Rameb action directly on cell membranes using electron spin resonance (Grammenos et al. 2009). A more common way to evaluate the damage caused by a cyclodextrin on biomembranes is to use a lipid assay kit (Castagne et al. 2008). As the CD action on natural membranes is extremely complex, the use of models consisting of lipid bilayers is a relevant approach to reach a better understanding of the involved processes. Liposomes represent such an appropriate model. In addition to mimicking the membrane, liposomes can also be used as drug enhancers (Guelluy et al. 2010; Vrhovnik et al. 1998). An emerging field also uses cyclodextrins as drug release modulators within liposomes (Boulmedarat et al. 2005; Gillet et al. 2009).

Various techniques were applied in order to understand the influence of CD on the stability as well as on the integrity of vesicle bilayers. Electron spin resonance highlighted the microviscosity changes induced by CD on liposome membranes (Grammenos et al. 2009). The release of a fluorescent probe initially encapsulated in the liposomes has been used to evaluate the liposome integrity in contact with different amount of CD (Piel et al. 2006). Turbidity measurements were performed to quantify the lipid leakage induced by CD on the liposome bilayer (Hatzi et al. 2007). The structural changes were also assessed using differential scanning calorimetry (Tsamaloukas et al. 2005), freeze-fracture electron microscopy (Piel et al. 2006), binding isotherms (Puskás et al. 2006) or photon-correlation spectroscopy (Hatzi et al. 2007; Piel et al. 2007; Piette et al. 2006; Puskás et al. 2006). Despite all these studies, rare are those involving specifically the interaction between  $\beta$ -cyclodextrin and phospholipids (Hatzi et al. 2007; Puskás et al. 2006). And, to the best of our knowledge, only information on the global liposome size and dispersity could be inferred; the internal structure of the bilayer was not accessible.

The SANS technique is a unique way to infer, from the modelling of the experimental neutron scattering cross sections, the detailed liposome structure, defined by the following parameters: average radius, thickness of both the hydrophobic and hydrophilic parts of the liposome bilayer, and liposome polydispersity. In the present work, the evolution of these

parameters has been monitored as a function of Rameb concentration. The possible anchoring of the Rameb molecules at the liposome-water interface was also investigated.

Because of the existence of a phase transition associated with a change in the conformational order of the phospholipid acyl chains influencing the membrane fluidity (Caffrey and Hogan 1992), the influence of Rameb on the liposome structure was considered at two temperatures (above and below the bilayer phase transition). In this study, we selected liposomes resulting from the self-assembling of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) which have a phase transition temperature close to 23°C. Dynamic light scattering (DLS) and surface tension measurements were performed in parallel to the SANS investigation.

## MATERIALS AND METHODS

### Liposome preparation

Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and octadecylamine also called stearylamine (SA) were purchased from Sigma (Aldrich, Belgium) and were used without further purification. Phospholipid vesicles were prepared by hydration of lipid films. DMPC was first dissolved in chloroform to a final concentration of 7.4 mM. The liposomes contained 90% of DMPC (4.5 mg/mL) and were doped with 10% of SA (0.2 mg/mL). The chloroform/phospholipid mixture was then stirred for 5 min and the solvent was evaporated under vacuum. The resulting lipid film was suspended in deuterium oxide (Sigma Aldrich, Belgium), and stirred by a vortex mixer in order to obtain large multilamellar vesicles (MLV)(Coderch et al. 2000). After hydration, five freeze-thaw cycles using liquid nitrogen were carried out to allow a better incorporation of the octadecylamine into the liposome phospholipidic bilayers. The MLV suspension was then transferred into an extruder (Lipex Biomembrane, Canada) with polycarbonate filters (0.1 µm pore size, Nucleopore, CA), under a pressure gradient up to 6800Pa of nitrogen (Air Liquide, Belgium). The procedure was repeated ten times at 35°C and resulted in unilamellar liposomes (Olson et al. 1979). Once prepared, the liposomes were incubated with Rameb (Wockes Chemie GmbH, Germany) at selected concentrations. The Rameb solution had been first filtered on a microfilter with a pore size of 0.2 µm.

### Surface Tension Measurements

Aqueous Rameb solutions were prepared at various concentrations in the  $10^{-5}$  to  $10^{-1}$  M range. Surface tension measurements were collected in multi-well plates supplied with a MicroTrough S (Kibron, Germany) apparatus. Each plate contained 15 wells with a volume of 500  $\mu$ l each and the data collection was performed with the Film Ware software (version 3.4). Each measurement was repeated 15 times at room temperature.

### Dynamic Light Scattering (DLS)

DLS measurements were carried out with a particle size analyser (Delsa Nano C, Particle Analyser, Beckman Coulter) at a fixed scattering angle of  $165^\circ$ . The light source is a diode laser operating at  $\lambda=658$  nm and 30 mW power. Measurements on the DMPC-liposome solutions in contact with different amounts of Rameb were performed at two different temperatures (14 and  $34^\circ\text{C}$ ) in duplicate. Each measure lasted about 20 minutes. Initially the liposome and Rameb solutions were both filtered on a microfilter with a pore size of 0.2  $\mu$ m. Data were handled using the CONTIN algorithm.

### Small-Angle Neutron Scattering (SANS)

The SANS cross-sections of unilamellar DMPC vesicles in  $\text{D}_2\text{O}$  in contact with different concentrations of Rameb were collected at the Jülich Centre for Neutron Science (JCNS) at two temperatures:  $14^\circ\text{C}$  and  $34^\circ\text{C}$ . The KWS1 and KWS2 small-angle instruments were used to collect data at three sample-detector distances: 2, 8 and 20m. The neutron wavelength,  $\lambda$ , was equal to  $6.00 \text{ \AA} \pm 0.60 \text{ \AA}$  after mechanical velocity selection. These conditions led us to access a momentum transfer range,  $q$ , from  $2.36 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$  to  $1.96 \cdot 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$

where  $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta)$  and  $2\theta$  is the scattering angle.

The scattered neutrons were detected on a two-dimensional  $^6\text{Li}$  scintillation counter. Radial averaging led to a one-dimensional scattering function  $I(q)$ . The incoherent background was removed using a blank sample. Corrections for the background and sample holder contributions were carried out according to standard data handling procedures. The data corresponding to the liposomal solutions and to the pure solvent ( $\text{D}_2\text{O}$ ) were treated in an identical way, and the scattering intensities were converted to macroscopic scattering cross-sections per unit volume,  $d\Sigma/d\Omega$  ( $\text{cm}^{-1}$ ), by using calibration with a Poly(methyl methacrylate)

sample. The liposome contribution was determined by subtracting the solvent cross section weighted by its volume fraction.

## SANS DATA HANDLING

The macroscopic scattering cross-section is proportional to the square of the scattering amplitude:

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega} = \frac{N}{V} |A(q)|^2 \quad (1)$$

$N/V$  represents the number of vesicles per unit volume.

Because the experimental medium was sufficiently diluted, the interferences between the waves scattered by different liposomes may be ignored (Hammouda 2009). In addition, as we consider spherical liposomes, the scattering amplitude depends only on the magnitude of the momentum transfer vector  $\vec{q}$ , so that  $A(q)$  is given by

$$A(q) = 4\pi \int_{liposome} \tilde{\rho}^d(r) \frac{\sin(qr)}{qr} r^2 dr \quad (2)$$

where  $\tilde{\rho}^d$  represents the excess scattering length density and  $r$  is defined from the centre of the liposome.  $\tilde{\rho}^d$  describes the interaction strength between the scatterers and the neutron beam. It is equal to the scattering length of the elementary scatterers present in the vesicle divided by their respective volume from which the corresponding quantity for the solvent is subtracted. As all measurements were performed in deuterated water, the excess scattering length density for liposomes made of DMPC and SA is given by

$$\begin{aligned} \tilde{\rho}^d(r) &= \frac{b_{SA}}{V_{SA}} \varphi_{SA}(r) + \frac{b_{DMPC}}{V_{DMPC}} \varphi_{DMPC}(r) + \frac{b_{D_2O}}{V_{D_2O}} (1 - \varphi_{SA}(r) - \varphi_{DMPC}(r)) - \frac{b_{D_2O}}{V_{D_2O}} \\ &= \left( \frac{b_{SA}}{V_{SA}} - \frac{b_{D_2O}}{V_{D_2O}} \right) \varphi_{SA}(r) + \left( \frac{b_{DMPC}}{V_{DMPC}} - \frac{b_{D_2O}}{V_{D_2O}} \right) \varphi_{DMPC}(r) \\ &= \tilde{\rho}_{SA}^d(r) \varphi_{SA}(r) + \tilde{\rho}_{DMPC}^d(r) \varphi_{DMPC}(r) \end{aligned} \quad (3)$$

Because DMPC and SA are amphiphilic molecules, we define as elementary scatterers either their hydrophobic tails or their hydrophilic heads. Depending on the zone of the liposome

considered,  $b_{SA}$  and  $b_{DMPC}$  correspond to the scattering length of the head or tail of the SA and DMPC molecules.  $V_{SA}$  or  $V_{DMPC}$  are the corresponding molecular volumes for these heads or tails.  $\varphi_{SA}$  and  $\varphi_{DMPC}$  are the volume fraction of respectively SA and DMPC.  $b_{D_2O}$  is the scattering length of the solvent with a molecular volumes equal to  $V_{D_2O}$ .

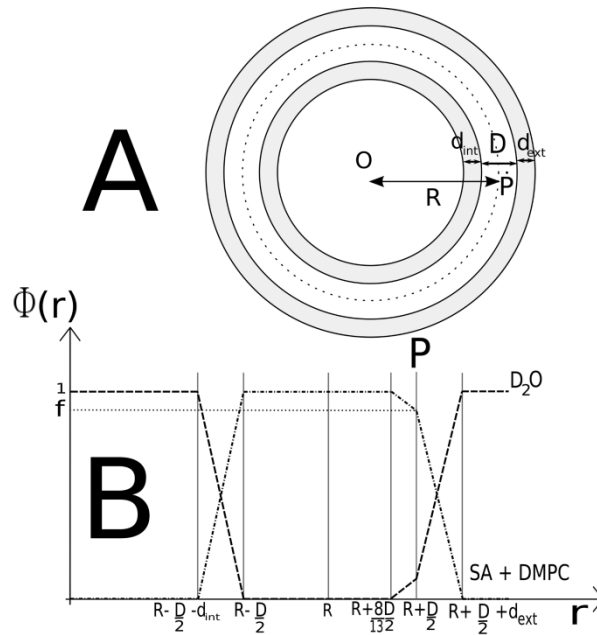
Equation 2 shows that the intensity of the scattered neutron beam depends on the location of the scatterers within the membrane. The analysis of the macroscopic scattering cross-section can therefore leads to information on the structure of the vesicle. Our goal was to build a model to describe the vesicle as a superposition of simple geometrical substructures (see below). We deduced the theoretical macroscopic scattering cross-section corresponding to this model and inferred the structural parameters of the liposomes by fitting the theoretical curve to the experimental data. The choice of simple geometrical shapes limits of course the accuracy of the inferred data.

In our experiments, we selected liposomes with a unilamellar spherical bilayer of average global radius  $R$ . This bilayer, as displayed in Fig. 1A, has been modeled by two peripheral hydrophilic parts (with thicknesses equal to  $d_{in}$  and  $d_{out}$ ) and one hydrophobic part (thickness equal to  $D$ ).

The peripheral parts of the DMPC/SA bilayer are polar. A linear water penetration profile is assumed in this zone (Fig. 1B). Due to the curvature of the membrane, the DMPC heads at the outer interface have more space than at the inner one. The aggregation number corresponding to these two sublayers,  $N_{in}$  and  $N_{out}$  are therefore in principle different. We also assumed a water penetration profile on the outer side of the hydrophobic part until the 5<sup>th</sup> carbon atom of the alkyl chain of DMPC that includes 13 carbon atoms. Consequently, the liposome was modelled with five parts which we now review.

Beginning from the centre, the first region is the internal cavity, which is filled with deuterated water. The second zone, between  $R - \frac{D}{2} - d_{in}$  and  $R - \frac{D}{2}$ , represents the inner hydrophilic part made of the polar heads of the DMPC and SA molecules. The third zone, from  $R - \frac{D}{2}$  to  $R$ , consists of the hydrophobic tails of the latter DMPC and SA molecules.

The fourth region, from  $R$  to  $R + \frac{D}{2}$  corresponds to the hydrophobic chains of the DMPC and SA molecules whose heads point toward the outer part of the liposome. A water penetration until the 5<sup>th</sup> carbon was assumed in this region. The zone from which water is excluded is called the dry hydrophobic zone.



**Fig. 1:** (A) General structure of a modelled liposome. Beginning from the centre, we have the internal cavity (white), the hydrophilic inner sublayer (grey), the hydrophobic (white) inner sublayer, the hydrophobic dry outer sublayer (until the dash-dotted circle), the hydrophobic wet outer sublayer, and the hydrophilic outer sublayer (grey); (B) Volume fraction of the DMPC/SA constituents of the liposome as a function of the distance from the centre of the liposome (dash-dotted line). The volume fraction of water is shown as a dashed line. The CD fraction is not shown.

Beginning from the centre, the first region is the internal cavity, which is filled with deuterated water. The second zone, between  $R - \frac{D}{2} - d_{in}$  and  $R - \frac{D}{2}$ , represents the inner hydrophilic part made of the polar heads of the DMPC and SA molecules. The third zone, from  $R - \frac{D}{2}$  to  $R$ , consists of the hydrophobic tails of the latter DMPC and SA molecules.

The fourth region, from  $R$  to  $R + \frac{D}{2}$  corresponds to the hydrophobic chains of the DMPC and SA molecules whose heads point toward the outer part of the liposome. A water penetration until the 5<sup>th</sup> carbon was assumed in this region. The zone from which water is excluded is called the dry hydrophobic zone.

The fifth part, from  $R + \frac{D}{2}$  to  $R + \frac{D}{2} + d_{out}$ , is made of the hydrophilic heads of the assembled molecules at the outer liposome interface. When cyclodextrin was added, its possible adsorption at this interface was included in the model. Linear water penetration profiles were assumed, as shown in Fig. 1B.

### Aggregation number and membrane thickness

In order to reproduce the macroscopic cross-section of the liposome solutions under given experimental conditions, the values of  $R$ ,  $D$ ,  $d_{out}$  and  $d_{in}$  need to be estimated.  $R$  and  $D$  are free parameters of the model.  $d_{out}$  and  $d_{in}$ , however, can be calculated based on conservation relationships. It is first necessary to calculate the aggregation number,  $N$ , which is the number of individual amphiphilic molecules that are self-assembled in the vesicle. It can be splitted into two parts,  $N = N_{in} + N_{out}$ .  $N$  is related to the volume of the membrane. As  $N_{in}$  and  $N_{out}$  are different, they will be calculated separately. The average molecular volumes in the hydrophobic,  $V_{phobic}$ , and hydrophilic,  $V_{philic}$ , zones are given by the following equation:

$$V_{phobic} = V_{DMPC}^{phobic} + \frac{[SA]}{[DMPC]} V_{SA}^{phobic} \quad (4)$$

$$V_{philic} = V_{DMPC}^{philic} + \frac{[SA]}{[DMPC]} V_{SA}^{philic} \quad (5)$$

where  $[DMPC]$  and  $[SA]$  are the respective concentration of DMPC and SA.

The inner and outer aggregation numbers can be deduced from the  $R$  and  $D$  values using the following relationships.

$$N_{in} = \frac{\frac{4}{3} \pi \left[ R^3 - \left( R - \frac{D}{2} \right)^3 \right]}{V_{phobic}} \quad (6)$$



$$N_{out} = \frac{\frac{4}{3} \pi \left[ \left( R + \frac{D}{2} \frac{8}{13} \right)^3 - R^3 \right]}{V_{phobic} \frac{8}{13}} \quad (7)$$

Each hydrophobic DMPC chain consists of 13 carbon atoms. The 8/13 factor ensures that only the dry hydrophobic part is considered in the volume calculation. The thickness of the hydrophilic zone of the vesicle (inner and outer) can then be determined using

$$d_{out} = \frac{2N_{out} V_{phile}}{4\pi f \left( R + \frac{D}{2} \right)^2} \quad (8)$$

$$d_{in} = \frac{2N_{in} V_{phile}}{4\pi \left( R - \frac{D}{2} \right)^2} \quad (9)$$

where  $f$  is the volume fraction of the DMPC/SA constituents of the liposome at  $R + \frac{D}{2}$  (see Fig. 1B).  $d_{in}$  and  $d_{out}$  are in practice very close to each other so that we shall usually discuss only their average,  $d$ .

### Macroscopic scattering cross-section

The scattering amplitude is then calculated by inserting Eq. 3 into Eq. 2 and by performing the analytical integration. The resulting amplitude is then squared and multiplied by the number of vesicles per  $\text{cm}^3$  as required by Eq. 1.

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega} = [DMPC] \frac{N_A}{N} 10^{-3} |A(q)|^2 \quad (10)$$

where  $N_A$  is the Avogadro's number. The units of  $\frac{d\Sigma}{d\Omega}$  are  $\text{cm}^{-1}$ . The polydispersity of the vesicle sizes has been taken into account by using the following size distribution, inspired from the analysis of DLS data.

$$P_n(z) = \exp(-e^{-z} - z + 1)$$

$$z = \frac{R - R_c}{\sigma} \quad (11)$$

$R_c$  is the value of the radius corresponding to the maximum of the size distribution. The average radius is given by  $\langle R \rangle = R_c + 0.577\sigma$  and the standard deviation,  $\delta$ , is proportional to  $\sigma$ :  $\delta = 1.283\sigma$ .

The macroscopic scattering cross-section of a liposomal solution can finally be written as

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega} = [DMPC]N_A 10^{-3} \int_0^{\infty} \frac{|A(q)|^2}{N(R)} P_n(R) dR \quad (12)$$

$N(R)$  is the aggregation number of a vesicle with a radius equal to  $R$ .

Equation 12 is then fitted to the experimental results and the resulting best-fit parameters are: (i) the average radius of the liposome ( $\langle R \rangle$ ), (ii) the standard deviation of the radius, (iii) the thickness of the hydrophobic part ( $D$ ), (iv) and the volume fraction of the Rameb adsorbed at the surface of the vesicles ( $\varphi$ ). The model leads also to four additional structural parameters which are not independent of the other above-mentioned parameters: the average aggregation number, the number of Rameb molecules anchored at the surface of the liposome, the inner and outer hydrophilic sublayers ( $d_{in}$  and  $d_{out}$ ). Equation 12 is based on the assumption that all DMPC molecules are self-assembled in spherical unilamellar liposomes whose size is compatible with the experimental  $q$  range. A correcting multiplying factor, called  $m$ , had to be introduced, to account for the possibility of (i) unassociated free DMPC chains which are too small to be seen in SANS and (ii) other types of self-assembled objects, like clusters of liposomes, whose size is too large for them to be detected in our limited  $q$  range.

### Evaluation of the fit quality

The fitted cross-sections noted for simplicity  $I_t$  in Eqs. 13 and 14 were compared with the experimental ones by monitoring  $\chi^2$ .

$$\chi^2 = \frac{1}{N_p - n_a} \sum_{i=1}^N \left( \frac{I_{t,i} - I_{\text{exp},i}}{E_i} \right)^2 \quad (13)$$

where  $N_p$  is the number of data points,  $n_a$  is the number of parameters,  $E_i$  is the standard deviation on the experimental intensity  $I_{exp}$ . Unfortunately, this  $\chi^2$  is sometimes insufficient to determine the best combination of structural parameters to fit the experimental data. The dynamic range is so large indeed that the intensity at high  $q$  values has a very low weight compared to the values at small  $q$ . We define  $\chi_i^2$  to enhance the contributions at larger  $q$  values.

$$\chi_i^2 = \frac{1}{N - n_a} \sum_{i=1}^N \left( \frac{\log(I_{t,i}) - \log(I_{exp,i})}{\frac{E_i}{I_{exp,i}}} \right)^2 \quad (14)$$

### SANS parameters and DLS measurements

The information inferred by modelling the SANS cross-sections need to be compared with the data obtained from other techniques, in particular DLS. Our approach to fit the SANS data provides us with a number-weighted radius distribution, denoted  $P_n$ . The CONTIN algorithm used for the DLS data analysis leads to an intensity-weighted distribution,  $P_i$ , of the hydrodynamic radius. These two distributions may be connected through the following equation (Hallett et al. 1989; Maulucci et al. 2005):

$$P_n = \frac{P_i}{[M(R)]^2 F(q;R)} \quad (15)$$

where  $M(R)$  is the molecular weight of a vesicle of radius  $R$ .  $M(R)$  is proportional to the square of the vesicle radius:

$$M(R) = 4\pi R^2 \tilde{D} \bar{\rho} \quad (16)$$

where  $\tilde{D}$  represents the global thickness and  $\bar{\rho}$  the average density of the bilayer.  $F(q;R)$  is the form factor of the vesicle at the  $q$  value corresponding to the wavelength and detection angle of the DLS instrument. Because all the information required to calculate  $F(q;R)$  is available from the analysis of our SANS data, we found more consistent to convert the  $P_n$  SANS distributions to  $P_i$  distributions which are equivalent to the DLS distributions. This makes an easy comparison between DLS and SANS data possible, as displayed in Fig. 4.

RESULTS AND DISCUSSION

Typical SANS cross-sections of DMPC vesicles with or without added Rameb as well as fits using the model described previously (Eq. 12) are displayed in Fig. 2. A good agreement is observed between the experimental and fitted data.

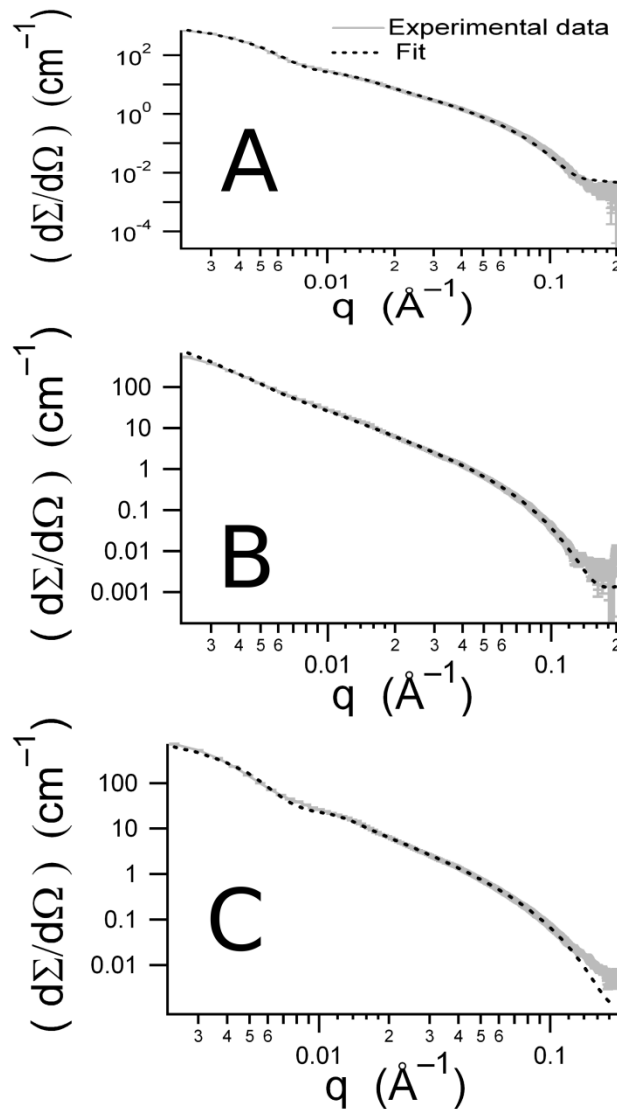
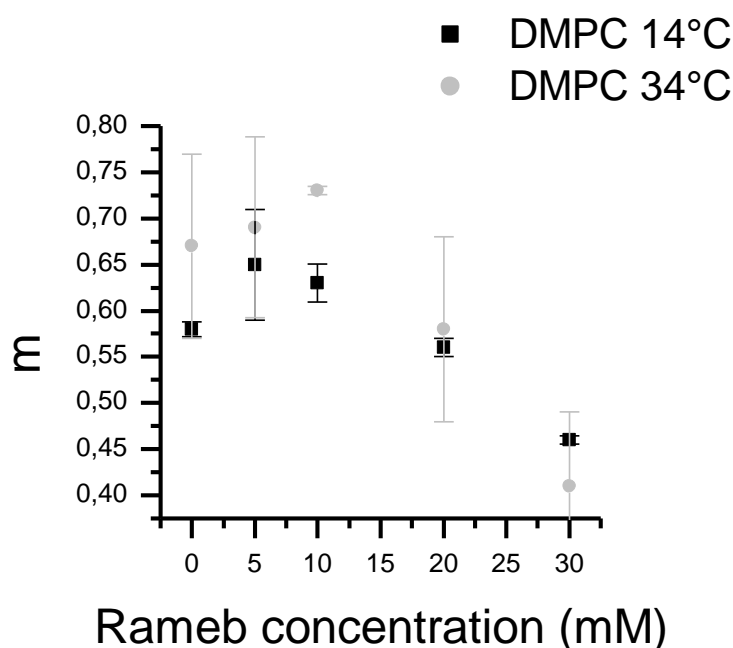


Fig. 2: Typical experimental macroscopic cross-sections of the liposomes (solid line) and their fits to Eq. (12) (dotted line); (A) pure liposomes at 14°C; (B) liposomes at 14°C in contact with 20 mM of Rameb; (C) liposomes in contact with 5 mM of Rameb at 34°C.

### Fraction of DMPC molecules included into unilamellar liposomes

Let us start our discussion with the  $m$  parameter which corresponds to the fraction of DMPC molecules included in the vesicles. Fig. 3 displays the evolution of this parameter upon increasing Rameb concentration at 14°C and 34°C.



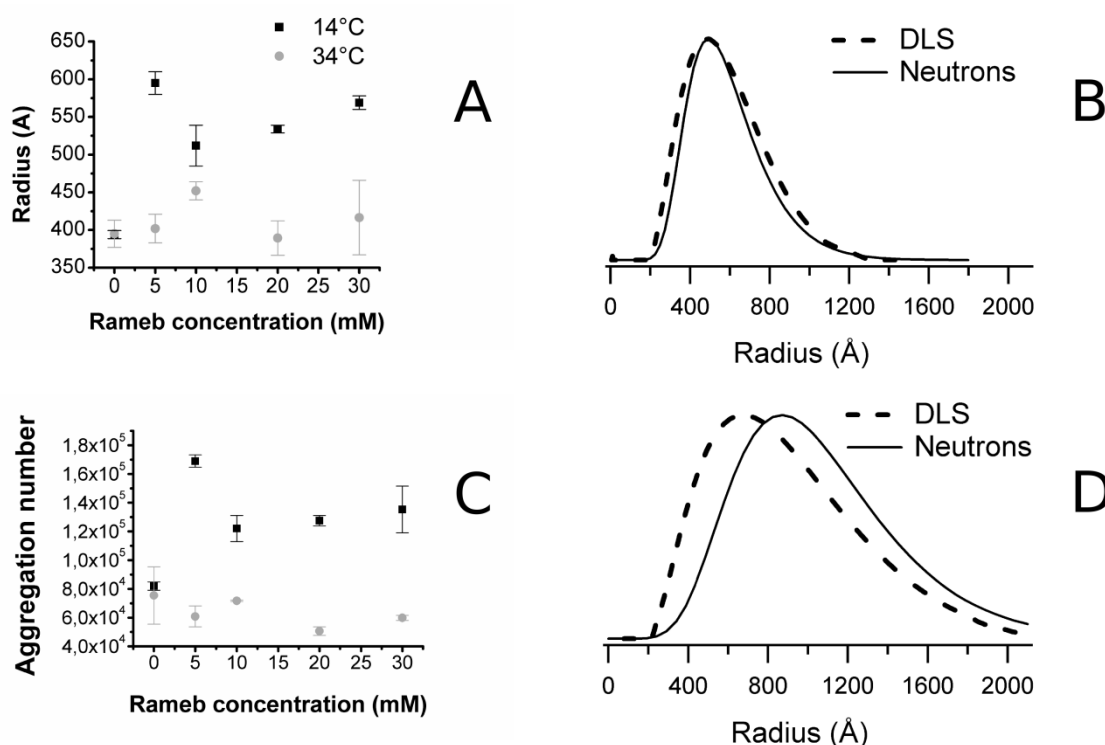
**Fig. 3:** Influence of Rameb on the DMPC fraction included in the DMPC vesicles at 14°C (black squares) and 34°C (grey dots).

A significant monotonous decrease of  $m$  is observed above 10 mM of CD for both temperatures. When 30 mM of Rameb is reached,  $m$  is  $1.4 \pm 0.2$  smaller than for vesicles not in contact with Rameb, meaning that  $30 \pm 2$  % of the liposomes are affected. This effect can be due either to phospholipid extraction by CD and/or to vesicle disruption; CD may solubilise the liposomes by extracting their DMPC phospholipid molecules: desorption of DMPC monolayers by  $\beta$ -CD has already been demonstrated (2) and Hatzi and coworkers highlighted the Rameb ability to solubilise liposomes (Hatzi et al. 2007).

Surface tension measurements were also performed, showing that Rameb is able to weakly cluster above  $15 \pm 2$  mM (data not shown) in agreement with reference (Messner et al. 2010). These observations may indicate that CD-clusters must play a role in the liposomal destruction.

### Liposome Radius and Aggregation Number

The evolution of the average liposome radius inferred from SANS upon addition of an increasing amount of Rameb is shown in Fig. 4A. Temperature is seen to play a significant role in the liposome size behaviour: below the DMPC transition temperature, the average liposome radius increases upon addition of CD whereas it remains nearly constant at 34°C. This temperature dependence behaviour is confirmed by DLS measurements (Figs. 4B and 4D).



**Fig. 4:** Liposome average radius (A) and aggregation number (C) at different Rameb concentration at 14°C (black squares) and 34°C (grey dots); radius distribution at 14°C determined by DLS (dotted line) and SANS (solid line) for pure liposomes (B) and for liposomes in contact with 20 mM of Rameb (D).

*Below the DMPC transition temperature*

As it is well accepted that CD are not able to penetrate into phospholipid membrane (Loftsson and Brewster 1996; Loftsson et al. 2007; Masson et al. 1999), the increase in liposome size at 14°C could not be explained by a CD absorption into the bilayer. We suggest that Rameb destroys preferentially the small vesicles so that the size distribution is shifted towards larger  $R$  values. As will be discussed below, small liposomes have a larger curvature and a higher bending Helfrich energy, favouring phospholipid extraction by CD and leading to their easier solubilisation compared to bigger ones.

Another mechanism proposed by Puskas and Csempez is that cyclodextrins induce aggregation/or fusion of the vesicles (Puskas and Csempez 2007). This hypothesis could in principle also account for the shift in the size distribution towards larger  $R$  values as observed on Fig. 4A. It must be emphasized, however, that this mechanism would imply the appearance of a bimodal size distribution, with an additional contribution from the clusters. Such a bimodal distribution has not been included in our model. Furthermore, larger clusters are not detected in our  $q$ -range. DLS measurements do not detect appearance of any bimodal distribution. We observe however that the width of the size distribution (and therefore the polydispersity) increase upon Rameb addition, a fact which could be accounted for by bilayer reorganization leading to more stable larger liposomes.

The increase size of the liposomes is logically linked to an increase of the average aggregation number as shown in Fig. 4C.

The comparison of Figs. 3 and 4 shows that the conclusions drawn from both the  $m$  and  $R$  parameters are compatible. A Rameb concentration of  $7.5 \pm 2.5$  mM must be reached in order that a significant effect is observed.

*Above the DMPC transition temperature*

Figs. 3 and 4 show that, at 34°C, (i) the fraction of DMPC molecules within unilamellar liposomes decreases upon Rameb addition but that (ii) the average vesicles size is not significantly affected by the interactions with the CD. The average radius does not change within experimental errors. A small decrease of the aggregation number is still noticed ( $21 \pm 5$

%) (Fig. 4B) in keeping with the extracting function of Rameb towards phospholipids. We shall discuss later the possible link of this decrease with the induced change in the bilayer thickness.

These observations, and the comparison with the data below the transition temperature, lead us to the hypothesis that phospholipid extraction above the DMPC bilayer transition temperature disrupts all liposomes to about the same extent whatever their size, contrarily to the situation prevailing below the transition temperature. As a consequence, the size distribution remains more or less unaffected so that the average radius change is negligible.

### *Comparison between the behaviours below and above the transition temperature*

A double question arises. Why do small liposomes get more easily disrupted than bigger ones below the gel-fluid transition temperature? Why does this differentiated behaviour vanish above the transition temperature?

Bending a bilayer has an energy cost. The size distribution of a system of vesicles has been shown to depend exponentially on the renormalized Helfrich bending energy,  $H_R(R)$  divided by the thermal energy  $k_B T$  (Morse and Milner 1995). This renormalized bending energy takes into account the fact that membrane undulations at finite temperature lower the free energy uptake associated with the membrane bending required to build a vesicle. Vesicles of radius  $R$  close to the undulation wavelength will be formed preferentially. The effective, renormalized bending modulus decreases with the characteristic length scale of the vesicle, so that for  $R \approx \tilde{D} \exp\left(\frac{4\pi}{3} \frac{\kappa}{k_B T}\right)$  (where  $\kappa$  is the not renormalized bending modulus), the renormalized bending modulus is close to zero (Charitat et al. 2008).  $\kappa$  has been observed to decrease by about two orders of magnitude at the transition temperature (Charitat et al. 2008).

Our well controlled liposome preparation procedure leads to unilamellar spherical liposomes with an average radius of 400 Å and a moderately narrow size distribution. Despite their bending, they are kinetically stabilized, in particular through the insertion of stearylammmonium chains. Below the transition temperature, the bending energy is expected to vary significantly through the sampled  $R$  range, so that the smaller vesicles are much less stable and more prone to Rameb-induced disruption. Bilayer reorganization and formation of



larger vesicles cannot be excluded. Above the transition temperature, the Helfrich energy is much smaller due to the above-mentioned decrease of the bending modulus, so that the stability differences are significantly attenuated. The extraction of DMPC chains by Rameb is probably favoured by the higher mobility of the phospholipid chains but all vesicle sizes tend to be affected in a similar way.

### Adsorption of Rameb on the liposome external layer

Another parameter derived from the data modelling is the volume fraction of Rameb adsorbed on the liposome surface. Fig. 5 highlights the dose dependant covering of liposomes by Rameb. When 30 mM of Rameb is reached, half of the vesicle surface is covered. An adsorption of CD on membranes has been previously reported (Mascetti et al. 2008) and explained by an hydrogen bond formation between the phospholipidic polar head group and one hydroxyl group of the CD.

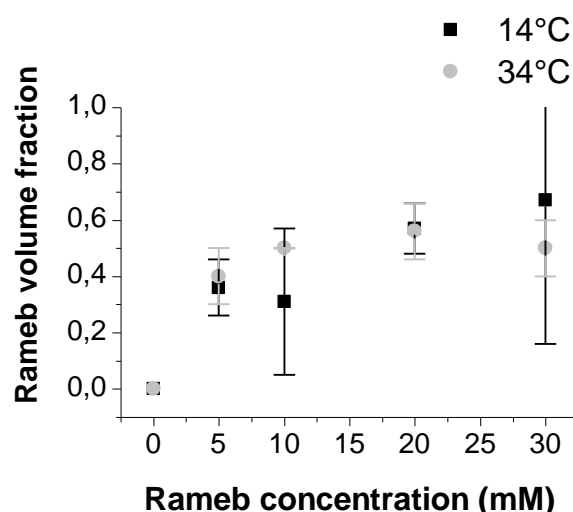
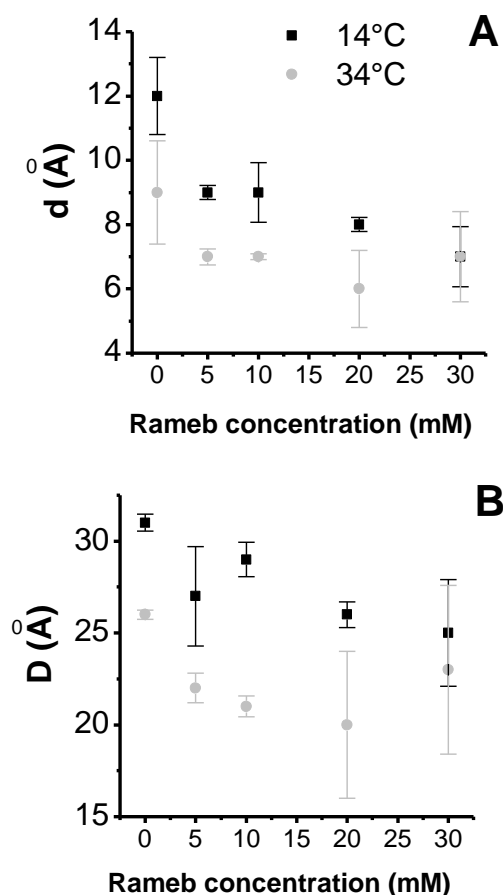


Fig. 5: Volume fraction of Rameb adsorbed on the liposome surface at 14°C (black squares) and 34°C (grey dots).

### Bilayer thickness

The detailed liposome bilayer structure is also assessed. Fig. 6 shows how the hydrophilic (Fig. 6A) and hydrophobic (Fig. 6B) sublayers of the membrane vary as a function of the Rameb concentration. We recall that  $d$  is the average thickness of the inner and outer hydrophilic sublayers (Eq. 10).



**Fig. 6:** DMPC sublayer thickness as a function of Rameb concentration at 14°C (black squares) and 34°C (grey dots); (A) average hydrophilic sublayer thickness (B) hydrophobic sublayer thickness.

As inferred from the SANS data, the membrane global thickness of DMPC liposomes at 34°C is  $45 \pm 3 \text{ \AA}$ , with hydrophobic and hydrophilic contributions equal to respectively  $26.5 \pm 0.2 \text{ \AA}$  and  $9.1 \pm 1.6 \text{ \AA}$ . The membrane bilayer thickness of the same liposomes increases at 14°C and reaches  $55 \pm 3 \text{ \AA}$  with hydrophobic and hydrophilic contributions which are respectively  $31.0 \pm 0.5 \text{ \AA}$  and  $12.0 \pm 1.2 \text{ \AA}$ . Those results are in agreement with Kiselev studies (Kiselev et al. 2005; Kiselev et al. 2004; Kiselev et al. 2006; Kucerka et al. 2004). The increase of the DMPC membrane thickness at 14°C is associated with the DMPC phase transition. At 14°C, the DMPC molecules are in a rigid and structured phase: the hydrophobic chains adopt elongated *anti*-conformations which optimize their mutual non-covalent interactions. The maximum chain-length for the DMPC hydrophobic moiety in an all *anti*-configuration is equal to  $6 \times 2,5 \text{ \AA} = 15 \text{ \AA}$ , so that the hydrophobic sublayer is then expected to be  $30 \text{ \AA}$  thick which corresponds exactly to the observed hydrophobic thickness at 14°C. At 34°C, the phospholipid chains are in a fluid state leading to a thinner membrane because the

entropic driving force favours *gauche* conformations leading to a more compact molecular shape.

Progressive addition of Rameb leads to a decrease of the bilayer thickness at both temperatures. On an absolute scale, the decrease is slightly more significant for the hydrophobic part than for the hydrophilic part. This decrease of the bilayer thickness upon addition of Rameb is compatible with the findings of our previous work (Grammenos et al. 2009).

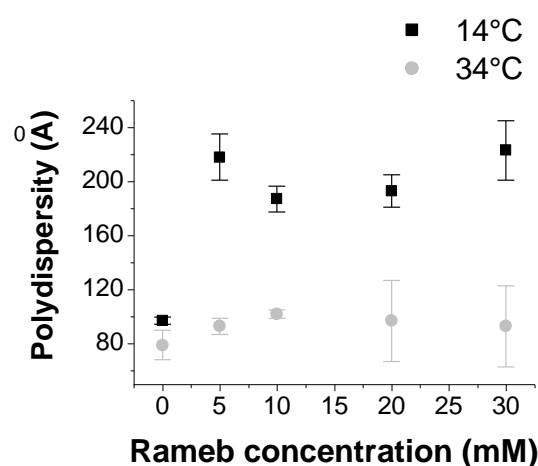
We suggest the following tentative mechanism, which is compatible with the results on the average radius presented in a previous subsection. After phospholipid extraction by Rameb, some liposomes are completely disrupted, some are not. Fig. 3 shows that at both temperatures about 1/3 of the liposomes are disrupted and no longer detected in our SANS experiments. In the surviving liposomes, the space made available by the extracted chains allows relaxation processes for the remaining ones. Intercalation of DMPC hydrophobic chains from the inner part of the liposome into the available free space of the outer part becomes possible. The space made available by the extracted chains may also be used by their neighbour molecules which can now adopt a larger number of *gauche*-conformations and, as a consequence, a more compact shape leading to a thinner sublayer. From this point of view, it is logical that the long hydrophobic chains are more affected than the smaller polar heads, so that the hydrophobic sublayer thickness decreases more upon Rameb addition than the hydrophilic one. This mechanism is also compatible with a moderate decrease of the aggregation number keeping the global radius constant, and could therefore explain the small decrease observed for  $N$  in Fig. 4B at 34°C, as alluded to above.

### **Polydispersity**

Fig. 7 shows the influence of Rameb on the liposome polydispersity. An increase is highlighted at 14°C but at 34°C the polydispersity is not significantly changed. These results were confirmed by DLS measurements (Figs. 4B and 4D).

The polydispersity data are compatible with the previously presented data and confirm the proposed mechanism. At 14°C, Rameb favours the disruption of smaller liposomes compared to larger ones and a possible reorganization favouring larger more stable liposomes, with the following consequences: (i) increase of the average radius (Fig. 4A); (ii)

enhancement of the contribution of the bigger liposomes which correlates with an increased width of the size distribution, *i.e.* with a larger polydispersity. At 34°C, we suggest that all liposomes are affected to the same extent by their interactions with Rameb, leaving the size distribution unaffected: the average radius and the polydispersity remain therefore constant.



**Fig. 7: Polydispersity of DMPC liposomes at 14°C (black squares) and 34°C (grey dots), as inferred from SANS, as a function of Rameb concentration.**

## CONCLUSIONS

The small angle neutron scattering technique was successfully applied to characterize the influence of a methylated  $\beta$ -cyclodextrin (Rameb) on the structural parameters of DMPC liposomes. The SANS data are corroborated by DLS experiments but provide us with a more detailed picture of the liposome – cyclodextrin interactions.

The evolution of the fraction of DMPC molecules inserted in the liposomes ( $m$  parameter) and of the aggregation number confirms that Rameb is able to significantly affect the vesicles, when its concentration exceeds 10 mM, by extracting phospholipids in a dose dependent way.

The important role of temperature on the phospholipidic extraction has been highlighted. Below the bilayer transition temperature, the average liposome radius increases upon addition of Rameb, an observation which we interpret as a preferential disruption of the small vesicles by the CD and which we correlated with the Helfrich energy. Above the transition temperature, due to a much smaller bilayer bending modulus, all vesicles are affected to the same extent by the interaction with Rameb, which leaves the size distribution nearly unaffected.

Furthermore, the modelled SANS data allowed us to evaluate the effect of the CD on the DMPC membrane thickness below and above the transition temperature (55 Å and 45 Å in the gel and liquid phase, respectively). At both temperatures, addition of Rameb leads to a decrease of the bilayer thickness. The mechanism proposed is that the space made available upon DMPC extraction leads to the relaxation of the remaining chains.

Information about the adsorption of Rameb on the liposome outer interface was also accessed: at 30 mM of Rameb, half of the liposome is recovered.

The model proposed in this paper leads to a consistent analysis of the SANS data and allowed us to draw several conclusions on the detailed mechanism of interaction between a cyclodextrin and DMPC liposomes, either confirming hypotheses or suggesting new ones. The presented methods are very general and can be applied to the characterization of any kind of vesicles (built from one given type of phospholipids) incubated with different types of CD.

## AKNOWLEDGEMENTS

This work is partly based on the experiments performed at the Jülich Centre for Neutron Science (JCNS) in Germany. A special thanks to Dr Mohamed Bahri and professor Gaspard for their participation to the experiments. The authors are grateful to the Centre for Study and Research on Macromolecules (CERM) and to the Structural Inorganic Chemistry Laboratory (LCIS) based at the University of Liege in Belgium, for having made their DLS equipment available. We are also grateful to Marjorie Lismont (Laboratory of Biophotonics, University of Liège) for her help in the surface tension measurements.

### REFERENCES

- Boulmedarat L, Piel G, Bochot A, Lesieur S, Delattre L, Fattal E (2005) Cyclodextrin-mediated drug release from liposomes dispersed within a bioadhesive gel. *Pharm Res* 22:962-971
- Brewster ME, Loftsson T (2007) Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev* 59:645-666
- Buschmann H-J, Schollmeyer E (2002) Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. *J Cosmet Sci* 53:185-191
- Caffrey M, Hogan J (1992) LIPIDAT: A database of lipid phase transition temperatures and enthalpy changes. DMPC data subset analysis. *Lipids* 61:1-109
- Castagne D, Fillet M, Delattre L, Evrard B, Nusgens B, Piel G (2008) Study of the cholesterol extraction capacity of  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 63
- Charitat T, Lecuyer S, Fragneto G (2008) Fluctuation and destabilization of single phospholipids bilayers. *Biointerphases* 3:FB3-FB15
- Coderch L, Fonollosa J, De Pera M, Estelrich J, De La Maza A, Parra JL (2000) Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. *J Control Release* 68:85-95
- Cramer F (1954) *Einschlussverbindungen*. Springer-Verlag, Berlin
- Gabelica V, Galic N, De Pauw E (2002) On the specificity of cyclodextrin complexes detected by electrospray mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 13:946-953
- Gillet A, Grammenos A, Compere P, Evrard B, Piel G (2009) Development of a new topical system: drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome. *Int J Pharm* 380:174-180
- Graham DRM, Chertova E, Hilburn JM, Arthur LO, Hildreth JEK (2003) Cholesterol Depletion of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus with  $\beta$ -Cyclodextrin Inactivates and Permeabilizes the Virions: Evidence for Virion-Associated Lipid Rafts. *J Virology* 77:8237-8248
- Grammenos A, Bahri MA, Guelluy PH, Piel G, Hoebeke M (2009) Quantification of Randomly-methylated-beta-cyclodextrin effect on liposome: an ESR study. *Biochem Biophys Res Commun* 390:5-9

- Grammenos A, Mouithys-Mickalad A, Guelluy PH, Lismont M, Piel G, Hoebeke M (2010) ESR technique for noninvasive way to quantify cyclodextrins effect on cell membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 398:350-354
- Guelluy PH, Fontaine-Aupart MP, Grammenos A, Lecart S, Piette J, Hoebeke M (2010) Optimizing photodynamic therapy by liposomal formulation of the photosensitizer pyropheophorbide-a methyl ester: in vitro and ex vivo comparative biophysical investigations in a colon carcinoma cell line. *Photochem Photobiol Sci* 9:1252-1260
- Hallett AF, Craig T, Marsh J, Nickel B (1989) Number Distributions by Dynamic Light Scattering. *Can J Spectr* 34:63-70
- Hammouda B (2009) Probing nanoscale structures - The SANS toolbox. National Institute of Standards and Technology Center for Neutron Research Gaithersburg  
<[http://www.ncnr.nist.gov/staff/hammouda/the\\_SANS\\_toolbox.pdf](http://www.ncnr.nist.gov/staff/hammouda/the_SANS_toolbox.pdf)>
- Hashimoto H (2002) Present Status of Industrial Application of Cyclodextrins in Japan. *J Inclusion Phenom Macrocyclic Chem* 44:57-62
- Hatzi P, Mourtas S, Klepetsanis PG, Antimisiaris SG (2007) Study of the interaction between cyclodextrins and liposome membranes: effect on the permeability of liposomes. *Int J Pharm* 225:15-30
- He Y, Fu P, Shen X, Gao H (2008) Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy. *Micron* 39:495-516
- Hedges AR (1998) Industrial Applications of Cyclodextrins. *Chem Rev* 98:2035-2044
- Kiselev MA, Zbytovska J, Matveev D, Wartewig S, Gapienko IV, Perez J, Lesieur P, Hoell A, Neubert R (2005) Influence of trehalose on the structure of unilamellar DMPC vesicles. *Colloids Surfaces A* 256:1-7
- Kiselev MA, Zemlyanaya EV, Aswal VK (2004) Sans study of the unilamellar DMPC vesicles. The fluctuation model of lipid bilayer. *Crystallography reports*
- Kiselev MA, Zemlyanaya EV, Aswal VK, Neubert RH (2006) What can we learn about the lipid vesicle structure from the small-angle neutron scattering experiment? *Eur Biophys J* 35:477-493
- Kucerka N, Kiselev MA, Balgavy P (2004) Determination of bilayer thickness and lipid surface area in unilamellar dimyristoylphosphatidylcholine vesicles from small-angle neutron scattering curves: a comparison of evaluation methods. *Eur Biophys J* 33:328-334
- Lê-Quốc DaL-QK (2000) <http://www.espaceciences.com/index.html>

- Loftsson T, Brewster ME (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85:1017-1025
- Loftsson T, Duchene D (2007) Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 329:1-11
- Loftsson T, Masson M (2001) Cyclodextrins in topical drug formulation: theory and practice. *Int J Pharm* 225:15-30
- Loftsson T, Vogensen SB, Brewster ME, Konradsdottir F (2007) Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *J Pharm Sci* 96:2532-2546
- Mascetti J, Castano S, Cavagnat D, Desbat B (2008) Organization of  $\beta$ -Cyclodextrin under Pure Cholesterol, DMPC, or DMPG and Mixed Cholesterol/Phospholipid Monolayers. *Langmuir* 24:9616-9622
- Másson M, Loftsson T, Másson G, Stefánsson E (1999) Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. *J Control Release* 59:107-118
- Maulucci G, De Spirito M, Arcovito G, Boffi F, Castellano AC, Briganti G (2005) Particle size distribution in DMPC vesicles solutions undergoing different sonication times. *Biophys J* 88:3545-3550
- Messner M, Kurkov SV, Jansook P, Loftsson T (2010) Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *Intl J Pharm* 387:199-208.
- Morse DC, Milner ST (1995) Statistical mechanics of closed fluid membranes. *Phys Rev E* 52:5918-5945
- Ohvo-Rekilä H, Slotte JP (1996) Cyclodextrin-Mediated Removal of Sterols from Monolayers: Effects of Sterol Structure and Phospholipids on Desorption Rate. *Biochem* 35:8018-8024
- Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D (1979) Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta* 557:9-23
- Piel G, Moutard S, Uhoda E, Pilard F, Pierard GE, Perly B, Delattre L, Evrard B (2004) Skin compatibility of cyclodextrins and their derivatives: a comparative assessment using a corneoxenometry bioassay. *Eur J Pharm Biopharm* 57:479-482
- Piel G, Piette M, Barillaro V, Castagne D, Evrard B, Delattre L (2006) Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: the effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics. *Int J Pharm* 312:75-82

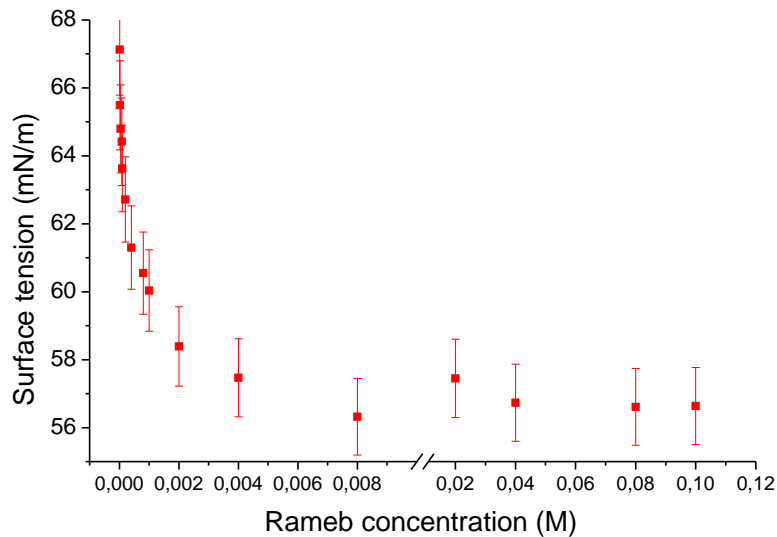


- Piel G, Piette M, Barillaro V, Castagne D, Evrard B, Delattre L (2007) Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes. *Int J Pharm* 338:35-42
- Piette M, Evrard B, Frankenne F, Chiap P, Bertholet P, Castagne D, Foidart JM, Delattre L, Piel G (2006) Pharmacokinetic study of a new synthetic MMP inhibitor (Ro 28-2653) after IV and oral administration of cyclodextrin solutions. *Eur J Pharm Sci* 28:189-195
- Puskás I, Barcza L, Szente L, Csemesz F (2006) Features of the Interaction between Cyclodextrins and Colloidal Liposomes. *J Incl Phenom Macro* 54:89-93
- Puskas I, Csemesz F (2007) Influence of cyclodextrins on the physical stability of DPPC-liposomes. *Colloids Surf B Biointerfaces* 58:218-224
- Schardinger F (1911) kristallisierter Polysaccharide (Dextrine) aus Starkekleister durch Microben. *Zentralbl Bakteriol Parasitenk Abt* 29:188-197
- Szejtli J (2003) Cyclodextrins in the Textile Industry. *Starch - Stärke* 55:191-196
- Tsamaloukas A, Szadkowska H, Slotte JP, Heerklotz H (2005) Interaction of cholesterol with lipid membranes and cyclodextrin characterized by calorimetry. *Biophys J* 89:1109-1119
- Villiers A (1891) Sur la transformation de la féculé en dextrine par le ferment butyrique. *Compt Rend Fr Acad Sci* 112:536-538
- Vrhovnik K, Kristl J, Sentjurc M, Smid-Korbar J (1998) Influence of liposome bilayer fluidity on the transport of encapsulated substance into the skin as evaluated by EPR. *Pharm Res* 15:525-530
- Zidovetzki R, Levitan I (2007) Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta* 1768:1311-1324



## Supplementary data

The evolution of surface tension ( $\gamma$ ) as a function of Rameb concentration is highlighted in figure 30.



**Figure 30: Surface tension as a function of Rameb concentration.**

Figure 30 indicates that the relation between the surface tension and Rameb concentration starts by an exponential decrease followed by a minimal surface tension which corresponds to the critical aggregate concentration (CAC) of the cyclodextrin. The CAC value was estimated at  $15 \pm 2$  mM and is in accordance with results published in the scientific literature (1).

Before the CAC, at constant temperature ( $T$ ) and pressure ( $P$ ), the exponential surface tension decrease can be expressed by the Gibbs isotherm equation (2). Indeed, for a solution constituted of  $i$  different species, the free enthalpy of the surface ( $G$ ) can be written as:

$$dG = -SdT + VdP + \sum_i \mu_i dn_i + \gamma dA \quad (1)$$

$$= \sum_i \mu_i dn_i + \gamma dA \quad (2)$$

where  $\mu_i$  represents the chemical potential of  $n_i$  moles,  $S$  the entropy,  $V$  the volume, and  $A$  the separation surface of two homogenous phases (Gibbs surface).

As the definition of the free enthalpy is:

$$G = U + PV - TS + \sum_i \mu_i n_i + \gamma A \quad (3)$$

where  $dU = TdS - PdV$ , the Gibbs differential is expressed as:

$$dG = \sum_i \mu_i dn_i + \sum_i n_i d\mu_i + \gamma dA + Ad\gamma \quad (4)$$

Comparing equations 2 and 4, we can deduce that:

$$\sum_i n_i d\mu_i + Ad\gamma = 0 \quad (5)$$

$$d\gamma = -\sum_i \Gamma d\mu_i \quad (6)$$

where  $\Gamma$  represents the quantity of surfactant molecules adsorbed on the surface ( $\Gamma = \frac{n_i}{A}$ ).

In our case, the water solution contains Rameb and is in contact with the air. Considering Boulmedarat's work, CD can be assimilated to a surfactant molecule (3, 4). So we can rewrite equation 6 as:

$$-d\gamma = \Gamma_{water} d\mu_{water} + \Gamma d\mu \quad (7)$$

As  $\Gamma_{water} = 0$ , the variation of the surface tension depends directly on the CD chemical potential. The latter can be expressed as a term of activity and chemical potential of the CD ( $\mu^0$ ). If the solution is diluted, the activity term is a function of the molecule concentration ( $c$ ). Consequently we obtain:

$$\mu = \mu^0 + RT \ln c \quad (8)$$

$$\text{and } d\gamma = -\Gamma RT d(\ln c) \quad (9)$$

where  $R$  is the gas constant.

By this last equation, we can see that before reaching the CAC value, the surface tension represented in a logarithmic scale must be a line of negative slope which is related to the quantity of CD adsorbed on the surface solution (see figure 31).

At a concentration level higher than the CAC value, the interface air-water must be saturated in surfactant molecules leading to a constant linear surface tension as observed in our case (see figures 30 and 31).

In the article, we noted that Rameb aggregation is weak. In order to support this fact, we compared the Rameb surface tension measurements with the sodium dodecyl sulfate (SDS) one, which is a well-known surfactant.

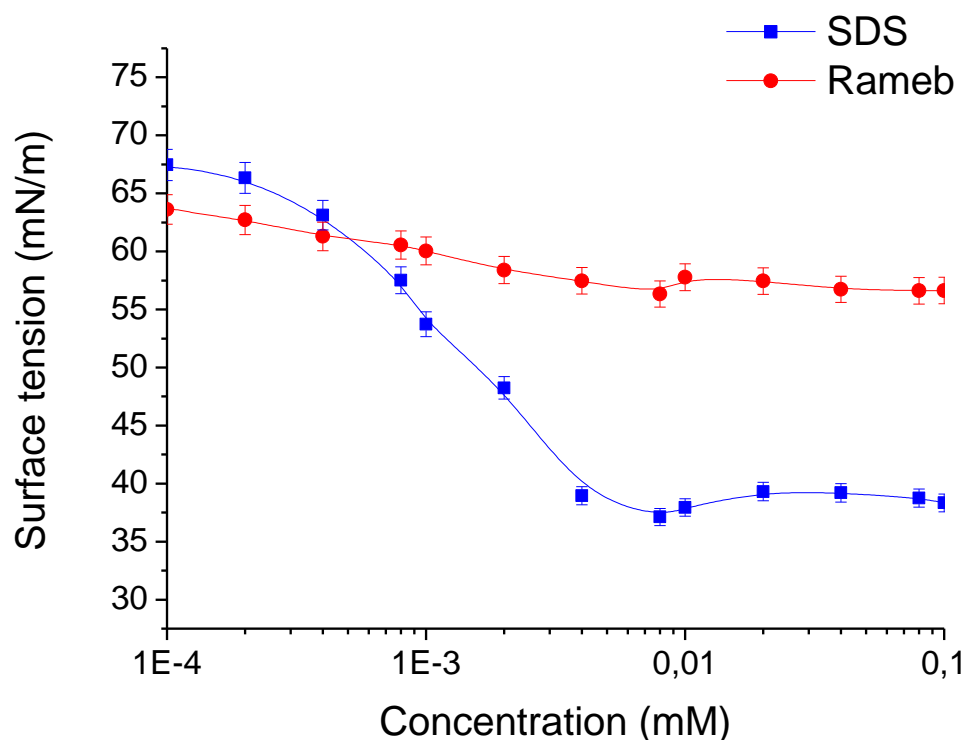


Figure 31: Evolution of the surface tension as a function of SDS (in blue) and Rameb (in red) concentration.

Figure 31 puts in evidence the surface tension in function of SDS (in blue) and Rameb (in red) concentration. A similar behaviour is observed for both surfactants. The critical micellar concentration calculated for the SDS was done in the same way as for the Rameb, and is  $8.15 \pm 0.08$  mM which is in accordance with published results in the literature (5). Comparing both curves, we can clearly see that the aggregation of the Rameb is really weak. Indeed the decline of the Rameb surface tension is less than the SDS one: Rameb is weakly tensioactive, leading probably to a smaller aggregate formation compared to SDS.

1. **Messner, M., S. V. Kurkov, P. Jansook, and T. Loftsson.** 2010. *Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles.* Int J Pharm 387:199-208.
2. **Moore, W.** 1972. *Physical Chemistry.* Longman, harlaw.
3. **Boulmedarat, L., G. Piel, A. Bochot, S. Lesieur, L. Delattre, and E. Fattal.** 2005. *Cyclodextrin-mediated drug release from liposomes dispersed within a bioadhesive gel.* Pharm Res 22:962-971.
4. **Boulmedarat, L.** 2005. *La muqueuse buccale.* In Pharmacy. Paris-Sud university, Paris.
5. **Bahri, M. A., M. Hoebeke, A. Grammenos, L. Delanaye, N. Vandewalle, and A. Seret.** 2006. *Investigation of SDS, DTAB and CTAB micelle microviscosities by electron spin resonance.* Colloid Surface A 290:206-212.

## CHAPITRE IV

# Small-Angle Neutron Scattering investigation on cholesterol-doped liposomes interacting with $\beta$ - cyclodextrin.

A. Grammenos, A. Joret, M. Bahri, M. Hoebeke, B. Leyh  
Manuscrit soumis (European Biophysics Journal)

---





## Introduction

Dans le chapitre précédent il a été démontré que la modélisation des données SANS fournissait un grand nombre d'informations sur l'interaction Rameb/liposome de DMPC. Afin d'affiner notre compréhension sur l'interaction Rameb/système membranaire, une étude sur des liposomes de composition lipidique plus proche des membranes cellulaires a été accomplie. Ainsi, tout comme pour l'étude menée en EPR (Chapitre I), des liposomes unilamellaires formés de DMPC et dopés à 30% de cholestérol ont été préparés. Afin de confirmer de manière indépendante les résultats obtenus par la modélisation des données SANS, une étude en DLS a conjointement été réalisée.

## Résumé des résultats

### • Effet de la Rameb sur l'intégrité des liposomes

L'étude a révélé une diminution régulière de la fraction de molécules lipidiques présentes dans les vésicules unilamellaires au contact de concentrations croissantes de Rameb. Cette réduction est plus importante que celle observée sur des liposomes de DMPC (Chapitre III), ce qui implique que l'extraction lipidique et /ou la destruction de liposomes est plus efficace lorsque les vésicules sont dopées en cholestérol.

### • Effet de la Rameb sur la taille des liposomes et le nombre d'agrégation

La simulation des sections efficaces macroscopiques expérimentales de diffusion neutronique a montré que le rayon moyen des liposomes dopés en cholestérol diminue au contact de concentrations croissantes de Rameb jusqu'à atteindre la taille de vésicules non dopées en cholestérol pour une concentration de 30 mM (figure 32). Il a aussi été observé que le nombre d'agrégation des liposomes diminue linéairement sous l'action de la Rameb : une diminution de 30 % a été calculée lorsque les liposomes sont soumis à 30 mM de Rameb. Ceci implique l'extraction complète du cholestérol de la membrane lipidique pour cette concentration en Rameb. L'analyse des données a également permis de démontrer une diminution régulière de la polydispersité des liposomes sous l'effet de doses croissantes de cyclodextrine (figure 32).

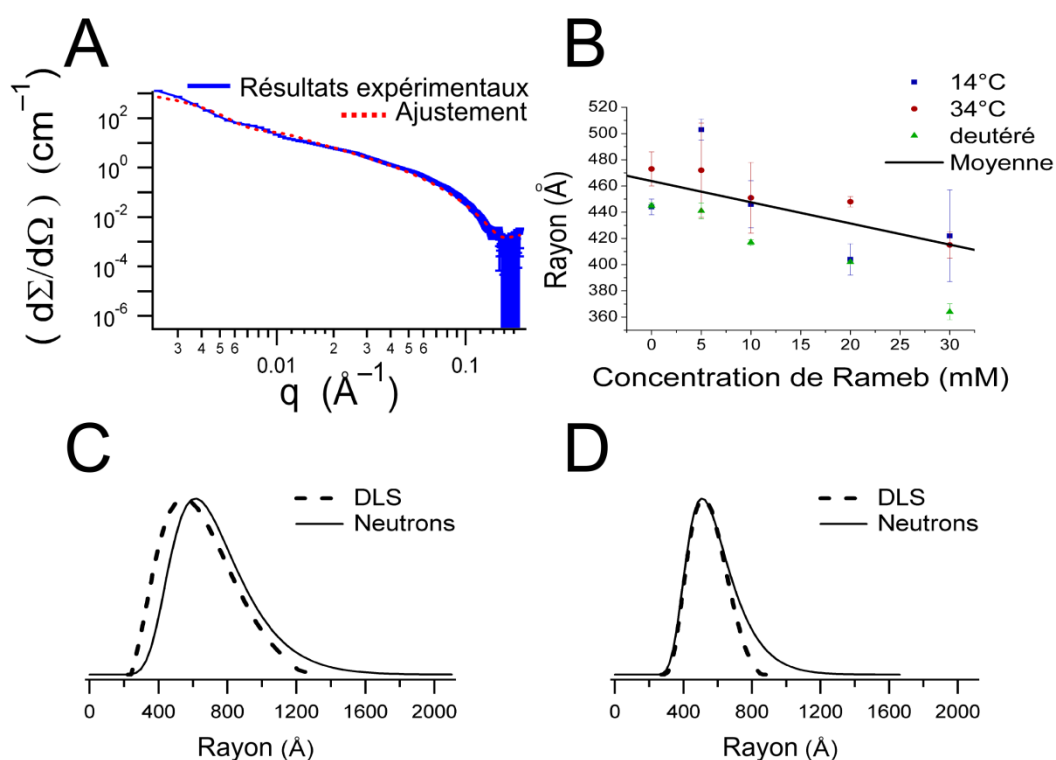


Figure 32: (A) Section efficace macroscopique de diffusion neutronique à 14°C de liposomes soumis à 10 mM de Rameb ; (B) Evolution du rayon moyen des liposomes en fonction de la concentration de Rameb ; Distribution du rayon des liposomes à 14°C (C) et de liposomes deutérés en contact avec 30 mM de Rameb (D).

### • Effet de la Rameb sur la membrane des liposomes

En l'absence de Rameb, l'épaisseur globale de la membrane liposomale est identique à 14°C et 34°C. Ce résultat confirme donc que la présence de 30% de cholestérol dans la membrane liposomale abolit la transition de phase observée pour des liposomes de DMPC (chapitre III). Les données SANS et leur modélisation ont révélé que la cyclodextrine induisait une diminution, régulière en fonction de la concentration, de l'épaisseur de la membrane à 34°C. Cette décroissance de l'épaisseur de la bicouche est directement liée à l'extraction de molécules de cholestérol ; à 34°C, lorsque des liposomes initialement dopés sont soumis à 30 mM de Rameb, leur épaisseur membranaire change pour atteindre celle de liposomes non dopés. A 14°C, aucun changement significatif n'a été remarqué. Il faut cependant noter que l'extraction de cholestérol au sein de la bicouche de DMPC va entraîner la réapparition de la transition fluide-rigide, et qu'à 14 °C, la membrane se trouve dans une phase rigide structurée de plus grande épaisseur.

Dès la plus faible concentration de Rameb utilisée (5mM), une adsorption couvrant la moitié de la surface des vésicules semble se produire, même si la dispersion des données déduites de l'analyse des expériences est relativement importante et ne permet pas d'être très affirmatif. Cette adsorption apparaît plus importante que pour des liposomes non dopés, ce qui est compatible avec une affinité de la cyclodextrine plus élevée pour la molécule de cholestérol que pour celle de DMPC.

### **Conclusion**

L'analyse des données de diffusion neutronique a montré que les effets de la Rameb sur les paramètres structuraux de liposomes dopés en cholestérol sont uniquement dus à une extraction du cholestérol, dont l'étendue dépend de la dose de cyclodextrine utilisée. Cette extraction induit une diminution du rayon moyen des liposomes, du nombre d'agrégation, ainsi que de la polydispersité de la population liposomale. L'extraction s'est également traduite par une diminution de l'épaisseur membranaire à 34°C. En conséquence, sous l'action de la Rameb, une population plus monodisperse et délestée de cholestérol a été mise en évidence. La haute affinité de la cyclodextrine pour le cholestérol a donc été ainsi confirmée, ce qui se marque également par son adsorption directe à la surface des liposomes et par une solubilisation plus importante des liposomes dopés que non dopés.

### ABSTRACT

The Small-Angle Neutron Scattering technique (SANS) was applied to characterize the influence of a randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin (CD), called Rameb, on Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) liposomes doped with cholesterol. From the modelling of the experimental neutron scattering cross sections, the detailed response of the vesicle structure upon addition of increasing amounts of Rameb has been assessed. This study has been performed at two temperatures (14°C and 34°C) and shows that cholesterol extraction by Rameb is directly linked to a decrease of the average radius as well as of the aggregation number of the vesicles. This extraction takes place in a dose-dependent way until a more monodisperse population of cholesterol-free liposomes obtains. In addition, the bilayer thickness was inferred in a wide range of Rameb concentrations, and the Rameb adsorption on the liposome was also demonstrated. SANS appears to be a unique technique to characterise and quantify the detailed effects induced by CD interactions with liposomes.

## INTRODUCTION

Cyclodextrins (CD) are cavitands with the shape of a truncated cone which consist of 6-8 D-glucopyranose units presenting a hydrophilic outer surface and a lipophilic central cavity. Due to their particular structure conferring them the ability to incarcerate a large number of organic molecules (Loftsson and Brewster 1996), CD have found a large field of applications including cosmetics, food and pharmaceuticals (Hedges 1998; Loftsson 2000; Loftsson and Duchene 2007). It is well known that natural cyclodextrins have a limited aqueous solubility (Loftsson and Masson 2001). A random substitution of the hydrogen bond forming hydroxy groups increases this solubility and these particular CD are identified as cyclodextrin derivatives (CDs). However, only a few of them passed through the toxicological evaluation: among them, the randomly-methylated  $\beta$ -cyclodextrin (Rameb) (Loftsson and Masson 2001).

Recently, CDs have been described as drug release modulators within liposomes (Boulmedarat et al. 2005; Gillet et al. 2009). Understanding the mechanism of action of CDs on liposomes is expected to improve the potentialities and the efficiency of CDs in this new field of interest. Moreover, liposomes are not only used as medical drug vectors (Guelluy et al. 2010; Vrhovnik et al. 1998) but they represent also a relevant cell membrane model (Allan 1996). Knowledge of CDs action on liposomes doped with cholesterol is of particular interest. As a matter of fact, cholesterol appears to be the major component of the so-called lipid rafts, which have been recognized as specialized cell-signaling microdomains within the plasma membrane (Simons and Ikonen 1997; Zajchowski and Robbins 2002). Cholesterol plays a key role in maintaining their structure and function (Han and Chiang 2009; Simons and Ikonen 1997; Zajchowski and Robbins 2002). As  $\beta$ -CDs like Rameb have a significant cholesterol affinity (Grammenos et al. 2009; Grammenos et al. 2010; Loftsson and Masson 2001), studying their interaction with membranes may contribute to a better understanding in the lipid raft functions.

Numerous works focused on the mechanism of action of CDs on liposomes and on the influence of CDs on the stability as well as on the integrity of the vesicle bilayers (Goldstein 1984; Grammenos et al. 2009; Grammenos et al. 2010; Hatzi et al. 2007; Piel et al. 2006, 2007; Puskás et al. 2006; Puskas and Csemesz 2007; Tsamaloukas et al. 2005). The liposome integrity has been explored in the presence of cyclodextrin by measuring the release

of a fluorescent probe initially encapsulated in liposomes (Goldstein 1984; Hatzi et al. 2007; Piel et al. 2006, 2007). Differential scanning calorimetry has also been employed to investigate the structural changes induced by CDs on membranes (Piel et al. 2007; Tsamaloukas et al. 2005), as well as freeze-fracture electron microscopy (Piel et al. 2006). Researches also demonstrated the CDs affinities with phospholipids by using binding isotherms (Piel et al. 2006, 2007; Puskás et al. 2006; Puskas and Csempez 2007). A new approach to measure the permeability and the liposome size using Surface Plasmon Resonance has been reported (Besenicar et al. 2008) , and recently, we proposed to use Electron Spin Resonance spectroscopy to study cholesterol extraction by CDs (Grammenos et al. 2009; Grammenos et al. 2010). However, the most common and straightforward method to characterize the interaction of CDs with liposomes remains Photon-Correlation Spectroscopy (PCS) (Piel et al. 2006, 2007; Puskás et al. 2006; Puskas and Csempez 2007).

The size and the shape of the vesicles are commonly described by dynamic and static light scattering. However, this approach provides only information on the global liposome size and on the size dispersity. The internal structure of the bilayer cannot be accessed by such techniques. The main purpose of the present investigation is to analyse the Rameb action on liposome targets doped with cholesterol using small-angle neutron scattering (SANS). In a previous work, we have investigated the influence of Rameb on vesicles made of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) only and demonstrated that SANS can significantly enhance our understanding about the influence of CDs on the liposome bilayer structure (Grammenos et al. 2011). We developed a tailored model of the liposome which includes its different substructures and which also allows for the possible anchoring of Rameb molecules on the liposome outer interface. By fitting this model to the experimental SANS cross sections, we could infer the average radius, the polydispersity, the thicknesses of the hydrophobic and hydrophilic parts of the bilayer and the volume fraction of Rameb molecules anchored on the surface of the vesicle, as a function of the Rameb concentration and of the temperature which was chosen either below or above the transition from the rigid to the fluid membrane state.

In the present paper, we investigate with this unique SANS technique associated with an adapted structural model, how cholesterol-doped liposomes are perturbed by increasing amounts of Rameb. To benefit from the contrast variation advantages, deuterated or partially

deuterated compounds have been used to prepare the liposomes. As for our previous study, the influence of the temperature will be examined. Dynamic light scattering measurements will complement the SANS results.

## MATERIALS AND METHODS

### Liposome preparation

Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), 1,2-Dimyristoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine- $d_{72}$  (DMPC deuterated), cholesterol 2,2,3,4,4,6- $d_6$  and octadecylamine, also called stearylamine (SA), were purchased from Sigma (Aldrich, Belgium). Cholesterol was obtained from Merck (Germany). All products were used without further purification. Lipid vesicles were prepared by hydration of lipid films. Two types of liposomes were prepared and both were doped with 10 mol% of SA. A first liposome type, denoted as unlabeled (not deuterated) liposomes, was composed of unlabeled DMPC and doped with 30 mol% of unlabeled cholesterol. The second liposome type was designated as deuterated liposomes and consists of deuterated DMPC (60 mol%), deuterated cholesterol (30 mol%) and SA (10 mol%). Lipids were first dissolved in chloroform to a final concentration of 7.4 mM. The chloroform/lipids mixture was then stirred for 5 min and the solvent was evaporated under vacuum. The resulting lipid film was suspended in deuterium oxide (Sigma Aldrich, Belgium), and stirred by a vortex mixer in order to obtain large multilamellar vesicles (MLV) (Coderch et al. 2000). After hydration, five freeze-thaw cycles using liquid nitrogen were carried out to allow a better incorporation of the SA and cholesterol into the liposome phospholipidic bilayers. The MLV suspension was then transferred into an extruder (Lipex Biomembrane, Canada) with polycarbonate filters (0.1  $\mu\text{m}$  pore size, Nucleopore, CA), under a pressure gradient of 6800 Pa of nitrogen (Air Liquide, Belgium). The procedure was repeated ten times at 35°C and resulted in unilamellar liposomes (Olson et al. 1979). Once prepared, the liposomes were incubated with the selected concentrations of Rameb (Wockes Chemie GmbH, Germany) which had been first filtered through a microfilter with a pore size of 0.2  $\mu\text{m}$ .

### SANS measurements

The SANS cross sections of unilamellar vesicles in  $D_2O$  in contact with different concentrations of Rameb were recorded at two temperatures (14°C and 34°C) for the

unlabeled liposomes and at 14°C for the deuterated liposomes. The experiments have been performed at the Jülich Centre for Neutron Science (JCNS) and at the CEA-Saclay Léon Brillouin Laboratory (LLB). At JCNS, the KWS-1 and KWS-2 small-angle instruments have been used to collect data at three sample-detector distances: 2, 8 and 20 m. The wavelength of the neutrons,  $\lambda$ , was equal to  $6.00 \pm 0.60 \text{ \AA}$  after mechanical velocity selection. These conditions led us to access a momentum transfer range,  $q$ , from  $2.36 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$  to  $1.96 \cdot 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$  where  $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta)$  and  $2\theta$  is the scattering angle. The scattered neutrons were detected on a two-dimensional detector which was a  $^6\text{Li}$  scintillation counter.

Data acquisition on deuterated liposomes has been performed in the LLB at the CEA-Saclay on the PACE instrument. Data were collected under two sample detector and wavelength conditions, 1.5 m ( $\lambda=5\text{\AA}$ ) and 4.7 m ( $\lambda=12\text{\AA}$ ), leading to a  $3,44 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$  to  $2,24 \cdot 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$   $q$  range. The scattered neutrons were detected on a BF3 position sensitive multidetector made of 30 concentric rings of 1 cm width.

Radial averaging led to a one-dimensional scattering function  $I(q)$ . Corrections for the background and sample holder contributions were carried out according to standard data handling procedures. Liposomal solutions and pure solvent ( $\text{D}_2\text{O}$ ) were treated in the same way, and the scattering intensities were converted to macroscopic scattering cross sections per unit volume,  $d\Sigma/d\Omega(\text{cm}^{-1})$ , by using either calibration with Poly(methyl methacrylate) (JCNS) or the incoherent scattering of water (LLB). The liposome contribution was determined by subtracting the solvent cross section weighted by its volume fraction.

### SANS DATA ANALYSIS

The principle of the evaluation of the vesicle parameters from the SANS scattering cross section was described in our previous work (Grammenos et al. 2011). The same model was applied but it was adapted to include the presence of cholesterol. In summary, the macroscopic scattering cross-section  $d\Sigma/d\Omega$  is proportional to the square of the scattering amplitude:

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega} = \frac{N}{V} |A(q)|^2 \quad (1)$$



$N/V$  represents the number of vesicles per unit volume and  $A(q)$  is the scattering amplitude of a spherical liposome which is given by:

$$A(q) = 4\pi \int_{\text{liposome}} \tilde{\rho}^d(r) \frac{\sin(qr)}{qr} r^2 dr \quad (2)$$

$\tilde{\rho}^d$  represents the excess scattering length density and  $r$  is the radial distance from the center of the vesicle. The addition of cholesterol (CHOL) is taken in account in the calculation of  $\tilde{\rho}^d$  through the following relationship:

$$\begin{aligned} \tilde{\rho}^d(r) &= \frac{b_{SA}}{V_{SA}} \varphi_{SA}(r) + \frac{b_{DMPC}}{V_{DMPC}} \varphi_{DMPC}(r) + \frac{b_{CHOL}}{V_{CHOL}} \varphi_{CHOL}(r) + \frac{b_{D_2O}}{V_{D_2O}} (1 - \varphi_{SA}(r) - \varphi_{DMPC}(r) - \varphi_{CHOL}(r)) - \frac{b_{D_2O}}{V_{D_2O}} \\ &= \left( \frac{b_{SA}}{V_{SA}} - \frac{b_{D_2O}}{V_{D_2O}} \right) \varphi_{SA}(r) + \left( \frac{b_{DMPC}}{V_{DMPC}} - \frac{b_{D_2O}}{V_{D_2O}} \right) \varphi_{DMPC}(r) + \left( \frac{b_{CHOL}}{V_{CHOL}} - \frac{b_{D_2O}}{V_{D_2O}} \right) \varphi_{CHOL}(r) \\ &= \tilde{\rho}_{SA}^d(r) \varphi_{SA}(r) + \tilde{\rho}_{DMPC}^d(r) \varphi_{DMPC}(r) + \tilde{\rho}_{CHOL}^d(r) \varphi_{CHOL}(r) \end{aligned} \quad (3)$$

Because DMPC, cholesterol and stearylamine are amphiphilic molecules, we define as elementary scatterers either their hydrophobic or their hydrophilic moiety. The hydrophilic part of the cholesterol molecules is composed of the hydroxyl group and the hydrophobic part by the hydrocarbonated skeleton. Depending on the zone of the liposome considered,  $b_{SA}$ ,  $b_{CHOL}$  and  $b_{DMPC}$  correspond to the scattering length of the hydrophilic or hydrophobic parts of these molecules and  $V_{SA}$ ,  $V_{DMPC}$ ,  $V_{CHOL}$ , are the corresponding molecular partial volumes. The distribution of the cholesterol molecules is assumed to be uniform in the bilayer (Almeida et al. 1992; Grammenos et al. 2009).

The intensity of the scattered neutron beam depends on the distribution of the scatterers within the membrane. Therefore, the analysis of the macroscopic scattering cross-section leads to information on the structure of the vesicle. The adopted model consists of a superposition of concentric homogeneous substructures (Grammenos et al. 2011). In our experiments, we select liposomes with a unilamellar spherical bilayer of average global radius  $R$  and this bilayer has been modelled by two peripheral hydrophilic parts (with thicknesses equal to  $d_{in}$  and  $d_{out}$ ) and one hydrophobic part (thickness equal to  $D$ ). As the peripheral parts of the bilayer are polar, a linear water penetration profile is assumed in these zones. Due to the curvature of the membrane, the DMPC heads at the outer interface have more space than

at the inner one. The aggregation number corresponding to these two sublayers,  $N_{in}$  and  $N_{out}$  are therefore in principle different (Grammenos et al. 2011). We also assumed a water penetration profile on the outer side of the hydrophobic part until the 5<sup>th</sup> carbon atom of the alkyl chain of DMPC that includes 13 carbon atoms. Consequently, the liposome was modelled with five parts like in our precedent work (Grammenos et al. 2011).

The average molecular volumes in the hydrophobic,  $V_{phobic}$ , and hydrophilic,  $V_{philic}$ , are affected by the incorporation of the cholesterol in the following way

$$V_{phobic} = V_{DMPC}^{phobic} + \frac{[SA]}{[DMPC]} V_{SA}^{phobic} + \frac{[CHOL]}{[DMPC]} V_{CHOL}^{phobic} \quad (4)$$

$$V_{philic} = V_{DMPC}^{philic} + \frac{[SA]}{[DMPC]} V_{SA}^{philic} + \frac{[CHOL]}{[DMPC]} V_{CHOL}^{philic} \quad (5)$$

were  $[DMPC]$ ,  $[CHOL]$  and  $[SA]$  are the respective concentrations of DMPC, cholesterol and stearylamine. By inserting equation (3) into equation (2) and the latter into equation (1), we derived the theoretical macroscopic scattering cross-section corresponding to this model. This cross section has been averaged over the size distribution of the liposomes, for which we assumed the same functional form as in our previous work (Grammenos et al. 2011). This leads to similar equations as in reference (Grammenos et al. 2011), where the cross section depends on the parameters previously described: average radius ( $R$ ), thickness of both the hydrophobic ( $D$ ) and hydrophilic parts ( $d$ ) of the liposome bilayer, liposome polydispersity, aggregation number of the liposomes ( $N$ ) and volume fraction of Rameb on the surface of the vesicle ( $\varphi$ ). It must be emphasized that the aggregation number includes all kinds of molecules present in the bilayer: DMPC, SA and cholesterol. We then inferred experimental values for these structural parameters by fitting the theoretical law to the experimental data. The assessment of the fit quality was performed in the same way as in our previous work (Grammenos et al. 2011). Figure 1 shows typical examples of the experimental cross sections compared to their theoretical fits.

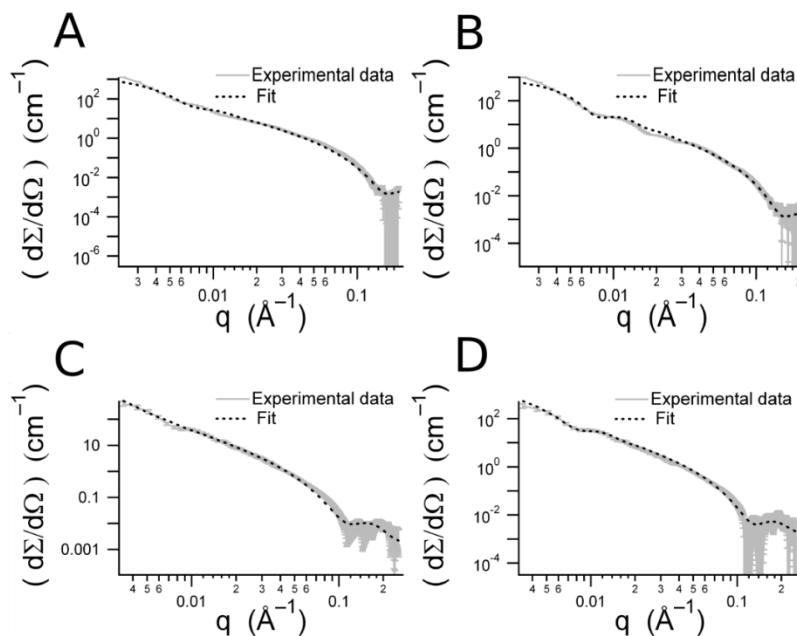
### Dynamic Light Scattering Measurements (DLS)

DLS measurements were carried out with a particle size analyser (Delsa Nano C, Particle Analyser, Beckman Coulter) at a fixed scattering angle of 165°. The light source was

a diode laser operating at  $\lambda=658$  nm and 30 mW power. Measurements on the solutions composed of unlabeled liposomes in contact with different amounts of Rameb were performed at two different temperatures (14 and 34°C) in duplicate. Each measure lasted about 20 minutes. Initial liposome and Rameb solution were both filtered with a microfilter with a pore size of 0.2  $\mu\text{m}$ . Data were handled using the CONTIN algorithm.

As explained in our previous publication (Grammenos et al. 2011), in order to compare the DLS and the SANS data distributions, it is necessary to multiply all SANS size distribution by  $R^4$ , where  $R$  represents the radius of the vesicle, and by the form factor,  $F(q;R)$ , of the same vesicle at the  $q$  value corresponding to the wavelength and detection angle of the DLS instrument. Because all the information required to calculate  $F(q;R)$  is available from the analysis of our SANS data, we found more consistent to convert the SANS distributions to equivalent DLS distributions .

## RESULTS AND DISCUSSION

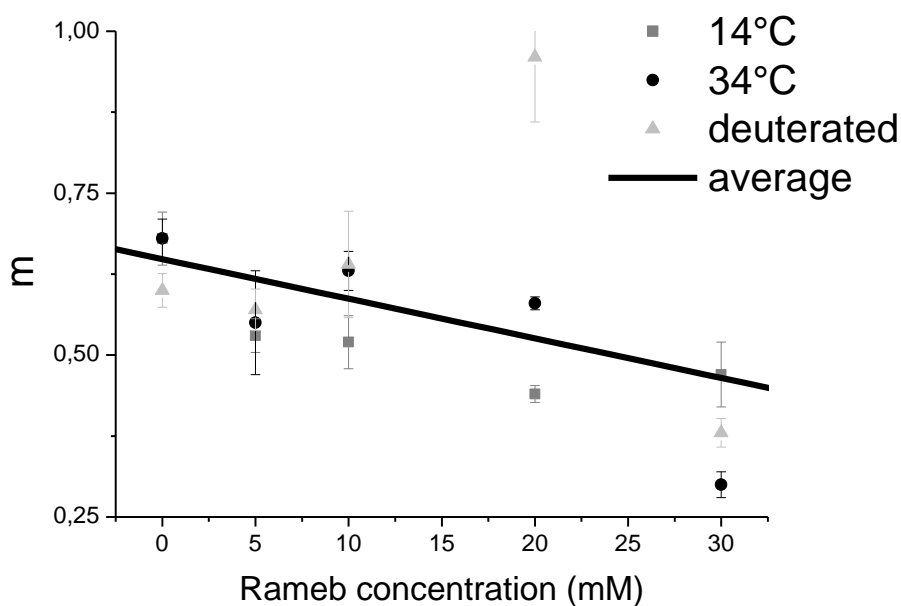


**Fig. 1:** Typical experimental macroscopic scattering cross-sections of the liposomes (solid line) and fits to the model described in the text (dotted line) obtained at 14°C; unlabeled liposomes in contact with 10 mM (A) and 20 mM of Rameb (B); deuterated liposomes in contact with 5 mM (C) and 20 mM of Rameb (D).

Typical SANS cross-sections of liposomes with or without added Rameb, as well as fits using the model described in the previous section are displayed in Fig. 1. A good agreement is observed between the experimental and fitted data.

### Fraction of molecules included into unilamellar liposomes

Not all DMPC phospholipids molecules are included in vesicles which fall in the observation range of the SANS experiments. Knowing the total DMPC concentration and the experimental scattering cross section, the fraction of lipid molecules contained in the vesicles can be inferred. We denoted this parameter as  $m$  in our previous paper (Grammenos et al. 2011). Fig. 2 shows the evolution of this parameter upon increasing Rameb concentration at 14°C and 34°C, that is below and above the rigid-fluid transition temperature of the pure DMPC bilayer (23.9 °C).



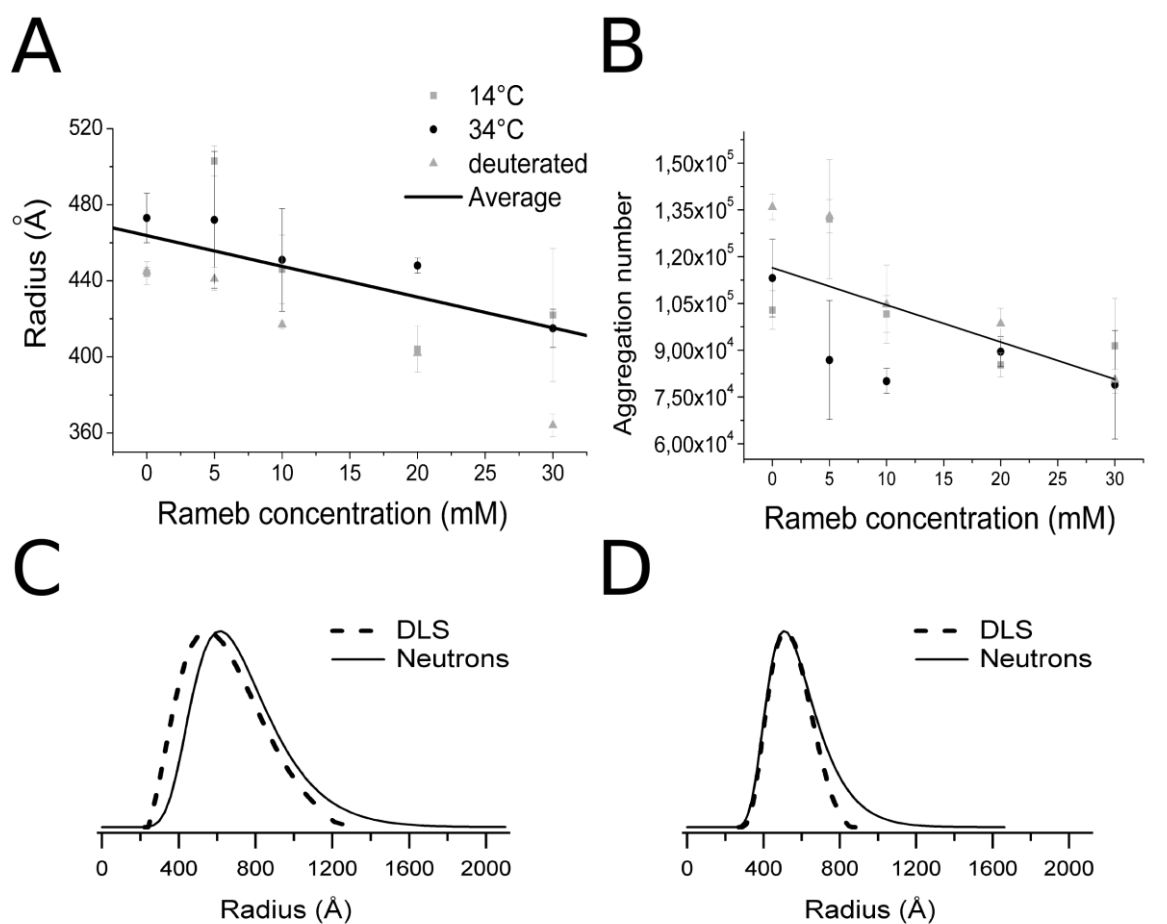
**Fig. 2: Influence of Rameb on the lipid fraction included in the unlabelled cholesterol-doped liposomes at 14°C (grey squares) and 34°C (black dots) and in the deuterated liposomes (grey triangles).**

A significant linear decrease of  $m$  is observed for both temperatures. At the largest Rameb concentration investigated (30 mM),  $41 \pm 4$  % of liposomes happen to be affected by lipidic extraction and/or by vesicle disruption. This means that Rameb extracts molecules from the liposome monolayers, leading to the solubilisation of the vesicles. No effect of the temperature could be evidenced. The extracting role of Rameb has already been demonstrated

as well as its solubilisation role (Boulmedarat et al. 2005). In comparison with our previous study where we showed that Rameb affects  $30 \pm 2$  % of DMPC liposomes, it can be inferred that Rameb damages  $\sim 10$  % more liposomes when they are doped with cholesterol (Grammenos et al. 2011).

### Liposome Radius and Aggregation Number

Fig. 3A shows the evolution of the average liposome radius inferred from SANS upon addition of increasing concentration of Rameb at 14°C and 34°C. A significant monotonous decrease is observed. Here also no significant temperature effect takes place. This decrease has been confirmed by DLS measurements (Figs. 3C and 3D).



**Fig. 3: Liposome average radius (A) and aggregation number (B) at different Rameb concentrations for deuterated (grey triangles) and unlabeled liposomes, at 14°C (grey squares) and 34°C (black dots); radius distribution at 14°C determined by DLS (dotted line) and SANS (solid line) for unlabeled liposomes (C) and for deuterated liposomes (D) in contact with 30 mM of Rameb.**

Liposomes doped with 30 % of cholesterol display an average radius of  $454 \pm 5$  Å at 14 and 34°C. When 30 mM of Rameb is reached, the average liposome radius reaches  $400 \pm 12$  Å which corresponds exactly to the size of cholesterol-free liposomes (Grammenos et al. 2011). Therefore, even if Rameb is able to extract DMPC phospholipids from membranes (Grammenos et al. 2011), this extraction turns out to be negligible when liposomes are doped with cholesterol. This result is in agreement with our previous Electron Spin Resonance study (Grammenos et al. 2009).

The decrease of the liposome size is directly linked to a decrease of the average aggregation number as shown in Fig. 3B. Indeed, when 30 mM of Rameb is added, a decrease of the aggregation number by  $29 \pm 9$  % is observed. We recall that the aggregation number takes the cholesterol molecules also into account. As this result matches the initial molar fraction of cholesterol (30 %), we have good evidence that Rameb has a much larger affinity for cholesterol than for DMPC and that complete cholesterol extraction occurs at a Rameb concentration equal to 30 mM, as already suggested by the data on the average radius (Fig. 3A).

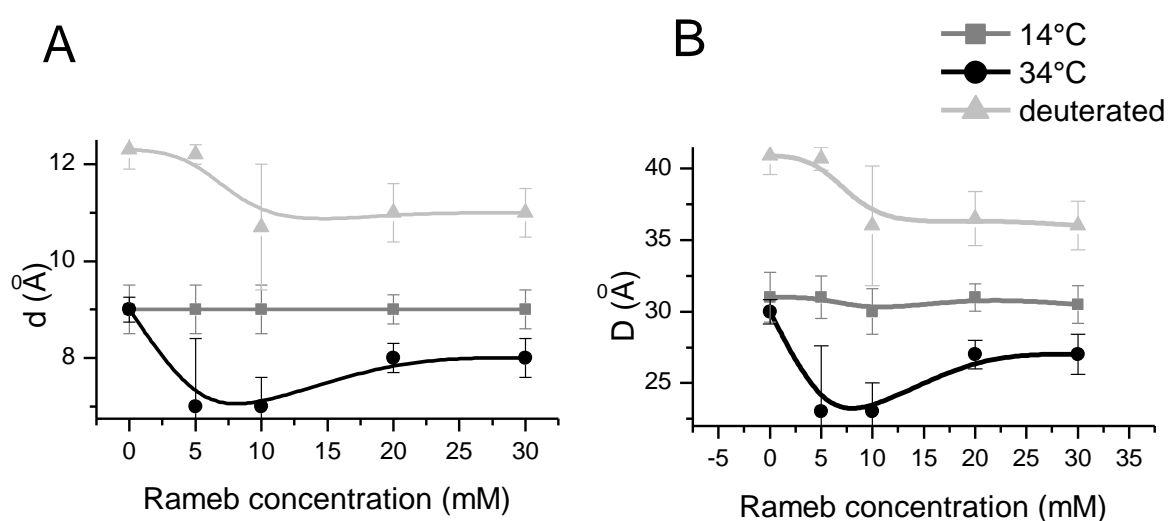
### **Adsorption of Rameb on the liposome external layer**

Analyzing the SANS data gives us also access to the volume fraction of Rameb which is adsorbed on the vesicle outer interface. Such an adsorption of Rameb on membranes has been previously reported by us with DMPC-liposomes (Grammenos et al. 2011) in agreement with a study of Mascetti et al. (Mascetti et al. 2008). It has been rationalized by invoking the formation of a hydrogen bond between the phospholipidic polar head group and one hydroxyl group of CD. The standard deviations on this adsorbed volume fraction observed for cholesterol-doped liposomes are, however, much larger than in our previous work on cholesterol-free vesicles, so that the following conclusions are only tentative. Contrarily to the progressive, dose-dependent adsorption observed for cholesterol-free DMPC liposomes, Rameb seems to cover half of the cholesterol-doped liposome surface already for the smallest Rameb concentration used (5 mM). This direct adsorption could be related to the high cholesterol affinity of Rameb. It must be stressed that the adsorption which is observed concerns only the surviving liposomes. The vesicles that have been solubilized (see evolution of the  $m$  parameter, Fig. 2) are not directly detected under our SANS conditions.

## Bilayer thickness

Fig. 4 highlights how the hydrophilic (Fig. 4A) and hydrophobic (Fig. 4B) sublayers of the membrane respond to an increasing Rameb concentration. The total bilayer thickness is equal to  $D + 2d$ .

As inferred from the data modeling, the unlabeled cholesterol-doped liposomes at 14°C and 34°C have the same total bilayer thickness ( $48.5 \pm 0.5 \text{ \AA}$ ) in the absence of Rameb, with hydrophilic and hydrophobic contributions equal to respectively  $9.0 \pm 0.3 \text{ \AA}$  and  $30.5 \pm 1.5 \text{ \AA}$ . Temperature has no influence on the membrane thickness under such conditions because cholesterol abolishes the endothermic phase transition of the bilayer (Bieri and Wallach 1975; Grammenos et al. 2009). Indeed, up to 25 mol% of cholesterol, the DMPC bilayer is in a liquid ordered phase ( $l_0$ ), which is not significantly affected by a temperature change (Almeida et al. 1992).



**Fig. 4: Hydrophilic (A) and hydrophobic (B) sublayer thickness for deuterated (grey triangles) and unlabeled liposomes as a function of the Rameb concentration at 14°C (grey squares) and 34°C (black dots)**

Progressive addition of Rameb leads to a decrease of the bilayer thickness at 34°C. When 30 mM of Rameb is reached the bilayer thickness reaches  $43 \pm 2 \text{ \AA}$  with a hydrophilic contribution equal to  $8.0 \pm 0.4 \text{ \AA}$  and a hydrophobic contribution equal to  $27 \pm 1.5 \text{ \AA}$ . These

values correspond exactly to those found for cholesterol-free liposomes in our previous article (Grammenos et al. 2011), meaning that the decrease is directly linked to cholesterol extraction. Indeed, the increase of the bilayer width due to cholesterol insertion has already been pointed out in the literature (Edholm and Nyberg 1992; Hofsäß et al. 2003). Consequently, this result supports the conclusions drawn in the previous subsections from the analysis of the average radius and of the aggregation number.

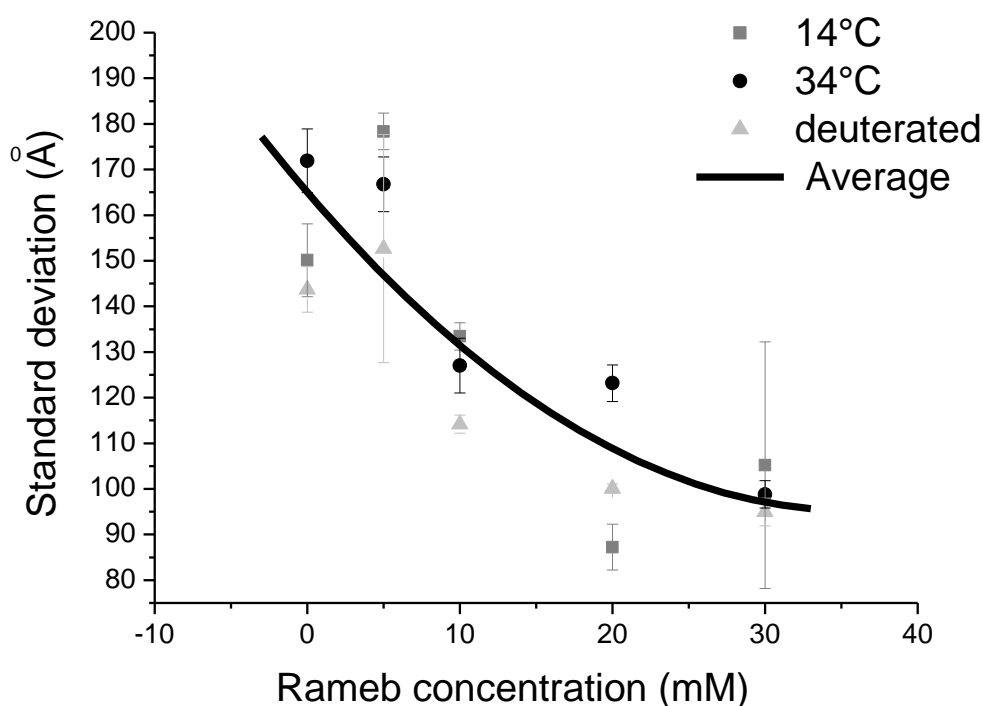
Even if no significant change of the membrane thickness takes place at 14°C for the unlabeled liposomes, this argument does not imply the absence of cholesterol extraction. As observed in our previous investigation on cholesterol-free liposomes, the membrane is thicker in the rigid gel phase than in the fluid phase because the DMPC chains adopt extended *anti*-conformations in the gel phase. Rameb-induced extraction of cholesterol from doped liposomes at 14°C is thus expected to lead to two antagonist phenomena: membrane thinning due to the removal of cholesterol and membrane thickening because the fluid-rigid transition reappears, with the global result that the membrane thickness remains more or less unaffected. It has been shown that by heating a pure DMPC membrane, and switching from the gel to the fluid phase, a decrease of 4 Å (Pencer et al. 2005) or 5 Å in the membrane thickness (Kučerka et al. 2005; Tristram-Nagle et al. 2002) takes place. In the present work, when 30 mM of Rameb is reached, the difference between the unlabeled vesicle membrane thickness above and below the DMPC bilayer transition temperature amounts to 5 Å (within experimental errors). This result strongly suggests that cholesterol is entirely removed from the membrane leading to a pure DMPC bilayer (with still 10% SA, however).

Fig. 4 shows also that, at 14°C, the bilayer thickness of the deuterated liposomes decreases and that the reduction is similar, within experimental errors, to that obtained for the unlabeled liposomes at 34°C. Such a reduction of the membrane thickness in the gel phase has been already pointed up in a diffraction study (Léonard et al. 2001). They suggest that cholesterol extraction leads to two antagonist effects in the bilayer; the alkyl chain order increases, leading to membrane thickening, while a lipid tilt takes place, inducing membrane thinning. The net result of both effects has been estimated, in a DMPC bilayer, to be equal to 5 Å. Consequently, for the deuterated liposomes, the cholesterol extraction must be mainly governed by the disruption of the lipid tilt, because the observed bilayer thinning amounts also to 5 Å.



The thickness of the deuterated liposomes is observed to be larger than for the unlabeled ones. It can be tentatively noted that deuterium substitution has been shown to affect both hydrophobic interactions and hydrogen bonding (Hammouda et al. 2002; Itoh and Sato 1984; Turowski et al. 2003) and that these effects might have consequences on the self-assembling process and, therefore on the chain conformations and on the membrane thickness.

### Polydispersity



**Fig. 5:** Standard deviation of the size distribution of unlabelled liposomes at 14°C (grey squares) and 34°C (black dots) and of deuterated liposomes (grey triangles) as a function of the Rameb concentration

Fig. 5 shows the influence of Rameb on the polydispersity measured as the standard deviation of the size distribution (Å). A decrease of  $36 \pm 8$  % is displayed for both temperatures. These results were confirmed by DLS experiments (see Figs. 3C and D).

The polydispersity data highlights a lipidic reorganization of the vesicles to reach a less polydisperse population. Such a behavior has been previously reported on large liposomes (Leventis and Silvius 2001). The standard deviation reached at [Rameb] = 30 mM is close to 100 Å, a value very comparable with the 100-110 (Å) range observed for cholesterol-free liposomes without Rameb. We emphasized in the previous parts of the discussion that, in the

presence of cholesterol, the extraction of DMPC molecules is negligible in the observed surviving liposomes. We repeatedly found that the structure found for initially doped liposomes interacting with Rameb (30 mM) is similar to that of pure cholesterol-free liposomes (with 10% SA). We may therefore conclude that the decrease of the size dispersion is linked to the cholesterol extraction.

## CONCLUSION

The small-angle neutron scattering technique was successfully applied to characterise the influence of a methylated  $\beta$ -cyclodextrin (Rameb) on the structural parameters of liposomes doped with cholesterol. The SANS data are corroborated by DLS experiments but provide us with a much more detailed picture of the liposome – cyclodextrin interactions.

The evolution of the fraction of lipid molecules inserted in the liposomes ( $m$  parameter), of the aggregation number, of the average radius as well as of the bilayer thickness confirms that Rameb is able to significantly affect the vesicles and to extract cholesterol in a dose dependent-way until removing it completely from the membrane at a Rameb concentration of 30 mM. At this concentration, the observed structure for the surviving liposomes coincides within confidence limits with that observed in our previous work for pure cholesterol-free DMPC liposomes. It is concluded that the Rameb-induced extraction leads to a less polydisperse vesicle population consisting of pure DMPC phospholipids (with 10% SA).

The combination of our various results gives us arguments to conclude that Rameb does not extract DMPC phospholipids when vesicle membranes are doped with cholesterol. This high relative cholesterol affinity seems also supported by the covering of the liposome by cyclodextrin molecules already at low Rameb concentration (5 mM), a process that did not happen for liposomes consisting only of DMPC phospholipid molecules. It must be reminded, however, that the results on the Rameb coverage on the liposomes are affected by large experimental uncertainties.

In the absence of Rameb, the global thickness of the cholesterol-doped bilayer as well as the respective thicknesses of the sublayers are equal at 14°C and 34°C because cholesterol

erases the rigid-fluid transition. After complete cholesterol extraction by Rameb (30 mM), the membrane thickness is reduced at 34°C but remains nearly unchanged at 14°C for the unlabeled liposomes. The decrease at 34°C can be explained by a relaxation of the chains due to the free space left by the extracted cholesterol molecules. At 14°C, this effect is counterbalanced by the fluid-rigid transition which leads to extended chains with prevailing *anti* conformations. The results on the labeled liposomes might be perturbed by the deuterium substitution which could affect both the hydrophobic interactions and the hydrogen bonds.

In conclusion, the model proposed in this paper leads to a consistent analysis of most of the data inferred from our SANS measurements and allows us to draw conclusions on the detailed mechanisms of interaction between cyclodextrins and liposomes. We emphasize that the methods used in this work can be applied to the characterization of any kind of vesicles doped with cholesterol and incubated with different types of cyclodextrins.

## ACKNOWLEDGEMENT

This work is partly based on the experiments performed at the Jülich Centre for Neutron Science (JCNS) (Jülich, Germany) and at the laboratory Leon Brillouin (Saclay, France). Financial support from the European Commission giving access to these research centres is gratefully acknowledged. The authors are grateful to the Centre for Study and Research on Macromolecules (CERM) and to the Structural Inorganic Chemistry Laboratory (LCIS) based at the University of Liege in Belgium, for having made their DLS equipment available.

## REFERENCES

- Allan D (1996) Mapping the lipid distribution in the membranes of BHK cells (mini-review).  
Molecular membrane biology 13:81-84
- Almeida PFF, Vaz WLC, Thompson TE (1992) Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis.  
Biochem 31:6739-6747
- Besenicar M, Bavdek A, Kladnik A, Macek P, Anderluh G (2008) Kinetics of cholesterol extraction from lipid membranes by methyl- $\beta$ -cyclodextrin-A surface plasmon resonance approach. Biochem Biophys Acta Biomembranes 1778:175-184

- Bieri VG, Wallach DF (1975) Fluorescence quenching in lecithin and lecithin/cholesterol liposomes by paramagnetic lipid analogues. Introduction of a new probe approach. *Biochim Biophys Acta* 389:413-427
- Boulmedarat L, Piel G, Bochot A, Lesieur S, Delattre L, Fattal E (2005) Cyclodextrin-mediated drug release from liposomes dispersed within a bioadhesive gel. *Pharm Res* 22:962-971
- Coderch L, Fonollosa J, De Pera M, Estelrich J, De La Maza A, Parra JL (2000) Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. *J Control Release* 68:85-95
- Edholm O, Nyberg AM (1992) Cholesterol in model membranes. A molecular dynamics simulation. *Biophys J* 63:1081-1089
- Gillet A, Grammenos A, Compere P, Evrard B, Piel G (2009) Development of a new topical system: drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome. *Int J Pharm* 380:174-180
- Goldstein DB (1984) The Effects of Drugs on Membrane Fluidity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 24:43-64
- Grammenos A, Bahri MA, Guelluy PH, Piel G, Hoebeke M (2009) Quantification of Randomly-methylated-beta-cyclodextrin effect on liposome: an ESR study. *Biochem Biophys Res Commun* 390:5-9
- Grammenos A, Joset A, Hoebeke M, Leyh B (2011) Investigation of the interaction between cyclodextrin and DMPC liposomes: a small angle neutron scattering study. *Biophys J* under submission: EBJO-D-11-00195.
- Grammenos A, Mouithys-Mickalad A, Guelluy PH, Lismont M, Piel G, Hoebeke M (2010) ESR technique for noninvasive way to quantify cyclodextrins effect on cell membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 398:350-354
- Guelluy PH, Fontaine-Aupart MP, Grammenos A, Lecart S, Piette J, Hoebeke M (2010) Optimizing photodynamic therapy by liposomal formulation of the photosensitizer pyropheophorbide-a methyl ester: in vitro and ex vivo comparative biophysical investigations in a colon carcinoma cell line. *Photochem Photobiol Sci* 9:1252-1260
- Hammouda B, Ho D, Kline S (2002) SANS from Poly(ethylene oxide)/Water Systems. *Macromolecules* 35
- Han S, Chiang JYL (2009) Mechanism of Vitamin D Receptor Inhibition of Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase Gene Transcription in Human Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 37:469-478

- Hatzi P, Mourtas S, Klepetsanis PG, Antimisiaris SG (2007) Study of the interaction between cyclodextrins and liposome membranes: effect on the permeability of liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 225:15-30
- Hedges AR (1998) Industrial Applications of Cyclodextrins. *Chem Rev* 98:2035-2044
- Hofsäß C, Lindahl E, Edholm O (2003) Molecular Dynamics Simulations of Phospholipid Bilayers with Cholesterol. *Biophys J* 84:2192-2206
- Itoh TJ, Sato H (1984) The effects of deuterium oxide (2H<sub>2</sub>O) on the polymerization of tubulin in vitro. *Biochem Biophys Acta General Subjects* 800:21-27
- Kučerka N, Liu Y, Chu N, Petrache HI, Tristram-Nagle S, Nagle JF (2005) Structure of Fully Hydrated Fluid Phase DMPC and DLPC Lipid Bilayers Using X-Ray Scattering from Oriented Multilamellar Arrays and from Unilamellar Vesicles. *Biophys J* 88:2626-2637
- Léonard A, Escrive C, Laguerre M, Pebay-Peyroula E, Néri W, Pott T, Katsaras J, Dufourc EJ (2001) Location of Cholesterol in DMPC Membranes. A Comparative Study by Neutron Diffraction and Molecular Mechanics Simulation. *Langmuir* 17:2019-2030
- Leventis R, Silvius JR (2001) Use of Cyclodextrins to Monitor Transbilayer Movement and Differential Lipid Affinities of Cholesterol. *Biophys J* 81:2257-2267
- Loftsson T (2000) Cyclodextrin in skin delivery. *Cosmet* 115:59-66
- Loftsson T, Brewster ME (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85:1017-1025
- Loftsson T, Duchene D (2007) Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 329:1-11
- Loftsson T, Masson M (2001) Cyclodextrins in topical drug formulation: theory and practice. *International Journal of Pharmaceutics* 225:15-30
- Mascetti J, Castano S, Cavagnat D, Desbat B (2008) Organization of  $\beta$ -Cyclodextrin under Pure Cholesterol, DMPC, or DMPG and Mixed Cholesterol/Phospholipid Monolayers. *Langmuir* 24:9616-9622
- Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D (1979) Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta* 557:9-23
- Pencer J, Nieh M, Harroun T, Krueger S, Adams C, Katsaras J (2005) Bilayer thickness and thermal response of dimyristoylphosphatidylcholine unilamellar vesicles containing cholesterol, ergosterol and lanosterol: a small-angle neutron scattering study. *Biochim Biophys Acta* 1720: 84-91

- Piel G, Piette M, Barillaro V, Castagne D, Evrard B, Delattre L (2006) Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: the effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics. *Int J Pharm* 312:75-82
- Piel G, Piette M, Barillaro V, Castagne D, Evrard B, Delattre L (2007) Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes. *Int J Pharm* 338:35-42
- Puskás I, Barcza L, Szenté L, Csémpesz F (2006) Features of the Interaction between Cyclodextrins and Colloidal Liposomes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 54:89-93
- Puskas I, Csémpesz F (2007) Influence of cyclodextrins on the physical stability of DPPC-liposomes. *Colloids Surf B Biointerfaces* 58:218-224
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572
- Tristram-Nagle S, Liu Y, Legleiter J, Nagle JF (2002) Structure of Gel Phase DMPC Determined by X-Ray Diffraction. *Biophys J* 83:3324-3335
- Tsamaloukas A, Szadkowska H, Slotte JP, Heerklotz H (2005) Interaction of cholesterol with lipid membranes and cyclodextrin characterized by calorimetry. *Biophys J* 89:1109-1119
- Turowski M, Yamakawa N, Meller J, Kimata K, Ikegami T, Hosoya K, Tanaka N, Thornton ER (2003) Deuterium isotope effects on hydrophobic interactions : the importance of dispersion interactions in the hydrophobic phase. *J Am Chem Soc* 125:13836-13849
- Vrhovnik K, Kristl J, Sentjurc M, Smid-Korbar J (1998) Influence of liposome bilayer fluidity on the transport of encapsulated substance into the skin as evaluated by EPR. *Pharm Res* 15:525-530
- Zajchowski LD, Robbins SM (2002) Lipid rafts and little caves. *European Journal of Biochemistry* 269:737-752

## CHAPITRE V

An ESR, Mass Spectrometry and Fluorescence microscopy approach to study the stearic acid derivatives anchoring in cells.

A. Grammenos, M. Fillet, M. Collodoro, S. Lecart, C. Quoilin, M-P Fontaine-Aupart and M. Hoebeke

Manuscrit soumis (Applied Magnetic Resonance)

---





## Introduction

Dans le chapitre II, les interactions entre la Rameb et les membranes cellulaires ont été analysées via la spectroscopie EPR associée au marquage de spin. Dans cette étude, nous avons marqué des cellules cancéreuses du colon (HCT 116) à l'aide de 5-DSA. Il est communément accepté que ces sondes se logent uniquement au sein des membranes plasmiques, donnant ainsi des informations sur ces dernières. Pourtant, à notre connaissance, aucune étude ne confirme cette hypothèse. C'est pourquoi ce travail propose de vérifier si le 5-DSA ne se loge pas dans d'autres membranes que la membrane plasmique.

## Résumé des résultats

Les cellules HCT-116 furent marquées par des sondes 5-DSA et fractionnées suivant la méthode de Mazzucchelli que nous avons adaptée pour nos besoins (voir matériel et méthode). Trois fractions furent élaborées : (i) la fraction nommée membranes majoritairement composée de la membrane plasmique, (ii) la fraction nucléaire comportant les noyaux cellulaires et (iii) la fraction cytosolique comprenant le cytosol et le réticulum endoplasmique.

### • EPR & Spectrométrie de masse

Chaque fraction a ensuite été passée à l'EPR. Un spectre est apparu pour la fraction membrane et fraction noyaux montrant une présence significative des sondes dans ces deux échantillons (figure 32). Après analyse des spectres, il a été établi que  $3.5 \pm 0.5$  fois plus de sondes se trouvent dans la fraction membrane que dans la fraction noyau.

Les mêmes échantillons ont été étudiés en spectrométrie de masse. Cette technique a révélé une présence significative de sondes dans toutes les fractions cellulaires, traduisant ainsi une plus grande sensibilité aux sondes 5-DSA en spectrométrie de masse qu'en spectrométrie EPR (figure 32). Cependant, l'analyse des spectres montre une présence  $4.2 \pm 0.5$  fois plus importante dans la fraction membrane que dans la fraction noyau. Ces résultats corroborent donc ceux obtenus en EPR.

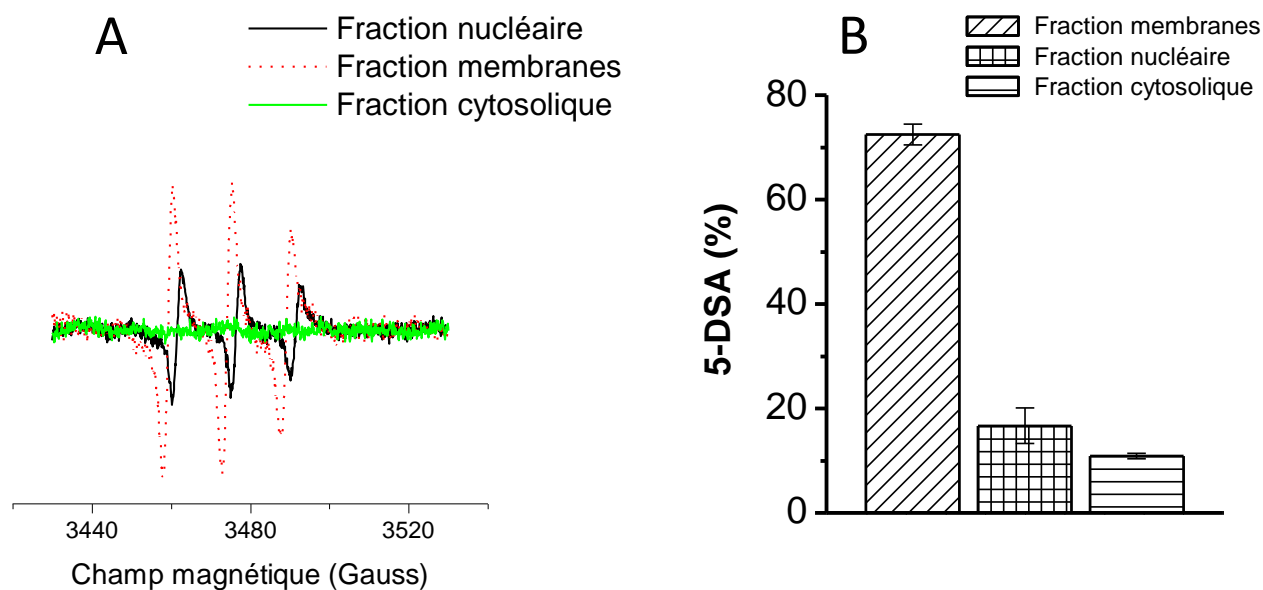


Figure 32 : (A) spectres du 5-DSA dans les différentes fractions cellulaires ; (B) pourcentage relatif trouvé dans les différentes fractions cellulaires grâce à la technique de spectrométrie de masse.

### • Microscopie de fluorescence

Comme les sondes se retrouvent dans toutes les fractions membranaires cellulaires, nous avons voulu savoir si cette localisation était effective ou uniquement due à une contamination liée au protocole de fractionnement. La microscopie de fluorescence nous a semblé être la meilleure technique pour répondre à cette interrogation.

Les cellules ont été marquées par des fluorophores spécifiques aux trois fractions. Ainsi les noyaux furent marqués pour la fraction nucléaire, le réticulum endoplasmique pour la fraction cytosolique, et l'appareil de Golgi pour la fraction membranes. Après avoir vérifié que les marqueurs spécifiques ne migraient pas au cours du temps, les cellules furent fractionnées et chaque échantillon fut analysé. L'analyse des images de fluorescence a montré que des marqueurs de la fraction membranes se retrouvaient dans la fraction cytosolique. De même, les marqueurs de la fraction cytosolique ont été observés dans toutes les fractions. Les ratios des marqueurs dans les différentes fractions sont du même ordre de grandeur que ceux trouvés en spectrométrie de masse et en EPR.

## Conclusion

Des cellules HCT116 ont été mises en contact avec du 5-DSA. Elles ont ensuite été fractionnées pour voir si ces sondes peuvent diffuser à travers les différentes membranes cellulaires.

Les techniques d'EPR et de spectrométrie de masse ont démontré que le 5 DSA réside majoritairement dans la fraction membranes, mais est également piégé dans les fractions cytosolique et nucléaire. Toutefois, la spectroscopie d'EPR n'est significativement sensible qu'aux sondes localisées dans les fractions membranes et noyaux.

La pureté des fractions cellulaires a ensuite été étudiée par microscopie de fluorescence et il a été prouvé que la localisation du 5-DSA dans la fraction noyaux n'était liée qu'au protocole de fractionnement. Ces résultats établissent donc que dans nos conditions expérimentales, l'EPR n'est sensible qu'aux sondes situées dans la fraction membranes, qui est en majorité composée de la membrane plasmique.

### **ABSTRACT**

Lateral phase separations in biological membranes are of great interest, making Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy combined with spin labelling a non destructive and sensitive technique for the study of lipid rafts. This is currently accepted that spin probe localization is on the plasma membrane. However, no study confirms this hypothesis. Herein, we report, for the first time, an accurate multi spectral method for the quantification of lipid spin label presence in every sub-cellular fraction. Cells were incubated with 5-doxy stearic acid derivative and then sub-fractionated. Results of our multimodal spectroscopy approach ubiquitously demonstrate that the presence of ESR spin label only sets in the plasma membranes.

## INTRODUCTION

It is now well recognized that plasma membrane is one of the most important elements in cell metabolism. Active in many fields such as cell locomotion, exclusion of toxic ions, interaction with molecules or cells, the membrane is often the first element to be affected in many human diseases [1]. No more defined by the fluid mosaic model described by Singer and Nicholson [2], it is now accepted that cell membranes are complicated entities partitioned in different domains [3-7]. These domains are now referred to under the general heading of lipid rafts which are small (10-200 nm) heterogeneous, highly dynamic, sterol- and sphingolipid-enriched domains that compartmentalize cellular processes [8]. However, the issue related to the role and the real nature of raft must still be clarified. Their morphology, size, density and molecular composition are until now under consideration, and the scientific community is intensely debating about these microdomains [9-13]. Electron Spin resonance spectroscopy (ESR) associated with spin labelling fits particularly well in with the study of the structural and dynamic properties of cellular membranes and in particular with the changes in lipid bilayer organisation [5, 14-16]. Such studies are based on the introduction of lipophilic spin probe molecules into biomembranes. As the ESR spectrum is strongly dependent on the environment in which the nitroxide probe is placed, the analysis of its motion in terms of hyperfine splittings, g factor and line width gives information about the spin probe surroundings [17]. ESR spectra of probes embedded in cell membrane are generally composed of several superimposed spectral components due to cell membrane complexity [18]. In view of the evidence for lateral phase separations in biological membranes, it is generally accepted that each component of the spectrum refers to a selected area in the membrane. Previously, our team demonstrated that the flexibility of certain probes must also be taken into consideration in the ESR spectrum analysis [19]. Another point widely accepted is that spin probes are only localized in the plasma membrane and thus that the probes' ESR spectrum provides information just about the latter [17, 20]. To the best of our knowledge, no study confirms this hypothesis. Therefore, this work proposes to examine the positioning of one typical ESR spin label in cells and the possibility that the probes are trapped in other places than in the plasma membrane. To be the more accurate as possible, the ESR results were compared to mass spectrometric investigations and fluorescence imaging.

# MATERIAL AND METHODS

## Cell culture

The human colon carcinoma cell line HCT-116 was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Belgium) supplemented with 10% foetal calf serum (Invitrogen, Belgium), 2 mM of L-glutamine, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg) (Invitrogen, Belgium) and was maintained in a humidified 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cells were not used at passages higher than 20.

## Sample preparation

The non denaturing sub-fractionation method of the cells is based on the method of Gorski [21] and Mazzucchelli [22]. Briefly, cells from two T175 flasks 90% confluent were collected after trypsinization, centrifuged during 7 minutes (240 g), and the pellet was suspended in 1 mL of phosphate buffer saline solution (PBS, pH 7.4). Stearic acid derivative labelled by stable doxyl radical ring at the C-5 (5-DSA)(Aldrich, USA) was then added to achieve 10<sup>-4</sup> M concentration and incubated during one minute. The solution was then centrifuged 5 minutes at 400 g. 10 mL of buffer A (Hepes-KOH 10 mM, pH 7.6; KCl 10 mM; Spermine/HCl 0.15 mM; Spermidine 0.5 mM; DTT 0.5 mM) was added to the cell pellet. After 10 minutes incubation in ice, the cell suspension was centrifuged at 800 g during 5 minutes and cells were recovered. One volume equivalent to the fresh weight of buffer A was then added and the solution was homogenized with 10 strokes with a motorized potter Elvehjem homogenizer (Teflon/glass) at 4000 rpm. The disruption of the cell membrane was controlled with an inverted phase contrast microscope (Nikon diaphot).

To restore the isotonicity of the solution, 10 % in volume of buffer B (Hepes-KOH 10 mM, pH 7.6; KCl 1 M; Spermine/HCl 0.15 mM; Spermidine 0.5 mM; DTT 0.5 mM) was added. The solution was homogenized with 10 strokes at 4000 rpm and centrifuged 10 minutes at 1100 g. The supernatant and the pellet were both recovered in two different tubes respectively tubes 1 and 2.

The tube 1 (containing the supernatant) was centrifuged during one hour at 24 x10<sup>3</sup> g in order to separate the organelles and the cytosol. The plasma and the Golgi membranes, the mitochondria, lysosomes and peroxisomes that sediment between 7.5x10<sup>3</sup> and 2x10<sup>5</sup> gxmin

[23], were gathered in the pellet. It was named as membrane fraction due to the preponderance of the plasma membrane in this fraction. The supernatant corresponds to the cytosolic fraction which contains the cytosol and the endoplasmic reticulum (rough and smooth) which mainly sediments over  $5 \times 10^5$ . Each sample was analysed by ESR and mass spectroscopy. Previously, the pellet containing the membrane fraction was suspended in 1 mL of pure ethanol and sonicated.

The tube 2 (containing the nuclei) was suspended and homogenized in buffer C (Hepes-KOH 10 mM, pH 7.6; KCl 100 mM; Spermine/HCl 0.15 mM; Spermidine 0.5 mM; DTT 0.5 mM) with 5 strokes at 800 rpm. To clean the nuclei (elimination of plasma membranes fractions) the solution was centrifuged at 1100g (under the organelles sedimentation speed) during 5 minutes and the step was repeated three times. The nuclei were then homogenized in 1 mL of ethanol, sonicated and passed through ESR and mass spectrometry. Previously, the purity of the nuclei was controlled with an inverted phase contrast microscope.

### **Measurement of cellular 5-DOXYL-stearic acid levels by Liquid chromatography (LC) tandem mass spectrometry**

Mass spectrometry (MS) detection was carried out using an Ultima triple quadrupole instrument (Waters, UK) operating under MassLynx 3.5 and configured with a Z-spray electrospray ionization source. Infusion of 5-DSA ( $10^{-5}$  M in ethanol/water 75/25 containing 0.1% ammoniac) in the MS source at 10  $\mu$ l/min allowed the optimisation of the following parameters: negative ion mode, capillary voltage (-2.6 kV), cone voltage (-48 V), source temperature (100°C), desolvation temperature (300°C), cone gas flow (nitrogen 87 L/h) and desolvation gas flow (nitrogen 488 L/h). The MS-MS fragmentation of the molecular ion was achieved with collision energy of 25 eV (collision gas: argon).

LC-MS/MS was undertaken to quantify 5-DSA in the subcellular fractions. The LC model coupled to the MS system possessed a quaternary pump, a vacuum degasser, an autosampler and a thermostated column compartment (HP 1100 series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). A C18 column (Nucleosil AB column (5  $\mu$ m, 70 x 2 mm I.D.) from Macherey–Nagel (Düren, Germany) was used and 5-DSA was diluted using a solvent gradient made of a mixture of water, acetonitrile and ammoniac.

### **Measurement of cellular 5-DOXYL-stearic acid levels by ESR**

All ESR experiments were performed at 9.5 GHz using a Bruker ESR 300E spectrometer (Bruker, Germany) equipped with a variable temperature controller accessory and operating at a center field strength of 3480 G with 100 G as sweep width, a modulation amplitude of 2.55 G and 20.2 mW microwave power. The time constant and the conversion time were respectively 40.28 and 20.48 ms and the results are the average of three different scans.

The double integral over the all ESR spectrum is correlated to the number of unpaired electrons inside the sample, and so, in our case to the 5-DSA concentration. Consequently, a curve of the calculated ESR signal double integral intensity in function of well known 5-DSA concentrations was made and used as standard curve. In practice, spectra of increasing concentrations of 5-DSA solubilized in ethanol mixture ( $0-10^{-4}$  M) were done. A linear increase was found (data not shown) in accordance with literature for 5-DSA smaller than  $10^{-4}$  M [24-26]. This curve allows us to quantify the label concentration in the different subcellular fractions.

The addition of the calculated probe concentrations founded inside the three subcellular fractions was equal to  $8.2 \pm 1.9 \cdot 10^{-5}$  M, meaning that there was no significant loss of probe during the subcellular protocol used above.

### **Measurement of 5-DOXYL-stearic acid in cells by ESR**

As described previously, cells from two T175 flasks 90% confluent ( $15 \times 10^6$ ) were collected after trypsinization, centrifuged during 7 minutes (240 g), and the pellet was suspended in 1 mL of phosphate PBS. 5-DSA was then added to achieve  $10^{-4}$  M concentration and incubated during one minute. The solution was transferred into the quartz cell (500  $\mu$ l) for ESR measurements. The spectra were obtained in the same condition as described previously except for the time constant and the conversion time which were respectively equal to 2.56 and 163.84 ms.



## Fluorescence microscopy experiments

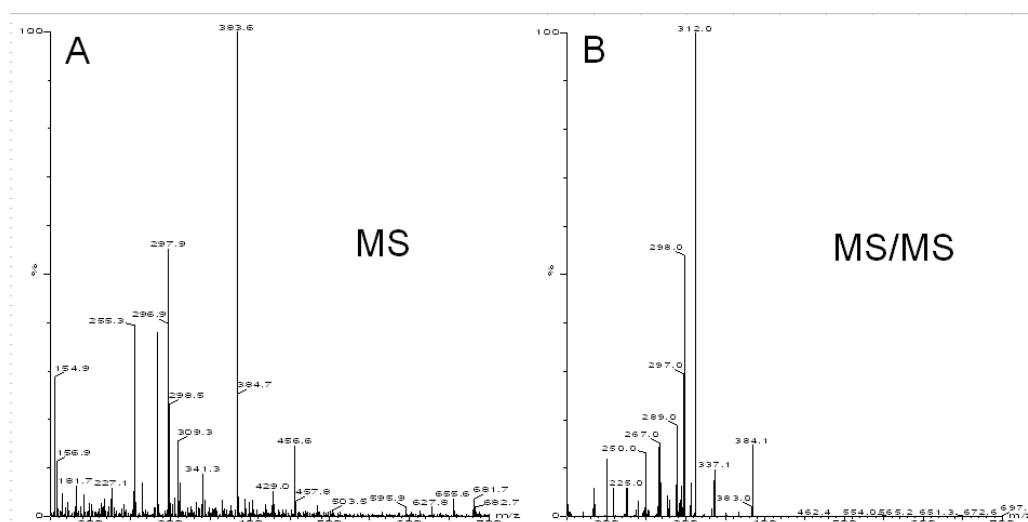
For fluorescence microscopy experiments, cells from six T175 flasks 90% confluent were collected in medium after trypsinization and divided in three parts. Each part was labelled with one specific fluorescent probe as described in the manufacturer instructions. Fluorescent probes were Mitotracker Green Mitochondrion-Selective Probes, ER-Tracker Blue-White DPX or Hoechst (Molecular Probe, Belgium).

The three successive controls, corresponding of each labelling on the entire cell, were replaced on the microscope. Fluorescence images were then acquired with a commercial CLSM device (Leica TCS SP5 AOBS, Mannheim, Germany) equipped with a Leica oil immersion objective (63X/1.4 NA), and producing images in direct slow scanning mode (400Hz). Fluorescent images of the different probes specifically localized were obtained under excitation with the 364-nm (Hoechst and ER-tracker) or 488 nm (Mitotracker Green) line of argon laser (the average laser power was less than 3 $\mu$ W at the sample). Once the subcellular localization of the fluorescent probes was confirmed by visual inspection, cells were subfractionated as described in the sample preparation. Each subcellular fraction was then replaced on the microscope and the acquisition of the images was done in the same condition as described before. The commercial Leica image-analysis (LAS AF, Leica, Germany) and ImageJ software were then used to analyse the images which were false colored coded for display. Experiments were triplicated under minimal ambient light, leading to the quantitative fluorescence calculation of at least 40 separate fragments imaging. These were then averaged.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Mass spectrometric measurements

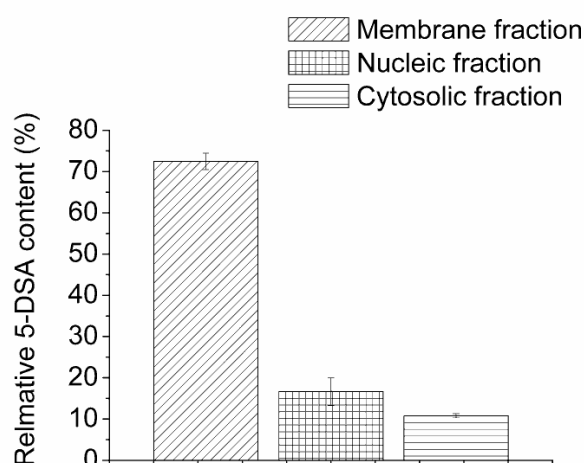
The MS analysis of 5-DSA was first investigated by direct introduction of these reference compounds ( $10^{-5}$  M) dissolved in an ethanol/water/ammoniac (75/25/0.1 v/v/v) mixture using the electrospray interface in the negative mode of ionization. Parameters such as the capillary and cone voltages, as well as the cone and the desolvation gas flows were optimized in order to generate the highest deprotonated molecular ion under a stable spray (cf. Material and Method). Two main peaks were observed corresponding respectively to the  $[M - H]^-$  ( $m/z= 383.5$ ) and  $[M - CH_2-CH_2-CH_2-COOH]^-$  ( $m/z= 297.8$ ) ionic species (cf. Figure 1A).



**Fig. 1: (A) MS spectra of 5-DSA. (B) MS-MS spectra of 5-DSA**

Elsewhere, the collision - induced dissociations (CID) of 5-DSA, mainly generate the characteristic product ions of  $m/z$  312 using a collision energy of 25 eV (cf. Figure 1B). As the multiple reaction monitoring (MRM) mode is based on the transition involving the specific molecular ion and a characteristic fragment ion, high detection selectivity as well as high signal-to-noise ratios could be obtained.

Figure 2 represents 5-DSA proportion found by LC-MS-MS in the 3 sub-cellular fractions (namely membrane, nuclei and cytosol fraction). Most of the probe was detected in the membrane fraction. But it is worth noting that 5-DSA was also found in the nuclei and cytosolic fractions (22 and 15% respectively), compared to what was detected in membrane fraction).

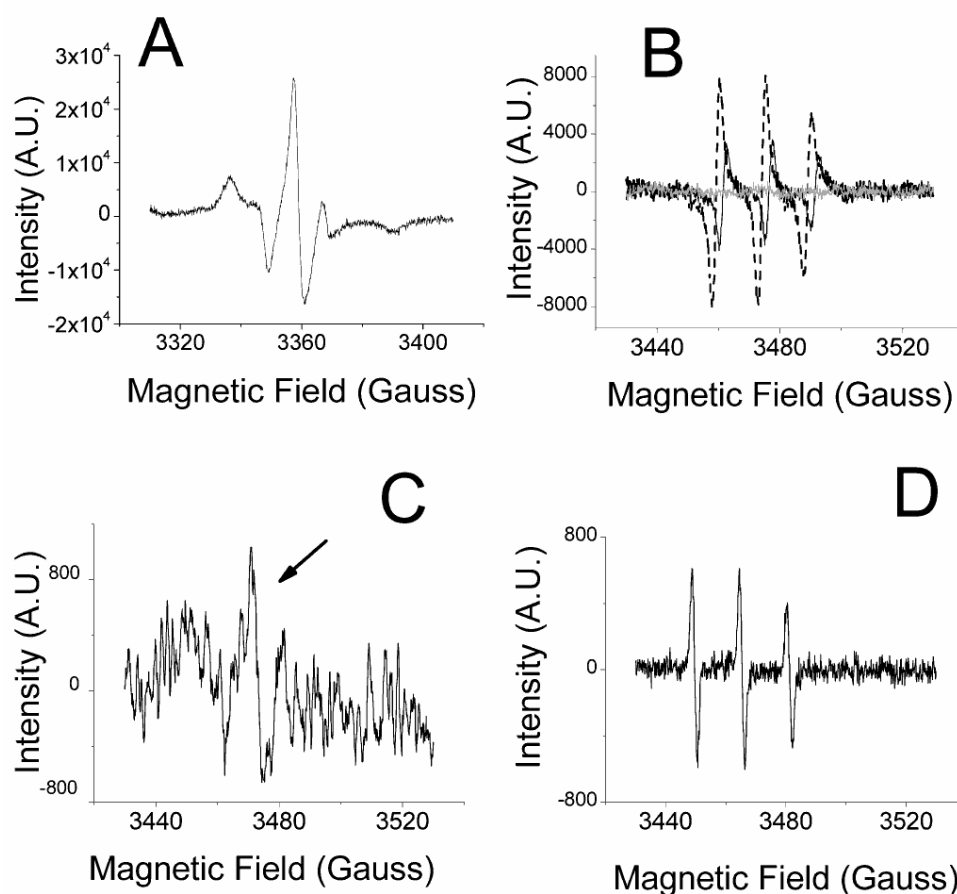


**Fig. 2: 5-DSA proportion in the 3 sub-cellular fractions, namely membrane, nuclei and cytosol**

## Electron spin resonance measurements

Figure 3A shows the typical ESR spectrum of 5-DSA incorporated in cell membranes after 1 minute of 5-DSA incubation in a phosphate buffer saline solution. This spectrum is characteristic of a probe which invested the hydrophilic cell membrane at 25°C [16].

Figure 3 B points up the typical ESR spectra of 5-DSA in the different sub-cellular fractions. The presence of probes inside the membrane and the kern fractions is clearly highlighted. However, the ESR spectra are no more corresponding to the strong anisotropic rotation observed previously but result to an isotropic probe movement. This behaviour arises because the membrane and kern fraction were treated with pure ethanol with a consequent sonication destroying all membranes in the sample (see material and method 2.2).



**Fig. 3:** (A) Typical ESR spectra of 5-DSA in the membrane fraction (dotted line), in the cytosolic fraction (gray line) and in the nuclei (black line). (B) Same 5-DSA ESR spectrum in the cytosolic fraction as displayed in A (C) ESR spectrum of 5-DSA ( $10^{-5}$  M) dissolved in PBS.

The spectra intensities of Figure 3B indicate that the probe is more positioned in the membrane fraction than in the nuclei fraction. A quantitative analysis reveals that on average there are 3.5 ( $\pm 0.5$ ) times more probes which were found in the membrane than in the nuclei fraction. Indeed a concentration of  $5.9 \pm 0.5 \cdot 10^{-5}$  M and  $1.7 \pm 1.0 \cdot 10^{-5}$  M were calculated respectively in the membrane fraction and in the nuclear fraction. These data are consistent with those obtained by mass spectrometry which ascertains a significant percentage of spin labels in the kern fraction.

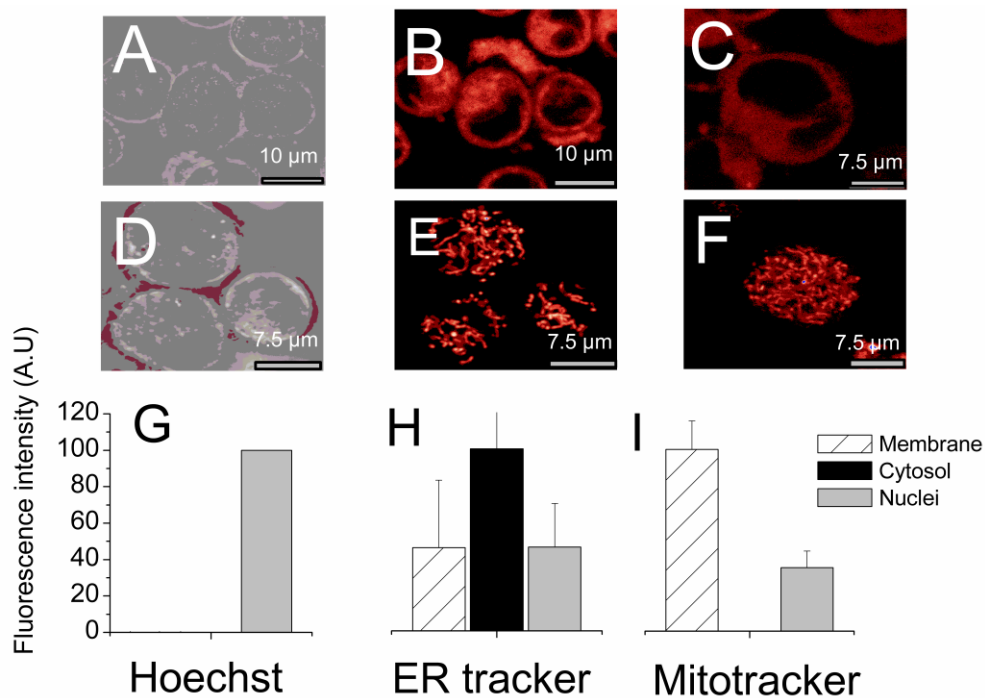
By contrast, the ESR spectrum of the cytosolic fraction (Figure 3B gray line and Figure 3C) doesn't present the three peaks characteristic of free 5-DSA in solution (Figure 3D) suggesting that no probe is entrapped in the cytosolic fraction. But the mass spectrometry data clearly indicates the opposite. However, Figure 3C points up a large distorted peak. It may result in a broad anisotropic signal corresponding to slow rotation of 5-DSA. This is probably due to the incorporation of the probe in the endoplasmic reticulum (ER) and in the vesicles of the cytosol. Indeed this subcellular fraction is the only one which has not been sonicated and doesn't contained ethanol. Consequently 5-DSA is not well solubilized and it explains the very low signal/ noise ratio observed on the figure. Such interpretation, corroborated the mass spectrometry data and supported the presence of 5-DSA in the cytosolic fraction.

Essential in the internal membrane organization of eukaryotic cells, the ER is in continuity with the outer layer of the nuclear envelope and in relationship with other compartments, including vesicles and the Golgi apparatus [27]. ER could be seen as the vehicle carrying the probes of the plasma membrane to the nucleus, explaining at the same time the significant presence of the probe both in the cytosolic fraction and in the nuclei suspension [28]. But it is important to notice that this phenomenon takes time and is highly unlikely in the case of our experiments. Another hypothesis explaining the presence of the probe in the whole sub-cellular fraction could be the 5-DSA diffusion through the plasma membrane during the extraction.

**Fluorescence imaging**

Previously to the fluorescence analysis of the three sub-cellular fractions, we have controlled the sub-cellular localization of the mitochondria, ER and nucleus fluorescent probes. Analysis of the images clearly indicates a good and stable localization of the different probes (Figure 4). They didn't appear to migrate in other organelles during time (more than 6 hours), especially the ER probe. This confirms that in our time conditions of experiments, ER cannot be considered as a probe vector between the plasma membrane and the nucleus.

Cells were then sub-fractionated (as described in the material and methods) and fluorescent signatures of mitochondria, ER and nucleus probes were purchased in each sub-cellular fraction (nuclei, membrane and cytosolic fractions respectively). Results of the fluorescent statistical analysis are represented on figure 4G, 4H and 4I. As expected, Hoechst fluorescence was only detected in the nucleus fraction (Figure 4G). The ER- tracker was widely located in the cytosolic fraction, but a significant percentage of the tracker was also found in the other sub-cellular fractions (figure 4H).



**Fig. 4:** (A) and (D): transmission images of HCT 116 cells. Confocal fluorescence images of ER-tracker (B) and Green Mitotracker (E) in HCT-116 cells before sub-fractionation. ER tracker (C) and Green Mitotracker (F) after 6 hours of incubation in HCT-116 cells. Mean fluorescence intensities in different sub-cellular fraction; Hoechst (G), ER-tracker (H), Green Mitotracker (I).

This could be the result of a non specificity of the probe localization. However the fluorescence contrast between the cytosolic fraction and the other two fractions is too high (higher than two) indicating that this non specific probe localization most probably outcome from the subfractionation protocol. Similar results were obtained with the Green Mitotracker, which was found in the membrane fraction, but once again a significant part of the fluorescent probe was also found in the nucleus suspension. More precisely, there are three times more Mitotracker in the membrane fraction than in the nuclei suspension (Figure 4I).

These results once again strongly suggest that the presence of ER-tracker and green Mitotracker probes in the nuclear compartment is in majority due to the sub-fractionation protocol. To support this hypothesis, the ratio of the probes in each sub-cellular fraction is similar to the one found for 5-DSA using ESR and mass spectrometry techniques.

## CONCLUSION

HCT-116 cells were put in contact with a typical ESR spin probe and were then subfractionated in order to know if the probe was able to diffuse inside the cells and could be located in other sub-cellular membranes than the plasma one. ESR and MS techniques demonstrate that the 5-DSA probe lies in majority in the membrane fraction but that was also entrapped in the cytosolic and in the nuclei fractions. However, ESR spectroscopy was significantly sensitive only to probe localized in the membrane and nuclei fraction. The purity of the subcellular fraction was investigated by fluorescence microscopy and data put in evidence that the nuclei probe localization was only due to the subfractionated method. These results are consistent with the fact that ESR is sensitive only to probe located in the membrane fraction which is in majority composed of the plasma membrane. Consequently the ESR spectra can be interpreted only from the different lateral phase separations of the plasma membrane.

## ACKNOWLEDGEMENT

A special thanks to Dr Mazzucchelli, from the Laboratory of Mass Spectrometry (GIGA-R and CART, University of Liège, Belgium), for his advices in term of expert knowledge in the field of cell sub-fractionation. We also thank Dr DePauw-Gillet, from the Laboratory of Histology-Cytology (university of Liège, Belgium), for her help and advices in the fulfilment of the cell extraction. The author thanks Dr Mouithys-Mickalad for his scientific advices. A special thanks to Mr Cobraiville for his help in the achievement of the extractions. M.C. benefited from a FRIA (FNRS) PhD fellowship. M.F. is Research Associate at F.R.S.-FNRS (National Fund for Scientific Research). We thank the FNRS for its financial support.

## REFERENCES

- [1] L. Weglarz, A. Koceva – Chyla, K. Gwodzdziński, Z. Dzierzewicz, Z. Jozwiak, *Biochim.* 85, 549-556 (2003)
- [2] S.J. Singer and G.L. Nicholson, *Sciences* 175, 720-731 (1972)
- [3] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* 387, 569-572 (1997)
- [4] L.D. Zajchowski, S.M. Robbins, *Eur. J. Biochem* 269, 737-752 (2002)
- [5] W.K. Subczynski, A. Kusumi, *Biochem. Biophys. A*1610, 231-243 (2003)
- [6] M.G. Rivas, A.M. Gennarolo, *Chem. Phys. Lipids* 122, 165-169 (2003)
- [7] K. Kawasaki, W.K. Subczynski, J.S. Hyde, A. Kusumi, *Biophys. J.* 80, 738-748 (2001)
- [8] L.J. Pike, *J. Lipid Res.* 47, 1597-1598 (2006)
- [9] M. L. Berkowitz, *Biochi. Biophys. A*1788, 86-96 (2009)
- [10] Murase K, Fujiwara T, Umemura Y, Suzuki K, Iino R, Yamashita H, Saito M, Murakoshi H, Ritchie K, Kusumi A., *Biophys. J.* 86, 4075-4093 (2004)
- [11] M.J. Saxton, K. Jacobson, *Annu. Rev. Biomol. Struct.* 26, 373-399 (1997)
- [12] J.P. Slotte, *Biochim. Biophys. A*1235, 419-27 (1995)
- [13] G.H. Rothblat, F.H. Mahlberg, W.J. Johnson, M.C. Phillips, *J. Lipid. Res.* 33, 1091-1097 (1992)
- [14] K. Kawasaki, J.J. Yin, W.K. Subczynski, J.S. Hyde, A. Kusumi, *Biophys. J.* 80, 738-48 (2001).
- [15] Z. Arsov, M. Nemeč, M. Schara, H. Johansson, U. Langel, M. Zorko, *J. Pept. Sci.* 14, 1303-8 (2008)

- [16] A. Grammenos, A. Mouithys-Mickalad, P-H Guelluy, M. Lismont, G. Piel, M. Hoebeke, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, 350-354 (2010)
- [17] P.F. Knowles, D. Marsh, H.W.E. Rattle, *Magnetic Resonance of Biomolecules*, (Wiley-Interscience, New York, London, 1976)
- [18] J. Strancar, T. Koklic, Z. Arsov, B. Filipic, D. Stopar, M.A. Hemminga, *J. Chem. Inf. Model.* 45, 394-406 (2005)
- [19] A. Grammenos, M.A. Bahri, P.H. Guelluy, G. Piel, M. Hoebeke, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 5-9 (2009)
- [20] M.A. Bahri, A. Seret, P. Hans, J. Piette, G. Deby-Dupont, M. Hoebeke, *Biophys. Chem.* 129, 82-91 (2007)
- [21] K. Gorski, M. Carneiro, U. Schibler, *Cell.* 47, 767-776 (1986)
- [22] G.D. Mazzucchelli, V. Gabelica, N. Smargiasso, M. Fléron, W. Ashimwe, F. Rosu, De M.C. Pauw-Gillet, J.F. Riou, E. De Pauw, *Proteome Sci.* 6, 12 (2008)
- [23] D. Voet and J. Voet, *BIOCHIMIE*, 2nd edn., (De Boeck Université s. a., Paris, Bruxelles, 1998)
- [24] R. Gareth, S. Eaton, S. Eaton, D. Barr, and R. Weber, *Quantitative EPR.*, (Springerwien, New York, 2009)
- [25] D. Mihelcic and P. Mlisgen, *J. Atmos. Chem.* 3, 341-361 (1985)
- [26] T. Risse, T. Hill, J. Schmidt, G. Abend, H. Hamann, and H.-J. Freund, *J. Phys. Chem. B* 102, 2668-2676 (1998)
- [27] T. Levine, *Trends in Cell Biol.* 14(9), 483-490 (2004)
- [28] T. Levine and C. Loewen, *Current Opinion in Cell Biol.* 18, 371-378 (2006)



# CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

---



Les  $\beta$ -cyclodextrines sont des molécules connues pour leur capacité à extraire le cholestérol des membranes biologiques (1, 2). Ces dernières années, des travaux ont montré la sensibilité particulière des microdomaines de type « lipid raft » (radeaux lipidiques) vis à vis des  $\beta$ -cyclodextrines méthylées. Cependant, lorsque nous avons commencé ce travail, le mécanisme d'action de ces dernières au niveau des membranes biologiques restait incompris et ce, malgré de nombreuses études utilisant des techniques variées (2-9). La plupart des mesures s'axaient uniquement sur l'extraction du cholestérol et n'abordaient pas la question de l'extraction concurrentielle de phospholipides. De plus, aucune technique utilisée ne permettait de quantifier de manière non invasive l'effet des cyclodextrines sur les membranes. L'originalité de notre travail réside dans l'utilisation conjointe de la résonance paramagnétique électronique (RPE) et de la diffusion de neutrons aux petits angles (SANS), ce qui permet une quantification non invasive de l'effet des cyclodextrines au sein de membranes biologiques. Ce travail s'est penché plus particulièrement sur les mécanismes d'action de la Rameb, tout d'abord au sein de modèle membranaire reproductible : les liposomes, et ensuite, *in vitro*, sur des cellules cancéreuses du colon (HCT116).

La RPE associée à la méthode de marquage de spin permet une quantification de la microviscosité membranaire (10) à différentes profondeurs dans la bicouche membranaire. L'utilisation de sondes de type 5-DSA fournit des renseignements sur la partie hydrophile de la membrane puisque le radical nitroxy se loge près des têtes polaires des phospholipides membranaires. Par contre, le 16-DSA est connu pour explorer la partie hydrophobe de la bicouche (11). Cependant, au sein des bicouches de vésicules de DMPC, la simulation de spectres EPR expérimentaux (12) a montré un repliement des sondes 16-DSA, rendant l'analyse spectrale plus complexe. C'est donc le 5-DSA qui a été utilisé pour déterminer la microviscosité de membranes biologiques soumises à différentes concentrations de Rameb.

Pour comprendre le mode d'action de la cyclodextrine au sein des membranes biologiques, son effet a tout d'abord été étudié sur un modèle membranaire simple : des liposomes constitués uniquement de molécules de DMPC. Aucun changement significatif de microviscosité n'apparaît lorsque ces liposomes sont incubés avec de la Rameb (0 à 50 mM) durant une heure à 37°C. Cependant, une extraction des sondes n-DSA a lieu lorsque ces vésicules (initialement marquées) sont exposées à de la Rameb (0-50 mM) à 37°C, et l'ampleur de cette extraction dépend de la concentration de Rameb. L'analyse des spectres

## CONCLUSIONS GENERALES & PERSPECTIVES

---

EPR montre que le n-DSA extrait n'est pas sous forme libre mais constitue des agrégats micellaires avec la Rameb. Si l'hypothèse de sphéricité des agrégats mixtes est posée, l'analyse spectrale montre que leur taille augmente avec la concentration de cyclodextrine. Ces résultats laissent présupposer que la Rameb a des affinités pour les phospholipides mais qu'elle n'a pas d'influence significative sur la microviscosité membranaire. Si aucune modification de la microviscosité n'est observée, cela ne signifie pas pour autant que la Rameb ne change pas d'autres paramètres structuraux des liposomes (i.e. rayon, polydispersité,...). Une modélisation des sections efficaces expérimentales de diffusion neutronique a donc été mise au point. Celle-ci a permis de quantifier l'évolution de tous les paramètres structuraux de liposomes soumis à différentes concentrations de Rameb. Une étude en diffusion quasi-élastique de lumière fut également menée et a corroboré les résultats obtenus en SANS.

Les simulations des données SANS ont montré une extraction de molécules de phospholipides, fonction de la concentration en cyclodextrine, lors de leur incubation avec de la Rameb (0-30 mM). Cette extraction est significative dès qu'une concentration de 10 mM de Rameb est atteinte. Des mesures de tension de surface montrent que la Rameb s'agrège faiblement à partir de 12 mM. Comme l'extraction phospholipidique n'apparaît, elle aussi, de manière sensible qu'à partir de 10 mM, ce résultat indique que la formation d'agrégats est probablement corrélée à la solubilisation de la membrane. Cependant, un comportement différent a été observé selon que les liposomes étaient incubés avec la Rameb en dessous ou au-dessus de la température de transition de la membrane : à 34°C, la distribution de taille des liposomes reste inchangée alors qu'à 14°C, elle augmente. Ces observations ont été corrélées à l'énergie de Helfrich (énergie élastique de la membrane) et interprétées comme suit : (i) A 14°C, la Rameb induit une destruction préférentielle de liposomes de petite taille entraînant une réorganisation de la bicouche avec une formation de plus grandes vésicules ; (ii) à 34°C, la cyclodextrine affecte de manière similaire toutes les vésicules ce qui a comme conséquence de ne pas changer la distribution de taille des liposomes.

Les simulations des données SANS ont également montré une diminution de l'épaisseur membranaire suite à l'addition de Rameb. Cet effet a été corrélé à une extraction phospholipidique. En effet, des molécules de phospholipides sont extraites par la Rameb, ce qui entraîne une destruction d'une partie de la population liposomale. Dans les liposomes « survivants », l'espace rendu disponible par les chaînes extraites permet aux chaînes

## CONCLUSIONS GENERALES & PERSPECTIVES

hydrocarbonnées de phospholipides restantes d'adopter des conformations locales gauches entraînant une diminution de l'épaisseur membranaire. Cette diminution d'épaisseur membranaire, sous l'action de la Rameb, est plus faible au-dessus qu'en dessous de la température de transition de la membrane, expliquant ainsi qu'aucune modification significative de microviscosité n'ait été observée en EPR.

Notons également, que tout comme en EPR, l'importance de la température de transition de phase de la membrane DMPC a été mise en avant ; à 14°C, les molécules de DMPC sont dans une phase rigide structurée alors qu'à 34°C, la membrane est dans un état fluide entraînant une diminution de la microviscosité membranaire ainsi que de l'épaisseur membranaire.

Les simulations en SANS ont également révélé que la Rameb était d'autant plus adsorbée sur la membrane liposomale que la concentration en cyclodextrine augmente. Lorsque la concentration de Rameb atteint 30 mM, la moitié de la surface liposomale est recouverte par la cyclodextrine. Ce phénomène d'adsorption avait déjà été observé sur une monocouche phospholipidique (13).

En résumé, l'affinité de la Rameb pour les molécules de DMPC a été démontrée et quantifiée de manière non invasive. La Rameb extrait d'autant plus les molécules de DMPC que sa concentration est élevée, pour former des agrégats mixtes dans la solution. Suite à l'extraction, une réorganisation lipidique a lieu et celle-ci dépend de la température. De plus, l'adsorption de la Rameb sur la surface liposomale a été mise en évidence ainsi que sa dépendance vis-à-vis de la concentration.

Après avoir étudié l'effet de la Rameb sur des liposomes de DMPC, ce travail s'est intéressé à l'effet de la cyclodextrine sur un modèle membranaire plus sophistiqué : des liposomes dopés en cholestérol. Afin d'élaborer le modèle le plus adéquat, l'influence du cholestérol sur la microviscosité membranaire a d'abord été étudiée par EPR.

Le cholestérol, à température ambiante (25°C), accroît la microviscosité membranaire au niveau de la partie hydrophile et la diminue dans la partie hydrophobe : le taux de cholestérol condense le haut de la membrane où les anneaux stéroïdes de la molécule se trouvent, et laisse plus de liberté dans la partie hydrophobe à cause de la chaîne carbonée

## CONCLUSIONS GENERALES & PERSPECTIVES

---

phospholipidique qui elle, est très souple (14). L'effet est fonction de la concentration en cholestérol. La microviscosité des membranes liposomales dopées à 30% de cholestérol reste inchangée quelle que soit la température. Ces résultats confirment donc que lorsqu'une concentration de 30% de cholestérol est atteinte, la membrane se trouve dans une phase  $L_0$  (soit liquide ordonné) tout comme dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique. Les domaines de type « raft » font l'objet de nombreuses études notamment via une déplétion de cholestérol induite par des cyclodextrines (15-17). En conséquence, les liposomes dopés à 30% de cholestérol semblent un excellent modèle pour l'étude des effets de la Rameb sur les radeaux lipidiques.

L'incubation des liposomes (dopés à 30% en cholestérol) avec des concentrations croissantes de Rameb induit une diminution, qui est fonction de la concentration, de la microviscosité membranaire. Cette variation peut être directement reliée au pourcentage de cholestérol dans la bicouche puisque la Rameb n'induit aucune modification de microviscosité au sein de liposomes non dopés. Une quantification du cholestérol extrait par la Rameb a été établie grâce à la courbe standard reliant l'augmentation de microviscosité au pourcentage de cholestérol inclus dans la bicouche. Les résultats ont montré que l'extraction de cholestérol n'est effective qu'à partir de 10 mM de Rameb.

Les simulations SANS montrent quant à elles une extraction progressive de cholestérol dès que les liposomes sont mis en contact avec la cyclodextrine. En effet, le rayon moyen des liposomes dopés en cholestérol et soumis à la Rameb (0-30 mM) diminue linéairement en fonction de la concentration en Rameb, jusqu'à atteindre la valeur du rayon moyen de liposomes de DMPC purs (sans cholestérol). Une réduction linéaire du nombre d'agrégation est également déterminée suite à une incubation de concentrations croissantes de Rameb : lorsque la concentration de 30 mM de Rameb est atteinte, le nombre d'agrégation (total : DMPC et cholestérol) est réduit de 30%. Les liposomes étant initialement dopés avec 30 % de cholestérol, ce résultat confirme une extraction linéaire lipidique liée uniquement à l'extraction de molécules de cholestérol et non de DMPC.

Tout comme pour les liposomes non dopés, les simulations des données SANS ont montré une adsorption de la Rameb sur la surface liposomale. Cette dernière est cependant plus importante lorsque les liposomes sont dopés que lorsqu'ils ne le sont pas. De même, la diminution de la fraction de molécules de DMPC incluses dans les liposomes unilamellaires

## CONCLUSIONS GENERALES & PERSPECTIVES

est plus importante lorsque les liposomes sont dopés. Ces deux résultats confirment donc une plus grande affinité de la Rameb pour la molécule de cholestérol que pour le DMPC. Les simulations neutroniques montrent également que les liposomes soumis à la Rameb voient leur polydispersité diminuer. En conséquence, la Rameb extrait le cholestérol des liposomes pour laisser au final une population liposomale plus monodisperse et exempte de cholestérol.

Une diminution, dépendant de la concentration en Rameb, de l'épaisseur de la membrane à 37°C a été observée. Les résultats obtenus en SANS corroborent donc ceux d'EPR : à 37°C, suite à l'extraction de cholestérol, la membrane quitte la phase ordonnée liquide pour une phase liquide désordonnée dont l'épaisseur est plus faible et la microviscosité moindre. Les deux techniques montrent que la bicouche est significativement modifiée lorsque la concentration de 10 mM de Rameb est atteinte.

Après avoir quantifié à la fois l'extraction dose-dépendante du cholestérol au sein des membranes liposomales, ainsi que l'évolution de la microviscosité membranaire et des paramètres structuraux des liposomes, nous avons montré que le cholestérol extrait n'était pas libre en solution mais sous forme d'agrégats. En effet, des liposomes dopés en cholestérol ont été marqués par des sondes cholestane dont la structure chimique est similaire au cholestérol. L'analyse des spectres EPR du cholestane a montré que les sondes étaient extraites de la membrane sous l'action de la Rameb. L'ampleur de cette extraction, tout comme pour les sondes n-DSA, dépend de la concentration et les sondes extraites ne sont pas libres en solution mais sous forme d'agrégats mixtes (Rameb/sondes). Comme la sonde cholestane et la molécule de cholestérol ont une architecture moléculaire semblable, les résultats obtenus avec le cholestane peuvent être extrapolés au cholestérol.

Les accumulations de données SANS étant beaucoup trop longues pour garder en vie les cellules, les expériences menées sur les HCT116 n'ont été faites qu'à l'aide de la technique d'EPR. Au vu des résultats obtenus avec les membranes liposomales, les membranes cellulaires ont été uniquement marquées à l'aide des sondes 5-DSA pour s'affranchir d'un possible repliement de sonde.

Comme nous l'avons plusieurs fois répété, la technique d'EPR, associée au marquage de spin, permet d'accéder à la microviscosité membranaire cellulaire. Cependant la cellule est composée de plusieurs organites, chacun étant entouré d'une membrane de composition

## CONCLUSIONS GENERALES & PERSPECTIVES

---

spécifique (18). Il est communément accepté que les sondes 5-DSA se logent uniquement au sein des membranes plasmiques. Mais aucune étude n'a confirmé cette hypothèse. Ce travail a dès lors utilisé conjointement les techniques de spectrométrie de masse, de microscopie de fluorescence et d'EPR afin de vérifier cette hypothèse. Les techniques d'EPR et de spectrométrie de masse ont démontré que le 5-DSA réside majoritairement dans la membrane plasmique, mais est également piégé dans le réticulum endoplasmique et le noyau. Toutefois, la spectroscopie d'EPR n'est pas sensible aux sondes logées dans le réticulum endoplasmique. La microscopie de fluorescence a permis de démontrer que la localisation du 5-DSA dans la membrane nucléaire et le réticulum endoplasmique n'était liée qu'au protocole de fractionnement. Ces résultats établissent donc que, dans nos conditions expérimentales, l'EPR détecte spécifiquement les sondes logées dans la membrane plasmique. En conséquence, la microviscosité membranaire calculée en EPR correspondra à la microviscosité de la membrane plasmique des cellules.

L'incubation des cellules avec des concentrations croissantes de Rameb induit une diminution de la microviscosité. De même, l'augmentation du temps d'incubation des cellules avec la Rameb mène à une diminution de la microviscosité membranaire. Un dosage en cholestérol membranaire montre que, tout comme pour les liposomes, la microviscosité de la membrane plasmique est en corrélation directe avec le pourcentage de cholestérol compris en son sein. Ces résultats confirment l'effet extracteur de cholestérol de la Rameb et corroborent l'hypothèse émise lors de notre étude sur les liposomes dopés, à savoir, l'importance du temps d'incubation de la membrane avec la Rameb.

L'analyse des spectres EPR montre également, tout comme pour les liposomes, une extraction dose dépendante des sondes n-DSA et cholestane lorsque les cellules sont incubées avec de la Rameb. De même, les marqueurs extraits ne sont pas sous forme libre, mais sous forme d'agrégats mixtes (Rameb/sondes). Cependant, une différence du spectre du cholestane dans la membrane plasmique et dans la membrane liposomale dopée en cholestérol a été observée. Le spectre du cholestane dans les membranes cellulaires est composé d'un pic unique et très déformé impliquant une interaction spin-spin favorisée par une forte concentration locale de sondes. Cet élargissement de spectre a été corrélé aux radeaux lipidiques connus pour être riches en cholestérol (19) : le cholestane s'immisce dans les radeaux lipidiques et, tout comme le cholestérol, les sondes sont proches les unes des autres.



## CONCLUSIONS GENERALES & PERSPECTIVES

Comme le cholestane est extrait des radeaux lipidiques par la Rameb, nous avons conclu au même comportement de la cyclodextrine avec la molécule de cholestérol.

En conséquence, la combinaison peu courante (voire unique) de la technique de diffusion neutrons aux petits angles et de la résonance paramagnétique électronique a permis, pour la première fois, de quantifier les divers effets d'une cyclodextrine sur des membranes liposomales et cellulaires, et ce, de façon non invasive. Les deux techniques sont complémentaires et apportent un important nombre d'informations sur les mécanismes d'action de la cyclodextrine. Nous avons montré que même si la Rameb est capable d'extraire des molécules de DMPC, cette affinité s'efface lorsque la membrane contient du cholestérol. La Rameb extrait alors le cholestérol des membranes, d'autant plus que sa concentration croît, et le matériel extrait forme des agrégats avec la cyclodextrines. Tout comme pour les liposomes non dopés, la Rameb s'adsorbe à la surface du liposome, mais cette adsorption est plus forte lorsque les liposomes contiennent du cholestérol. Ce travail a également permis une quantification, *in vitro*, du cholestérol extrait par la Rameb au sein des membranes plasmiques cellulaire. De plus, les résultats obtenus en EPR démontrent que la Rameb extrait du cholestérol des radeaux lipidiques cellulaires.

Comme notre protocole expérimental, et notre modélisation, se sont vus les plus généraux possible, toute molécule capable d'interagir avec les membranes biologiques peut être étudiée de cette manière. Dans ce travail la Rameb a été mise à l'honneur, mais n'importe quelle cyclodextrine peut être étudiée. Pour l'instant, la clathration de médicaments connus avec des métabolites végétaux est en pleine période d'expansion car elle améliore la biodisponibilité, la solubilité et active de nouvelles propriétés de médicaments (20). Notre méthode de travail innovante ouvre dès lors un vaste champ d'analyse de l'action de ces médicaments originaux (ou des métabolites seuls) au sein des membranes.

Dans cette thèse nous avons utilisé des liposomes de composition lipidique simple (DMPC et cholestérol), mais il serait également intéressant d'étendre nos connaissances en créant des modèles membranaires mimant de la meilleure manière possible les radeaux lipidiques notamment en utilisant des mélanges ternaires de phospholipides.



1. **Castagne, D., B. Evrard, B. Nusgens, and G. Piel.** 2010. *Effect of  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives on caveolae disruption, relationships with their cholesterol extraction capacities* J Incl Phenom Macrocyclic Chem 67:369-376.
2. **Castagne, D., M. Fillet, L. Delattre, B. Evrard, B. Nusgens, and G. Piel.** 2008. *Study of the cholesterol extraction capacity of  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models* J Incl Phenom Macrocycl Chem 63.
3. **14th International cyclodextrin symposium,** Kyoto (Japan). May 8-11, 2008
4. **15th International cyclodextrin symposium,** Vienna (Austria). May 9-12, 2010
5. **Piel, G., M. Piette, V. Barillaro, D. Castagne, B. Evrard, and L. Delattre.** 2007. *Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes.* Int J Pharm 338:35-42.
6. **Puskas, I., and F. Csempez.** 2007. *Influence of cyclodextrins on the physical stability of DPPC-liposomes.* Colloids Surf B Biointerfaces 58:218-224.
7. **Piel, G., M. Piette, V. Barillaro, D. Castagne, B. Evrard, and L. Delattre.** 2006. *Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: the effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics.* Int J Pharm 312:75-82.
8. **Hatzi, P., S. Mourtas, P. G. Klepetsanis, and S. G. Antimisiaris.** 2007. *Study of the interaction between cyclodextrins and liposome membranes: effect on the permeability of liposomes.* Int J Pharm 225:15-30.
9. **Puskás, I., L. Barcza, L. Szente, and F. Csempez.** 2006. *Features of the Interaction between Cyclodextrins and Colloidal Liposomes.* J Incl Phenom Macro 54:89-93.
10. **Bahri, M. A., B. J. Heyne, P. Hans, A. E. Seret, A. A. Mouithys-Mickalad, and M. D. Hoebeke.** 2005. *Quantification of lipid bilayer effective microviscosity and fluidity effect induced by propofol.* Biophys Chem 114:53-61.
11. **Coderch, L., J. Fonollosa, M. De Pera, J. Estelrich, A. De La Maza, and J. L. Parra.** 2000. *Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption.* J Control Release 68:85-95.
12. **Arsov, Z., M. Schara, and J. Strancar.** 2002. *Quantifying the Lateral Lipid Domain Properties in Erythrocyte Ghost Membranes Using EPR-Spectra Decomposition.* J Magn Reson 157:52-60.
13. **Mascetti, J., S. Castano, D. Cavagnat, and B. Desbat.** 2008. *Organization of  $\beta$ -Cyclodextrin under Pure Cholesterol, DMPC, or DMPG and Mixed Cholesterol/Phospholipid Monolayers.* Langmuir 24:9616-9622.

## REFERENCES

---

14. **Costanzo, R., T. De Paoli, J. E. Ihlo, A. A. Hager, H. A. Farach, C. P. Poole Jr, and J. M. Knight.** 1994. *ESR study of order and dynamics in lecithin liposomes with high cholesterol content.* Spectrochim Acta A 50:203-208.
15. **Zidovetzki, R. and I. Levitan,** 2007. *Use of cyclodextrins to manipulate membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies.* Biochim Biophys Acta 1768:1311-1324.
16. **Giocondi, M-C., E. Pierre, P. Dosset, C. Le Grimellec,** 2004. *Use of cyclodextrin for AFM Monitoring of Model Raft formation.* Biophys J 86:861-869.
17. **Masserini, M., M. Pitto, F. Raimondo, E. Cazzaniga,** 2005. *Methyl- $\beta$ -cyclodextrin treatment affects the thermotropic behaviour of membranes and detergent-resistant membrane fractions of cultured A431 Cells.* Biol Pharm Bull 28:2185-2188.
18. **Lodish, M. L. Berkowitz, Matzudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, and Darnell.** 2005. *Biologie moléculaire de la cellule.* de Boek, Bruxelles.
19. **Simons, K., and E. Ikonen.** 1997. *Functional rafts in cell membranes.* Nature 387:569-572.
20. **Tolstikova, T., M. Khvostov, and A. Bryzgalov.** 2011. *The improvement of toxicopharmacological properties of drugs by clathration with plant metabolites.* Curr med chem 18:82.

The  $\beta$ -cyclodextrin is a molecule known for its ability to extract cholesterol from biological membranes (1, 2). In recent years, studies have shown the particular sensitivity of raft microdomains types to methylated  $\beta$ -cyclodextrin. However, when we started this work, its mechanism of action in biological membranes was not yet understood despite numerous studies using various techniques (2-9). Most measures focused only on the extraction of cholesterol and did not address the possible competitive phospholipidic removal. In addition, no technique used up to now, allowed to quantify non-invasively the effect of cyclodextrins on membranes. The originality of our work lies in the joint use of electron spin resonance (ESR) and small angle neutron scattering (SANS) techniques which permits a noninvasive quantification of the cyclodextrins effect on biological membranes. This work has looked specifically into the Rameb mechanisms of action, first in reproducible model membranes like liposomes, and then, *in vitro*, on colon carcinoma cells (HCT116).

The ESR, associated with spin labeling method, allows quantification of membrane microviscosity (10) at different depths in the membrane bilayer. The use of spin probes like 5-DSA provides information on the hydrophilic part of the membrane since the nitroxide radical is localized near the polar head group of the membrane phospholipids. On the contrary, the 16-DSA is known for exploring the hydrophobic part of the bilayer (11). However, in the DMPC bilayer of the vesicles, the simulation of experimental ESR spectra (12) reveals a tilt of the 16-DSA probes making spectral analysis more complex. Consequently, the 5-DSA has been used to determine the microviscosity of biological membranes subjected to different concentrations of Rameb.

To understand the mechanism of action of Rameb in biological membranes, its effect has first been studied in a simple membrane model: liposomes consisting only of DMPC molecules. No significant change in microviscosity appears when these liposomes are incubated with Rameb (0 to 50 mM) for one hour at 37 ° C. However, a dose-dependent extraction of n-DSA probes occurs when these vesicles (initially marked) are exposed to the cyclodextrin (0-50 mM) at 37 ° C. Analysis of the ESR spectra shows that the extracted n-DSA is not free in solution but form micellar aggregates with Rameb. If the assumption of

## GENERAL CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

---

sphericity is made for the mixed aggregates, the spectral analysis shows that their size increases with the concentration of cyclodextrin. These results suggest that the Rameb has an affinity for the phospholipids but has no significant influence on the membrane microviscosity. If no change in the microviscosity is observed, this does not mean that Rameb does not modify other structural parameters of the liposome (ie radius, polydispersity,..). Consequently, the experimental neutron scattering cross-sections has been modelled to assess the detailed structure of the vesicles. This allows us to quantify the evolution of all liposomal structural parameters submitted to different amounts of Rameb. A study of dynamic light scattering has also been performed and corroborates the results obtained by the SANS technique.

The modelled SANS data shows a dose-dependent extraction of phospholipids during their incubation with Rameb (0-30 mM). This extraction is significant when a concentration of 10 mM of Rameb is reached. Surface tension measurements display that Rameb slightly aggregates from 12 mM. As the phospholipid extraction occurs only from 10 mM, this result indicates that aggregates are probably correlated with the membrane solubilization. However, a different behaviour is observed depending on whether the liposomes are incubated with Rameb below or above the transition temperature of the membrane: at 34 °C the size distribution of liposomes is unchanged while at 14 °C it increases. These observations have been correlated with the Helfrich bending energy and interpreted as follows: (i) At 14 °C, the Rameb induces a preferential destruction of small sized liposomes causing a reorganization of the bilayer with formation of larger vesicles; (ii) at 34 °C, the cyclodextrin affects similarly all the vesicles ,which results in an unchanged liposomal size distribution

The modelled SANS data also show a decrease in membrane thickness. This is correlated with a phospholipid extraction. Indeed, phospholipid molecules are extracted by Rameb, causing a destruction of a part of the liposomal population. In “surviving” liposomes, the space made available by the extracted chains of the phospholipids allows to adopt a *gauche*-conformation with the remaining chains of the phospholipids, resulting in a decrease in membrane thickness. This decrease, through the action of Rameb, is weaker above than below the transition temperature of the membrane, explaining that no significant change in microviscosity is observed in ESR.

## GENERAL CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

---

Let's also note that, as in ESR experiments, the importance of the phase transition temperature of the DMPC membrane has been highlighted by SANS technique: at 14 ° C DMPC molecules are structured in a rigid phase whereas at 34 ° C the membrane is in a fluid state resulting in a decrease in membrane microviscosity and membrane thickness.

The SANS data also reveal that Rameb is adsorbed in a dose-dependent way on the liposomal membrane. When Rameb reaches a concentration of 30 mM, half of the liposomal surface is covered by the cyclodextrin. This adsorption phenomenon has already been observed on a phospholipidic monolayer (13).

To sum up, the affinity of the Rameb for DMPC molecules has been demonstrated and quantified in a non-invasive way. Rameb extracts DMPC molecules in a dose-dependent way to form mixed aggregates in solution. Following the extraction, lipid reorganization takes place and it depends on the temperature. In addition, Rameb is adsorbed in a dose-dependent way on liposomal surface.

After studying the effect of Rameb on DMPC liposomes, this work has examined the effect of the cyclodextrin on a more sophisticated membrane model: liposomes doped with cholesterol. To develop the best model, the influence of cholesterol on the membrane microviscosity has been studied by ESR.

Cholesterol, at room temperature (25 ° C), increases in a dose-dependent way the membrane microviscosity at the level of the hydrophilic part and decreases it in the hydrophobic part: cholesterol condenses the top of the membrane where its rings of steroids take place and lets more freedom in the hydrophobic part thanks to its carbon chain that it is very flexible (14). The microviscosity of liposomal membranes doped with 30% of cholesterol remains unchanged regardless of temperature. These results confirm that when a concentration of 30% of cholesterol is reached, the membrane is in a L<sub>0</sub> phase (liquid ordered phase) as in the lipid rafts of the plasma membrane. The raft-like domains are subject of numerous studies particularly through the cholesterol depletion induced by cyclodextrins (15-

## GENERAL CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

---

17). As a result, liposomes doped with 30% cholesterol seem an excellent model for studying the effects of Rameb on lipid rafts.

Incubation of liposomes (doped with 30% cholesterol) with increasing concentrations of Rameb induces a dose-dependent decrease in membrane microviscosity. This variation can be directly linked to the percentage of cholesterol in the bilayer as the Rameb induces no change in microviscosity in undoped liposomes. Quantification of the cholesterol extracted by Rameb has been established by the standard curve connecting the microviscosity increase to the percentage of cholesterol included in the bilayer. The results show that extraction of cholesterol is only effective from a concentration of 10 mM of Rameb.

The SANS results show a linear extraction of cholesterol as soon as the liposomes are put in contact with the cyclodextrin. Indeed, the mean radius of liposomes doped with cholesterol and subjected to Rameb (0-30 mM) decreases linearly until it reaches the value of the mean radius of pure DMPC liposomes (without cholesterol). A linear reduction in the number of aggregation is also determined after incubation of increasing amounts of Rameb: when the concentration of 30 mM of Rameb is reached, the aggregation number (total: DMPC and cholesterol) is reduced by 30%. As the liposomes are initially doped with 30% of cholesterol, this result confirms a linear lipid extraction only linked to the cholesterol extraction and not to the DMPC one.

As for the undoped liposomes, simulations show a Rameb adsorption on the surface of the vesicles. This adsorption is however more important when liposomes are doped than when they are not. Similarly, the decrease of the lipid fraction included in the vesicle is greater when the liposomes are doped. These two results confirm a greater affinity of Rameb for the cholesterol molecules than for the DMPC ones. The modeled SANS data also show that liposomes subjected to Rameb have a polydispersity that decreases. Consequently, Rameb extracts cholesterol from liposomes and a more monodisperse population of cholesterol-free vesicles appears.



## GENERAL CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

---

A dose-dependent decrease in the thickness of the membrane at 37 ° C was observed. The results obtained with SANS technique corroborate those of ESR: at 37 ° C following the extraction of cholesterol, the membrane leaves the ordered liquid phase for a disordered liquid one where the membrane thickness and microviscosity is lower. Both techniques show that the bilayer is significantly altered when the concentration of 10 mM of Rameb is reached.

After quantifying the dose-dependent extraction of cholesterol in the liposomal membranes as well as the changes in membrane microviscosity and structural parameters of liposomes, we have shown that extracted cholesterol is not free in solution but forms aggregates. Indeed, liposomes doped with cholesterol have been marked by cholestane probes whose chemical structure is similar to cholesterol. The analysis of cholestane ESR spectra shows that probes are extracted from the membrane through the action of Rameb. This extraction, as for the n-DSA spin label, is made in a dose dependent way, and the extracted probes are not free in solution but form mixed aggregates (Rameb / probes). As cholestane and cholesterol have a similar molecular architecture, the results obtained with the cholestane probe can be extrapolated to the cholesterol molecule.

Accumulations of SANS data are much too long to keep cells alive. Therefore experiments on HCT116 cells have only been made using the ESR technique. Considering the results obtained with the liposomal bilayers, cell membranes have been only labeled with 5-DSA probes to avoid being hampered by a possible tilt of the probe.

As we have repeated several times, the ESR technique, coupled with spin labeling method, provides access to the cell membrane microviscosity. However, the cell is composed of several organelles each one being surrounded by a unique membrane composition (18). It is generally accepted that 5-DSA probes are localized only in the plasma membranes. However, no study has confirmed this hypothesis. This work has therefore jointly used the technique of mass spectrometry, fluorescence microscopy and ESR to verify this assumption. ESR techniques and mass spectrometry show that 5-DSA is located mainly in the plasma membrane, but is also trapped in the endoplasmic reticulum and the nucleus. However, ESR spectroscopy is not sensitive to probes lying in the endoplasmic reticulum. Fluorescence

## GENERAL CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

---

microscopy has demonstrated that the localization of 5-DSA in the nuclear membrane and endoplasmic reticulum is related to the fractionation protocol. Therefore, these results establish that, in our experimental conditions, the ESR is only sensitive to probes which lie in the plasma membrane. Consequently, the ESR membrane microviscosity corresponds to the microviscosity of the plasma membrane of the cells.

Incubation of cells with increasing concentrations of Rameb induces a decrease in membrane microviscosity. Similarly, the incubation time of cells with the cyclodextrin decreases the membrane microviscosity. Membrane cholesterol assay shows that, as with the liposomes, the microviscosity of the plasma membrane is directly correlated with the percentage of cholesterol included in it. These results confirm the role of Rameb as a cholesterol extractor and corroborate the hypothesis in our doped liposomes study, namely the importance of the incubation time of membranes with Rameb.

The analysis of ESR spectra also shows, as for liposomes, a dose-dependent extraction of n-DSA and cholestane probes when cells are incubated with Rameb. Similarly, the markers are not extracted in a free form, but in the form of mixed aggregates (RAMEB / probes). However, a difference between the spectrum of cholestane in the plasma membrane and in the membrane of liposomes doped with cholesterol is observed. The spectrum of cholestane in cell membranes is composed of a single and very distorted peak involving a spin-spin interaction favored by a high local concentration of probes. This broadening of the spectrum was correlated with lipid rafts known to be rich in cholesterol (19): the cholestane gets into the rafts and, like cholesterol, cholestane probes are close to each other. As Rameb extracts the cholestane from lipid rafts, we came to the conclusion that the cyclodextrin behaves in the same way with cholesterol.

Consequently, the unusual, not to say unique combination of small angle neutrons scattering and electron spin resonance techniques has allowed for the first time, to quantify the various effects of a cyclodextrin on liposomal and cellular membranes and this, in a non-invasive way. The two techniques are complementary and provide a significant amount of information on the mechanisms of action of the cyclodextrin. We have shown that while

## GENERAL CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

---

Rameb is able to extract DMPC molecules, this affinity is erased when the membrane contains cholesterol. Rameb then extracts cholesterol from the membranes in a dose-dependent way and the extracted molecules form aggregates with cyclodextrins. As in the undoped liposomes, the Rameb is adsorbed on the liposomal surface, but this adsorption is stronger when the liposomes contain cholesterol. This work also allows quantification, *in vitro*, of the cholesterol extraction by Rameb in the cell plasma membrane. In addition, the results obtained by ESR show that Rameb is able to extract cholesterol from the lipid rafts.

As our model and our experimental protocol are intended as general as possible, any molecule able to interact with biological membrane can be studied. In this work the Rameb has been focused on, but any other cyclodextrin can be studied. For the time being, clathration of known drugs with plant metabolites is largely expanding because it improves bioavailability, solubility while activating new properties of drugs (20). That being the case, our innovating working method opens the door to a vast field of analysis of the action of these original drugs (or of the metabolites alone) on the membranes.

In this thesis we used simple lipid composition of liposomes (DMPC and CHOL). It would be also interesting to extend our knowledge by creating models that mimic as accurately as possible the membrane lipid rafts, by including among others the use of ternary mixtures of phospholipids.



1. **Castagne, D., B. Evrard, B. Nusgens, and G. Piel.** 2010. *Effect of  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives on caveolae disruption, relationships with their cholesterol extraction capacities* J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem. 67:369-376.
2. **Castagne, D., M. Fillet, L. Delattre, B. Evrard, B. Nusgens, and G. Piel.** 2008. *Study of the cholesterol extraction capacity of  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models* J Incl Phenom Macrocycl Chem 63.
3. **14th International cyclodextrin symposium,** Kyoto (Japan). May 8-11, 2008
4. **15th International cyclodextrin symposium,** Vienna (Austria). May 9-12, 2010
5. **Piel, G., M. Piette, V. Barillaro, D. Castagne, B. Evrard, and L. Delattre.** 2007. *Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes.* Int J Pharm 338:35-42.
6. **Puskas, I., and F. Csempešz.** 2007. *Influence of cyclodextrins on the physical stability of DPPC-liposomes.* Colloids Surf B Biointerfaces 58:218-224.
7. **Piel, G., M. Piette, V. Barillaro, D. Castagne, B. Evrard, and L. Delattre.** 2006. *Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: the effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics.* Int J Pharm 312:75-82.
8. **Hatzi, P., S. Mourtas, P. G. Klepetsanis, and S. G. Antimisiaris.** 2007. *Study of the interaction between cyclodextrins and liposome membranes: effect on the permeability of liposomes.* International Journal of Pharmaceutics 225:15-30.
9. **Puskás, I., L. Barcza, L. Szente, and F. Csempešz.** 2006. *Features of the Interaction between Cyclodextrins and Colloidal Liposomes.* Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 54:89-93.
10. **Bahri, M. A., B. J. Heyne, P. Hans, A. E. Seret, A. A. Mouithys-Mickalad, and M. D. Hoebeke.** 2005. *Quantification of lipid bilayer effective microviscosity and fluidity effect induced by propofol.* Biophys Chem 114:53-61.
11. **Coderch, L., J. Fonollosa, M. De Pera, J. Estelrich, A. De La Maza, and J. L. Parra.** 2000. *Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption.* J Control Release 68:85-95.
12. **Arsov, Z., M. Schara, and J. Strancar.** 2002. *Quantifying the Lateral Lipid Domain Properties in Erythrocyte Ghost Membranes Using EPR-Spectra Decomposition.* Journal of Magnetic Resonance 157:52-60.

## REFERENCES

---

13. **Mascetti, J., S. Castano, D. Cavagnat, and B. Desbat.** 2008. *Organization of  $\beta$ -Cyclodextrin under Pure Cholesterol, DMPC, or DMPG and Mixed Cholesterol/Phospholipid Monolayers.* Langmuir 24:9616-9622.
14. **Costanzo, R., T. De Paoli, J. E. Ihlo, A. A. Hager, H. A. Farach, C. P. Poole Jr, and J. M. Knight.** 1994. *ESR study of order and dynamics in lecithin liposomes with high cholesterol content.* Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy 50:203-208.
15. **Zidovetzki, R. and I. Levitan,** 2007. *Use of cyclodextrins to manipulate membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies.* Biochim Biophys Acta 1768:1311-1324.
16. **Giocondi, M-C., E. Pierre, P. Dosset, C. Le Grimellec,** 2004. *Use of cyclodextrin for AFM Monitoring of Model Raft formation.* Biophys J 86:861-869.
17. **Masserini, M., M. Pitto, F. Raimondo, E. Cazzaniga,** 2005. *Methyl- $\beta$ -cyclodextrin treatment affects the thermotropic behaviour of membranes and detergent-resistant membrane fractions of cultured A431 Cells.* Biol Pharm Bull 28:2185-2188.
18. **Lodish, M. L. Berkowitz, Matzudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, and Darnell.** 2005. *Biologie moléculaire de la cellule.* de Boek, Bruxelles.
19. **Simons, K., and E. Ikonen.** 1997. *Functional rafts in cell membranes.* Nature 387:569-572.
20. **Tolstikova, T., M. Khvostov, and A. Bryzgalov.** 2011. *The improvement of toxicopharmacological properties of drugs by clathration with plant metabolites.* Current medicinal chemistry 18:82.