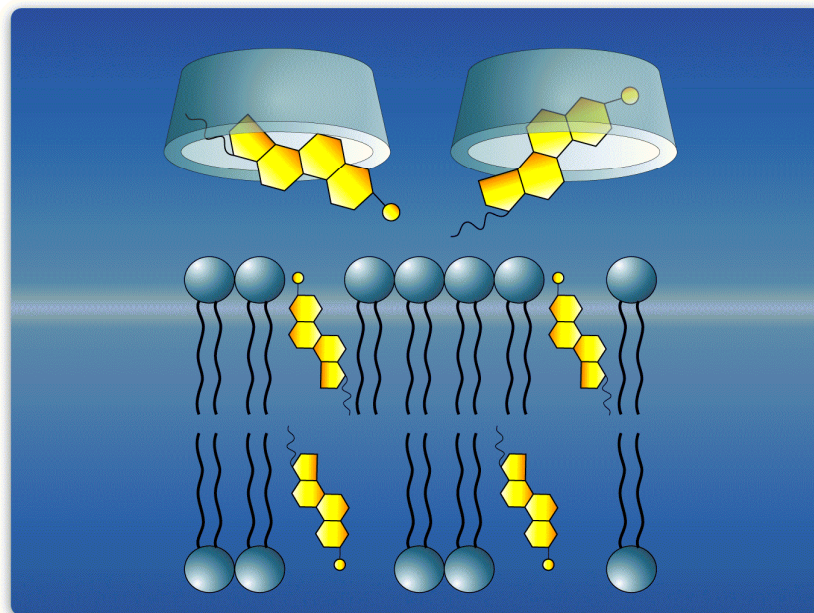




Faculté de Médecine
Laboratoire de Technologie Pharmaceutique
Pr. B. EVRARD

ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES CYCLODEXTRINES ET LES MEMBRANES LIPOSOMALES OU BIOLOGIQUES



Delphine CASTAGNE

Pharmacien

Promoteurs :

Dr. G. PIEL et Pr. L. DELATTRE

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Année académique 2009-2010

REMERCIEMENTS

Au terme de cette thèse, je voudrais remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à son aboutissement.

J'adresse tout d'abord mes plus vifs remerciements aux Professeurs Luc Delattre et Brigitte Evrard pour leur accueil au sein du laboratoire de Technologie Pharmaceutique, et pour m'avoir permis d'entamer des recherches de doctorat dans le cadre d'un contrat d'assistante, fonction par ailleurs très enrichissante. La communication de leurs connaissances et bonne humeur ont participé à créer un bon environnement de travail.

Je tiens également à remercier le Docteur Géraldine Piel, première assistante, qui m'a proposé de travailler sur l'étude des interactions des cyclodextrines avec les membranes. Sans cette proposition, sa disponibilité et son « efficacité », je n'aurais jamais pu terminer une thèse de doctorat. Sa positivité et ses conseils m'ont encouragé à la mener à bien.

Je remercie le Professeur Betty Nusgens, du Laboratoire de Biologie des Tissus Conjonctifs (LBTC), pour m'avoir permis de travailler au sein du laboratoire et pour le suivi des travaux effectués sur les cultures cellulaires. Ses connaissances dans ce domaine, son intérêt pour la recherche et la gentillesse qui la caractérise ont contribué à son bon déroulement.

Je souhaite remercier Mesdames et Messieurs les Membres du Jury qui me font l'honneur de juger ce travail.

Différentes techniques ont pu être utilisées grâce à des collaborations avec des membres du Département de Pharmacie. Merci aux Docteurs Marianne Fillet et Michel Frédéricich pour la mise au point des protocoles de dosage du cholestérol cellulaire et pour la réalisation des études par résonance magnétique nucléaire.

J'exprime également toute ma gratitude au Docteur Georges Dive, Chercheur Qualifié du FNRS, pour m'avoir fait profiter de ses connaissances et m'avoir aidé à interpréter les résultats en modélisation moléculaire.

Il me tient à cœur de remercier les collègues que j'ai eu l'occasion de rencontrer au cours de mes nombreuses années au sein du service et avec lesquels j'ai pu partager discussions scientifiques ou non, moments de distraction et fous rires.

REMERCIEMENTS

Je remercie également ceux des membres du LBTC qui m'ont appris des techniques qui m'étaient au départ inconnues.

Je voudrais remercier les collègues de disciplines variées pour les collaborations, les discussions et les conseils prodigués tout au long de mon parcours de chercheur. Je ne citerai pas de noms ici, pour ne pas en oublier certains.

Je suis enfin très reconnaissante à Timmy et à Els pour la traduction néerlandaise du résumé, à Kevin pour avoir réalisé les finitions de la couverture de cet ouvrage, de même qu'à Antoine, Esther et Marie pour l'assemblage et les vérifications finales.

Je n'oublierai pas mes amis et mes proches pour leurs encouragements au cours de toutes ces années. Merci pour avoir su me divertir et me soutenir jusqu'au bout. Enfin, un remerciement particulier à ma sœur Sylvie pour avoir sans doute été « mon moteur » et pour ses relectures attentives des manuscrits en anglais.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	5
OBJECTIFS ET PLAN DE LA THESE.....	7
INTRODUCTION.....	9
Avant-propos.....	9
1 Les membranes	9
1.1 La membrane plasmique.....	9
1.1.1 Constituants membranaires	9
1.1.1.1 Phospholipides.....	9
1.1.1.2 Glycosphingolipides	11
1.1.1.3 Stérols	11
1.1.1.4 Protéines membranaires	12
1.1.1.5 Glucides membranaires.....	12
1.1.2 Structure membranaire.....	12
1.1.2.1 Modèle de la « mosaïque fluide ».....	14
1.1.2.2 Microdomaines membranaires	15
1.1.2.2.1 Radeaux lipidiques.....	15
1.1.2.2.2 Cavéoles	16
1.2 Modèles membranaires ou membranes artificielles.....	17
1.2.1 Structure et composition des liposomes.....	17
1.2.2 Classification des liposomes	18
1.2.3 Préparation des liposomes.....	19
1.2.4 Caractérisation des liposomes	20
1.2.5 Mesure de l'intégrité membranaire des liposomes.....	21
1.2.6 Applications des liposomes.....	21
1.2.6.1 Modèles membranaires	21
1.2.6.2 Applications thérapeutiques	22
2 Les cyclodextrines	25
2.1 Structure et propriétés	25
2.1.1 Cyclodextrines naturelles.....	25
2.1.2 Dérivés de synthèse	26
2.2 Complexes	28
2.2.1 Formation de complexes.....	28
2.2.2 Etude des complexes.....	29
2.2.2.1 Diagrammes de solubilité.....	30
2.2.2.2 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.....	31
2.2.2.3 Modélisation moléculaire.....	32
2.3 Applications	33
2.3.1 Domaine pharmaceutique	33
2.3.2 Industrie alimentaire	34
2.3.3 Applications diverses.....	35
2.3.4 Biologie cellulaire	35
3 Interactions cyclodextrines-membranes.....	36
3.1 Membranes artificielles	36
3.1.1 Monocouches lipidiques	36

TABLE DES MATIERES

3.1.2	Liposomes	37
3.2	Membranes cellulaires.....	40
3.2.1	Modulation du cholestérol membranaire	40
3.2.2	Effet au niveau des microdomaines membranaires	42
4	Bibliographie	43
RESULTATS.....		54
1	Chapitre I : Mise en évidence de l'interaction des cyclodextrines avec des modèles membranaires et leurs constituants lipidiques.....	55
1.1	Introduction.....	55
1.2	Résumé des résultats	55
1.3	Conclusions.....	57
2	Chapitre II : Etude préliminaire de l'effet des cyclodextrines sur la viabilité de cellules endothéliales.....	68
2.1	Introduction.....	68
2.2	Résumé des résultats	68
2.3	Conclusions.....	69
3	Chapitre III : Etude de la cytotoxicité de la β -cyclodextrine et de ses dérivés et mise en relation avec leur capacité d'extraction du cholestérol cellulaire.....	74
3.1	Introduction.....	74
3.2	Résumé des résultats	74
3.3	Conclusions.....	76
4	Chapitre IV : Effets de la β -cyclodextrine et de ses dérivés sur la déstructuration des cavéoles.....	86
4.1	Introduction.....	86
4.2	Résumé des résultats	86
4.3	Conclusions.....	88
5	Chapitre V : Etudes spectroscopiques et de modélisation moléculaire afin de comprendre les interactions entre le cholestérol et les cyclodextrines	98
5.1	Introduction.....	98
5.2	Résumé des résultats	98
5.3	Conclusions.....	100
DISCUSSION GENERALE.....		113
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....		125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		127
LISTE DES PUBLICATIONS PERSONNELLES.....		134
RESUMES.....		135

LISTE DES ABREVIATIONS

ABAEC	« Adult bovine aortic endothelial cells »
α -CD	Alpha-cyclodextrine
BAEC	« Bovine aortic endothelial cells »
β -CD	Beta-cyclodextrine
β -CDs	β -cyclodextrine et ses dérivés
BLMs	« Bilayer lipid membranes »
CD	Cyclodextrine
CE	Efficacité de complexation
CHOL	Cholestérol
D.S. (ou DS)	Degré de substitution (moyen)
D ₂ O	Eau deutérée
Di-10-PC	Didecanoyl phosphatidylcholine
Dimeb	Diméthyl- β -cyclodextrine
DMPC	Dimyristoyl phosphatidylcholine
DOPC	Dioléoyl phosphatidylcholine
DPPC	Dipalmitoyl phosphatidylcholine
DRV	« Dehydration-rehydration vesicles »
DSC	« Differential scanning calorimetry » (calorimétrie à balayage différentiel)
DSPC	Distearoyl phosphatidylcholine
eNOS	Synthase endothéliale de l'oxyde nitrique
EPR	« Enhanced permeability and retention »
γ -CD	Gamma-cyclodextrine
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSL	Glycosphingolipide
GUV	« Giant unilamellar vesicles »
HP-	Hydroxypropyl-
HP- β -CD	Hydroxypropyl- β -cyclodextrine
H-PC	Phosphatidylcholine hydrogénée
HUVEC	« Human umbilical vein endothelial cells »
K _c (ou K _{n:m})	Constante de stabilité
LUV	« Large unilamellar vesicles »
M β -CD	Méthyl- β -cyclodextrine
MLV	« Multilamellar vesicles »
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
MVV	Multivesicular vesicles
PC	Phosphatidylcholine
PCS	« Photon correlation spectroscopy » (spectroscopie de corrélation de photon)
PEG ₂₀₀₀ -DSPE	Distearoyl phosphatidylethanolamine-polyethylene glycol 2000
PSL	« pH-sensitive liposomes »
Rameb	β -cyclodextrine méthylée de façon aléatoire
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROESY	« Rotating-frame Overhauser effect spectroscopy »

LISTE DES ABREVIATIONS

RPE	Résonance paramagnétique électronique
SA	Stéarylamine
SBE-	Sulfobutyléther-
SBE- β -CD	Sulfobutyléther- β -cyclodextrine
SC	Stratum corneum
SCL	« Stratum corneum liposomes »
SM	Sphingomyéline
SPC	Phosphatidylcholine de soja
SPR	« Surface plasmon resonance »
SUV	« Small unilamellar vesicles »
Trimeb	Triméthyl- β -cyclodextrine

Les cyclodextrines sont des molécules intéressantes dans le domaine de la Technologie Pharmaceutique vu leur capacité à former des complexes avec des molécules peu hydrosolubles. Elles sont notamment utilisées pour favoriser la solubilité de substances actives insolubles en milieu aqueux, pour augmenter leur biodisponibilité, pour améliorer dans certains cas la stabilité (de molécules ou de formulations), pour diminuer des effets indésirables ainsi que pour leurs propriétés promotrices d'absorption. Etant donné que de nombreux travaux existent, leur utilité comme excipient n'est plus à démontrer.

Au niveau cellulaire, l'interaction des cyclodextrines avec les constituants lipophiles membranaires semble expliquer la cytotoxicité de certains dérivés. L'extraction du cholestérol à partir des microdomaines membranaires que sont les radeaux lipidiques ou les cavéoles est mise à profit pour l'étude des fonctions cellulaires qui y sont associées. On considère maintenant que la modulation des taux de cholestérol via l'utilisation de cyclodextrines pourrait être mise à profit pour traiter des maladies ou infections impliquant ces microdomaines d'où leur intérêt thérapeutique potentiel.

Le but de nos travaux est d'étudier les interactions de différentes cyclodextrines avec les constituants (principalement le cholestérol) des membranes liposomales ou biologiques pour mieux comprendre les conséquences de ces interactions au niveau cellulaire.

La première partie de la thèse s'intéressera aux interactions de diverses cyclodextrines avec des modèles de membranes biologiques que sont les liposomes unilamellaires. L'étude de l'intégrité membranaire de ces vésicules, bien qu'étant des modèles simplifiés des cellules, en présence de solutions de cyclodextrines permettrait de prédire les effets toxiques de différentes cyclodextrines. L'interaction avec les composés lipidiques constitutifs sera quantifiée par des diagrammes de solubilité pour mettre en relation la déstabilisation des liposomes avec l'extraction éventuelle de ces constituants.

Une étude préliminaire de viabilité de cellules endothéliales dans un milieu de culture contenant des cyclodextrines sera réalisée. Elle aura pour but de mettre en évidence les dérivés les plus toxiques et de déterminer les conditions expérimentales à utiliser ultérieurement.

Les essais suivants sur cultures cellulaires s'efforceront de quantifier la diminution des taux de cholestérol induite par la β -CD et ses dérivés et à relier leurs effets cytotoxiques avec leur capacité à extraire ce lipide.

OBJECTIFS ET PLAN DE LA THESE

L'extraction éventuelle d'autres lipides membranaires par les cyclodextrines sera ensuite évaluée aux concentrations non toxiques. Les derniers essais cellulaires étudieront les effets de la β -cyclodextrine et de ses dérivés méthylés sur les cavéoles membranaires de cellules endothéliales humaines et bovines. Une relation entre la déstructuration des microdomaines et la capacité d'extraction du cholestérol précédemment évaluée sera envisagée.

Enfin, des méthodes spectrales (RMN ^1H et ROESY) et théoriques seront utilisées pour étudier les interactions de β -cyclodextrines méthylées principalement avec le cholestérol afin d'expliquer les effets obtenus précédemment.

Avant-propos

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'études réalisées au sein du laboratoire de Technologie Pharmaceutique visant à étudier l'effet des cyclodextrines sur divers systèmes membranaires. Initiée sur des liposomes, modèles des membranes biologiques, cette étude s'est poursuivie par des essais sur cultures cellulaires. Elle se situe à mi-chemin entre la biologie et la pharmacie. Vu l'interdisciplinarité de ce travail, l'introduction a été divisée en trois parties. La première sera consacrée aux membranes cellulaires et à leurs modèles. La deuxième partie, s'intéressera aux cyclodextrines et à leurs applications. Enfin, la troisième partie consistera en une revue de la littérature résumant les interactions des cyclodextrines avec les membranes artificielles ou biologiques.

1 Les membranes

1.1 La membrane plasmique

1.1.1 Constituants membranaires

Les membranes sont des structures complexes composées de lipides, de protéines et de glucides. Chez les mammifères, les principaux constituants lipidiques des membranes sont les phospholipides, les glycosphingolipides et le cholestérol (Murray and Granner, 2008).

1.1.1.1 Phospholipides

Deux principaux groupes de phospholipides sont présents dans les membranes à savoir les phosphoglycérides (ou glycérophospholipides) et les sphingomyélines. Les plus répandus, les glycérophospholipides, comportent un squelette formé d'une molécule de glycérol à laquelle sont attachés, par des liaisons ester, deux acides gras et un alcool phosphorylé. Les acides gras, habituellement à nombre pair d'atomes de carbone, ne sont pas ramifiés et peuvent être saturés ou insaturés. Le phosphate en position 3 peut être estérifié par un alcool (cas de la phosphatidylcholine) ou non (cas du phosphoglycéride le plus simple) (Murray and Granner, 2008) (Figure 1).

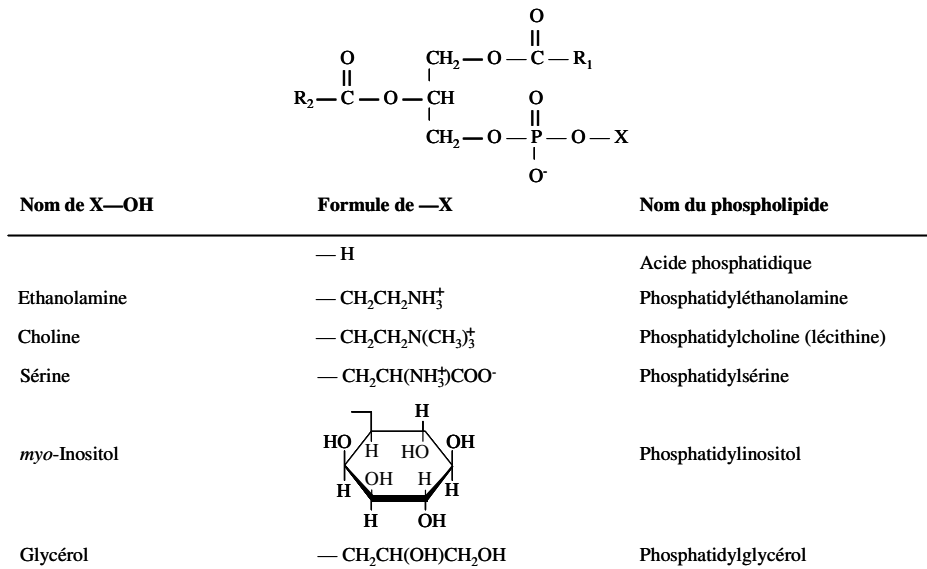


Figure 1 : Structures générales de quelques glycérophospholipides (Voet and Voet, 1998)

Les sphingomyélines (ou sphingophospholipides) contiennent de la sphingosine à laquelle est attaché, au groupe aminé, un acide gras (ce qui forme un céramide), le groupement hydroxyle primaire étant estérifié par de la phosphorylcholine (Figure 2) ou un groupe phosphoryléthanolamine (Voet and Voet, 1998; Murray and Granner, 2008).

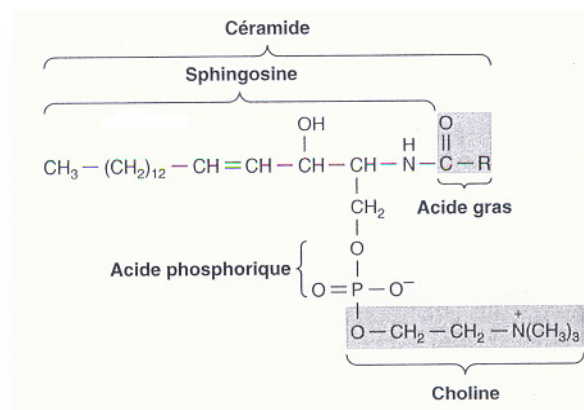


Figure 2 : Structure d'une sphingomyéline (Botham and Mayes, 2008)

INTRODUCTION

1.1.1.2 Glycosphingolipides

Comme leur nom l'indique, les glycosphingolipides (GSL) sont des lipides contenant des glucides. Ils sont construits sur un squelette de céramide et comprennent le galactosyl- et le glucosylcéramide (cérébrosides) ainsi que les gangliosides (céramides oligosaccharidiques comportant au moins un résidu d'acide sialique, par exemple, l'acide neuraminique) (Voet and Voet, 1998; Murray and Granner, 2008) (Figure 3).

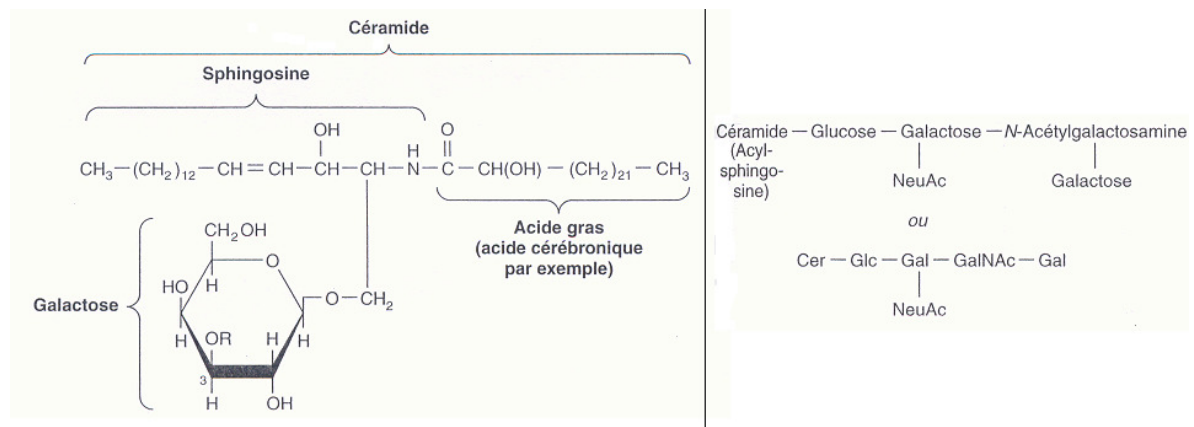


Figure 3 : Structure d'un cérébroside (à gauche) et du ganglioside GM1 (à droite) (Botham and Mayes, 2008)

1.1.1.3 Stérols

Le cholestérol est le stérol le plus courant dans les membranes (Murray and Granner, 2008). Il est un constituant majeur des membranes plasmiques animales et se trouve en moindre quantité dans les membranes des organites subcellulaires. Selon différentes estimations, 80 à 90% du cholestérol cellulaire total seraient présents dans la membrane plasmique alors que le réticulum endoplasmique et les membranes mitochondriales internes en contiennent de très faibles quantités (Mukherjee et al., 1998). Bien que les proportions relatives varient selon les espèces et les types cellulaires chez les vertébrés, le cholestérol constituerait 30-40 mol% du total des lipides de la membrane plasmique contre 40-60 mol% pour les glycérophospholipides et 10-20 mol% pour les sphingolipides (McMullen et al., 2004). Un léger caractère amphiphile est conféré au cholestérol par son groupe hydroxyle alors que sa structure cyclique fusionnée lui confère une rigidité supérieure à celle des autres lipides membranaires (Figure 4). Il a donc une incidence importante sur les propriétés des membranes (Voet and Voet, 1998).

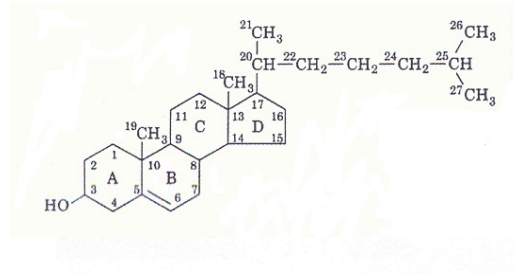


Figure 4 : Structure chimique du cholestérol (Voet and Voet, 1998)

1.1.1.4 Protéines membranaires

Elles sont classées selon leur degré d'association aux membranes. Ainsi, on distingue les protéines intrinsèques (ou intégrales) et les protéines extrinsèques (ou périphériques). Certaines protéines intrinsèques sont exposées d'un seul côté de la membrane alors que d'autres, appelées protéines transmembranaires, traversent la membrane (Voet and Voet, 1998).

Chaque membrane possédant une panoplie différente de protéines, il n'existe donc pas un type général unique de structure membranaire. Les protéines sont les principales molécules fonctionnelles des membranes. Il peut s'agir d'enzymes, de pompes et de canaux, de constituants structuraux, d'antigènes (d'histocompatibilité par exemple) et de récepteurs pour diverses molécules (Murray and Granner, 2008).

1.1.1.5 Glucides membranaires

Les glucides membranaires sont souvent de courtes chaînes comptant moins de 15 monomères. Si certains s'unissent par des liaisons covalentes aux lipides (glycolipides), la plupart se lie à des protéines (glycoprotéines).

1.1.2 Structure membranaire

Tous les constituants lipidiques importants de la membrane contiennent à la fois des régions hydrophobes et d'autres hydrophiles et sont dits « amphiphiles » (Murray and Granner, 2008). Les glycérophospholipides manifestent un comportement ambivalent à l'égard de l'eau. Leurs queues hydrocarbonées sont hydrophobes alors que le groupement phosphate et les molécules

INTRODUCTION

qui s'y rattachent forment une tête hydrophile. Dans l'eau, ils forment des agrégats en doubles couches (des bicouches) qui « cachent » leurs parties hydrophobes (Campbell and Reece, 2007a) (Figure 5).

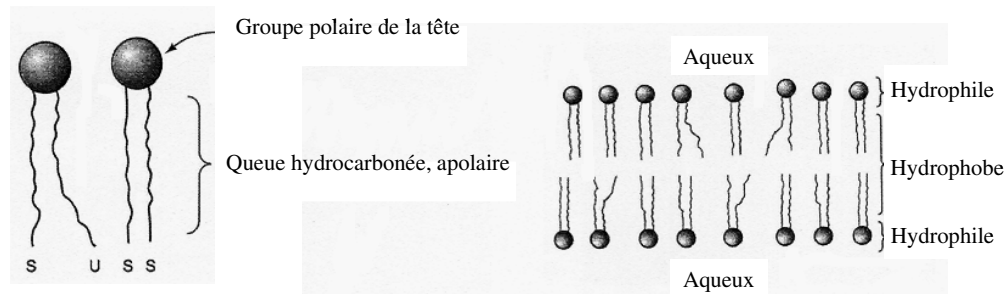


Figure 5 : Représentations schématiques de phospholipides (composés d'acides saturés (S) ou insaturés (U)) (à gauche) et de la section d'une membrane bilamellaire formée de molécules de phospholipides (Murray and Granner, 2008)

De la même manière, les glycérophospholipides à la surface d'une cellule sont disposés en une bicouche. Leurs queues hydrophobes se font face et pointent vers l'intérieur de la membrane (ce qui leur permet de s'éloigner de l'eau) alors que leurs têtes hydrophiles se trouvent complètement à l'opposé et sont en contact avec les solutions aqueuses de part et d'autre de la membrane cellulaire (Campbell and Reece, 2007a).

Le cholestérol s'insère parmi les phospholipides de la membrane avec son groupement hydroxyle situé à l'interface aqueuse et le reste de la molécule insérée dans le feuillet membranaire (Murray and Granner, 2008).

Notons que les protéines intrinsèques sont amphiphiles : les segments de la protéine immergés dans l'espace interne non polaire d'une membrane ont essentiellement des résidus de surface hydrophobes alors que les segments qui se projettent dans l'environnement aqueux présentent essentiellement des résidus polaires (Voet and Voet, 1998).

Un autre aspect des interactions entre les lipides et les protéines est que certaines protéines sont ancrées à l'un des feuillets de la bicouche par liaison covalente à certains lipides. L'acide palmitique et myristique sont des acides gras impliqués dans ces liaisons à des protéines spécifiques. Un certain nombre d'autres protéines sont attachées à des structures de type glycoposphatidylinositol (ancre GPI) (Murray and Granner, 2008).

Les membranes sont des structures asymétriques, l'asymétrie pouvant être partiellement due à la distribution irrégulière des protéines dans les membranes. Une asymétrie intérieur-extérieur provient aussi de la localisation extérieure des glucides attachés aux protéines membranaires.

INTRODUCTION

Les phospholipides présentent également une asymétrie transversale. Les phospholipides contenant de la choline (phosphatidylcholine et sphingomyéline) sont surtout situés dans la couche moléculaire externe alors que les aminophospholipides (phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine) se retrouvent de préférence dans la couche interne (Murray and Granner, 2008). La distribution du cholestérol dépendrait notamment de son affinité pour les autres lipides et protéines composant la membrane et qui ne sont pas distribués symétriquement. Une asymétrie dans la distribution entre les feuillet externe et interne a été mise en évidence pour différents types cellulaires (Coste, 2006).

1.1.2.1 Modèle de la « mosaïque fluide »

Le modèle de structure membranaire de type « mosaïque fluide » (Figure 6) présenté en 1972 par Singer et Nicolson est encore largement accepté (Heimburg, 2007; Murray and Granner, 2008).

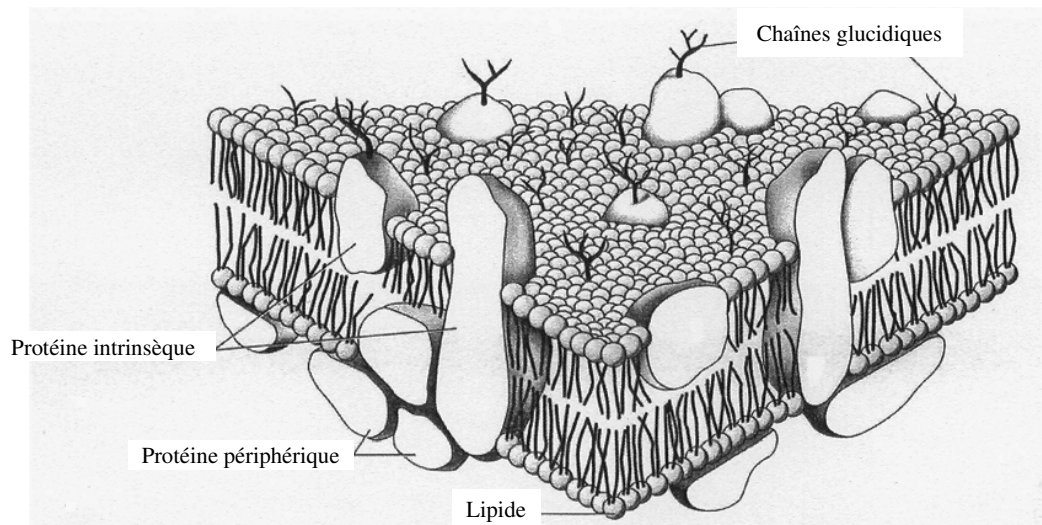


Figure 6 : Modèle en mosaïque fluide de la structure membranaire (Murray and Granner, 2008)

D'après ce modèle, la membrane est une « mosaïque » constituée d'une bicouche fluide de glycérophospholipides dans laquelle flottent des protéines. Les membranes ne sont pas des couches statiques de molécules maintenues rigidement en place. Leurs constituants tiennent ensemble grâce aux attractions hydrophobes, plus faibles que les liaisons covalentes. La plupart des lipides et certaines protéines peuvent dériver latéralement dans le plan de la membrane. La diffusion latérale des glycérophospholipides s'effectue rapidement alors que

INTRODUCTION

celle des protéines, beaucoup plus grosses, se fait plus lentement. Bien que rarement, il arrive qu'une molécule culbute et passe d'une couche à l'autre (mouvement « flip-flop »), déplacement nécessitant l'apport d'énergie et l'aide d'enzymes intramembranaires (Campbell and Reece, 2007b).

1.1.2.2 Microdomaines membranaires

L'existence d'hétérogénéités latérales dans les membranes cellulaires a conduit les biologistes à repenser le modèle original de la « mosaïque fluide ». On sait maintenant que les membranes plasmiques contiennent des microdomaines de composition particulière : les radeaux lipidiques et les cavéoles.

1.1.2.2.1 Radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques (dénommés « lipid rafts » en anglais) sont des microdomaines enrichis en cholestérol, en sphingolipides (comme la sphingomyéline), en glycosphingolipides (comme le ganglioside GM1) de même qu'en certaines protéines spécifiques et protéines à ancres GPI (glycosylphosphatidylinositol) (Figure 7). Ils seraient impliqués dans la transduction de signaux et dans d'autres processus (Varma and Mayor, 1998; Murray and Granner, 2008).

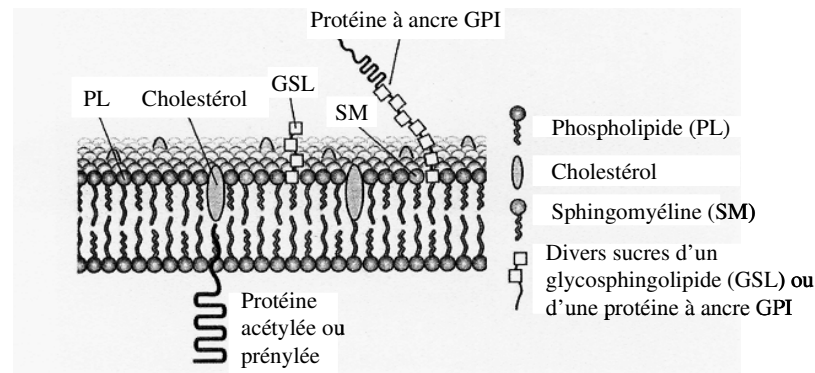


Figure 7 : Représentation schématique d'un radeau lipidique (Murray and Granner, 2008)

1.1.2.2.2 Cavéoles

Les cavéoles pourraient dériver des radeaux lipidiques (Murray and Granner, 2008). Ce sont des invaginations de la membrane plasmique (50 - 100 nm) qui sont observables en microscopie électronique (Couet et al., 2001; Razani and Lisanti, 2002) (Figure 8).



Figure 8 : Vue en microscopie électronique de cavéoles adipocytaires (Parton and Simons, 2007)

En plus d'une composition riche en cholestérol et en sphingolipides, elles contiennent une protéine, la cavéoline-1 qui pourrait être impliquée dans leur formation à partir des radeaux lipidiques (Murray and Granner, 2008) (Figure 9). Les cavéoles seraient présentes dans la plupart des types cellulaires. Elles sont particulièrement abondantes dans les adipocytes, les fibroblastes, les pneumocytes de type I, les cellules endothéliales et épithéliales de même que dans les cellules musculaires lisses et striées. De nombreux travaux ont démontré l'importance des cavéoles en tant que structures spécialisées dans la signalisation cellulaire (Couet et al., 2001). Les protéines détectées dans les cavéoles comportent divers constituants de systèmes de transduction de signaux (par exemple le récepteur de l'insuline et certaines protéines G, le récepteur du folate et la synthase endothéliale de l'oxyde nitrique (eNOS)) (Murray and Granner, 2008).

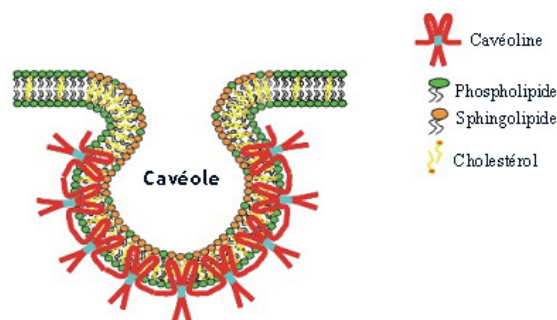


Figure 9 : Représentation d'une cavéole (Razani and Lisanti, 2002)

1.2 Modèles membranaires ou membranes artificielles

Les modèles membranaires consistant en une bicouche lipidique ont été introduits il y a une quarantaine d'années (Papahadjopoulos and Kimelberg, 1973). Les modèles expérimentaux de biomembranes les plus utilisés sont les BLMs pour « Bilayer Lipid Membranes » et surtout les liposomes (Ottova and Tien, 1997) qui seront décrits dans ce chapitre. Ils peuvent être notamment utilisés pour l'étude des propriétés pharmacologiques de diverses substances actives (Papahadjopoulos and Kimelberg, 1973). Des assemblages encore plus simples, consistant en des monocouches de lipides à l'interface air-eau, sont également souvent utilisés comme modèles membranaires (Zepik et al., 2008). La Figure 10 décrit les trois types de membranes artificielles qui viennent d'être évoqués.

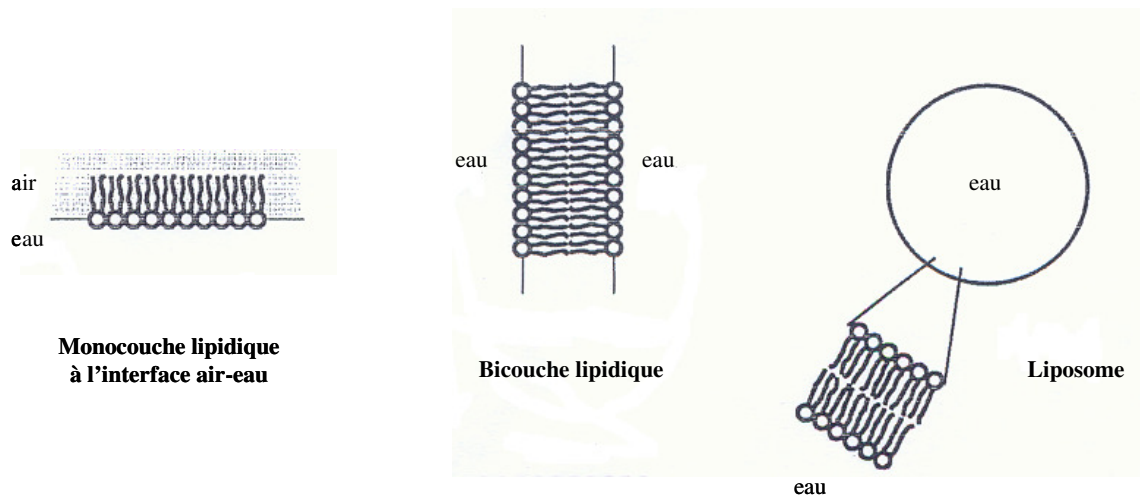


Figure 10 : Représentations schématiques de trois types de modèles membranaires (Zepik et al., 2008)

1.2.1 Structure et composition des liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques organisées entre des compartiments aqueux (Lorin et al., 2004) (Figure 11).

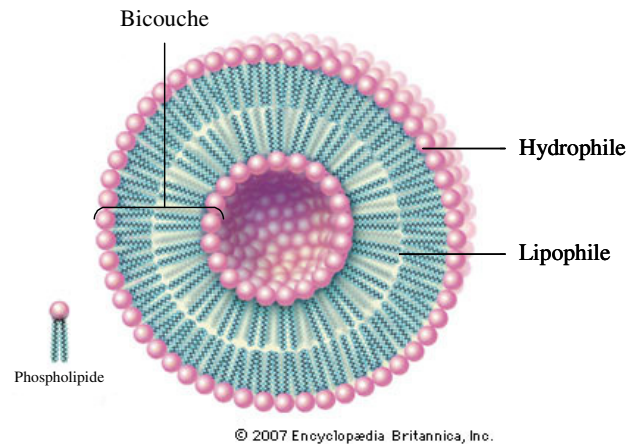


Figure 11 : Structure d'un liposome unilamellaire

Ils peuvent être formés à partir de divers phospholipides avec ou sans cholestérol. Ce sont le plus souvent des phosphatidylcholines (PC) (Figure 1) naturelles (jaune d'œuf ou soja) ou synthétiques (dimyristoyl PC, dipalmitoyl PC, distéaroyl PC) qui sont utilisées ainsi que d'autres phospholipides comme les sphingomyélines (Dousset and Douste-Blazy, 1985).

A ces lipides sont parfois ajoutés des composés chargés, par exemple cationiques comme la stéarylamine, entraînant l'apparition d'une répulsion électrostatique capable d'éviter la sédimentation des liposomes (Dousset and Douste-Blazy, 1985; Piel et al., 2006).

1.2.2 Classification des liposomes

Les liposomes sont souvent classés en fonction de leur taille et du nombre de leurs bicouches (Figure 12). On distingue généralement des liposomes multilamellaires (MLV pour « MultiLamellar Vesicles ») et unilamellaires (SUV, LUV, GUV pour « Small, Large et Giant UniLamellar Vesicles » respectivement) (Rosilio, 2004; Lorin et al., 2004). Les vésicules oligolamellaires (OLV pour « OligoLamellar Vesicles ») seraient constituées d'un nombre de bicouches moins important par rapport aux MLV. Des vésicules multivésiculaires (MVB pour « MultiVesicular Vesicles ») sont également décrites (Jain et al., 2005; Jain et al., 2007).

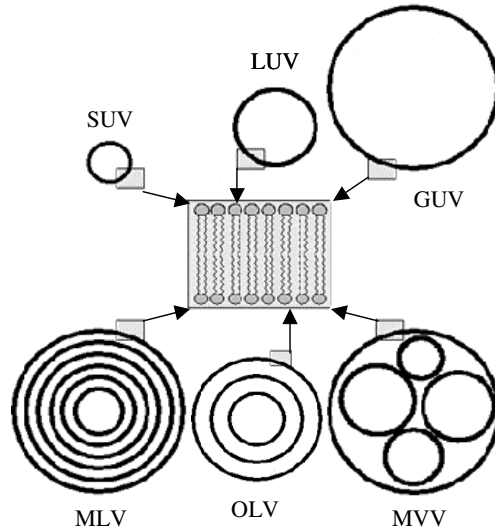


Figure 12 : Classification des liposomes selon leur structure (adapté de http://www.scf-online.com/german/25_d/25_d_dr/galenik_25_d_dr.htm) (Barenholz and Crommelin, 1994)

On peut également les classer selon leur mode d'obtention (Dousset and Douste-Blazy, 1985). Ainsi, les DRV (pour « Dehydration-Rehydration Vesicles ») sont obtenues à partir de vésicules préformées (telles que des SUV) déshydratées généralement par lyophilisation puis réhydratées (Lasch et al., 2003). On obtient ainsi essentiellement des liposomes oligo et multilamellaires (Kirby and Gregoriadis, 1984).

1.2.3 Préparation des liposomes

Le procédé d'obtention des MLV le plus simple et le plus répandu est la méthode dite « d'hydratation du film lipidique » (Sharma and Sharma, 1997) (Figure 13). Les lipides en solution organique (chloroformique par exemple) sont déposés sous forme d'un film mince sur les parois d'un récipient par évaporation du solvant. Afin d'hydrater les lipides, la solution aqueuse tamponnée est ajoutée à une température qui doit être la température de transition de phase du lipide (T_c) ou la T_c la plus élevée s'il s'agit d'un mélange de lipides. La dispersion du lipide est facilitée par passage de la préparation au vortex et/ou par addition de quelques billes de verre (Dousset and Douste-Blazy, 1985). La suspension de liposomes obtenue est constituée de vésicules multilamellaires. Différentes méthodes peuvent alors être utilisées pour obtenir des liposomes unilamellaires telles que l'utilisation d'ultra-sons (sonication) ou la technique d'extrusion (Figure 13).

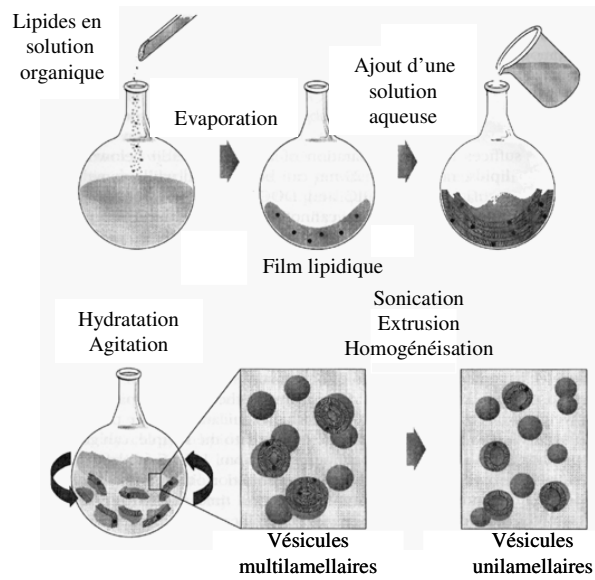


Figure 13 : Préparation de liposomes par la technique d'hydratation du film lipidique (Lasic, 1997)

Grâce à l'utilisation d'un extrudeur, on force le passage de la dispersion sous forte pression d'azote à travers une membrane en polycarbonate de porosité définie. Cette opération permet d'obtenir des particules de taille proche de celles des pores (Olson et al., 1979).

1.2.4 Caractérisation des liposomes

Les liposomes peuvent être caractérisés par une mesure de la distribution de leur taille. La méthode utilisée dans ce travail est la spectroscopie de corrélation de photon (PCS). Elle est basée sur l'analyse des fluctuations d'intensité de la lumière diffusée par les particules d'une suspension traversée par un rayon laser. Les fluctuations du signal lumineux, dues au mouvement brownien des particules, sont détectées par un système optique muni d'un photomultiplicateur. Un traitement mathématique selon des théories établies permet alors la conversion en distribution de taille (Zuidam et al., 2003).

1.2.5 Mesure de l'intégrité membranaire des liposomes

L'encapsulation d'un marqueur fluorescent ou radioactif dans des liposomes et la détermination du pourcentage libéré dans le milieu environnant, peuvent être mises à profit pour évaluer la perméabilité membranaire.

La calcéine ou la carboxyfluorescéine sont deux marqueurs fluorescents qui ont la propriété d'émettre peu de fluorescence quand ils sont concentrés (« self-quenching »). La perméabilité de liposomes encapsulant ces molécules en concentration adéquate peut être déterminée. En effet, la fluorescence est minimale lorsque ces fluorophores sont concentrés dans la cavité aqueuse des liposomes. Leur libération dans le milieu extérieur conduit à une augmentation de la fluorescence mesurable par fluorimétrie (Düzgüneş et al., 2003).

1.2.6 Applications des liposomes

1.2.6.1 Modèles membranaires

Les vésicules lipidiques (unilamellaires) ont une structure qui se rapproche de celle des cellules biologiques puisque la bicouche délimite un compartiment aqueux, modèle néanmoins très simplifié du cytoplasme. Les membranes modèles peuvent être préparées à partir de phospholipides d'un seul type ou de mélanges de plusieurs lipides (Zepik et al., 2008). Dans une étude récente, les auteurs ont même utilisé un mélange ternaire de lipides contenant la dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC), du cholestérol et de la sphingomyéline (SM) de cerveau de bœuf, dans le but de mimer au mieux la composition lipidique d'une membrane cellulaire (Beseničar et al., 2008).

Les liposomes ont permis d'étudier les propriétés de perméabilité des bicouches lipidiques en déterminant la fuite de petites molécules incluses dans le compartiment aqueux. De nombreux travaux sur l'interaction de diverses molécules actives de tailles variables, comme des oligomères et des peptides par exemple, avec des vésicules ont été réalisés (Papahadjopoulos and Kimelberg, 1973). Plus récemment, des recherches utilisant des liposomes pour l'étude des interactions de substances toxiques ont été publiées (Zepik et al., 2008). On comprend donc l'intérêt des liposomes pour prédire l'effet de ces dernières au niveau cellulaire.

Les liposomes ont également été utilisés dans le but d'investiguer le mode d'action de promoteurs de pénétration cutanée. Bien qu'initialement des vésicules ne comprenant que la dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) aient été utilisées, des liposomes contenant des

INTRODUCTION

lipides constitutifs du stratum corneum (SC) ont été préparés. Ainsi, des « Stratum Corneum Liposomes » (SCL) ont été obtenus à partir d'un mélange lipidique contenant des céramides épidermiques (40%), du cholestérol (25%), de l'acide palmitique (25%) et du cholestéryl sulfate (10%). D'autres travaux visant à étudier l'effet des radiations UV sur la peau ou l'effet antioxydant de substances à administration topique, ont utilisé comme modèles des liposomes préparés à partir d'acide linoléique, de DPPC, de cholestérol et de céramides. Des SCL ont aussi été utilisés pour étudier le mécanisme d'action de vésicules phospholipidiques employées comme systèmes de délivrance de médicaments. Enfin, des « protéoliposomes » ont été préparés à partir de mélanges de lipides et de protéines extraits de SC de porc afin de servir de modèles pour l'étude de l'interaction de surfactants avec la peau (Wertz et al., 1986; Lopez et al., 1996; Maghraby et al., 2008).

Une nouvelle approche de « screening » *in vitro* visant à étudier l'absorption de substances actives destinées à l'administration orale a été développée en utilisant des liposomes déposés dans les pores et à la surface d'un filtre (Flaten et al., 2006).

Les GUV, ces vésicules « géantes » de tailles similaires à celles des cellules (0,5 - 100 μm) et présentant les propriétés de base des membranes biologiques peuvent constituer des modèles simples pour comprendre les propriétés des membranes cellulaires telles que le transport, la fusion ou la résistance mécanique (Campillo et al., 2009). La coexistence de domaines, ayant des propriétés proches de celles de radeaux lipidiques, et de régions lipidiques fluides a été mise en évidence dans des GUV formées à partir de phospholipides, de cholestérol et de SM, voire de lipides naturels extraits de la bordure en brosse des cellules du tissu cortical rénal (riche en SM et cholestérol) (Dietrich et al., 2001). En associant de la DOPC avec du cholestérol et de la SM dans des GUV, on cumulerait les avantages de simuler la présence de radeaux lipidiques avec une taille et une courbure similaires à celles des membranes plasmiques (Bacia et al., 2004; Bacia et al., 2005).

1.2.6.2 Applications thérapeutiques

Les liposomes ont fait l'objet de très nombreuses études quant à leur application dans le domaine pharmaceutique, notamment pour la vectorisation d'anti-infectieux (Ambisome[®] : amphotéricine B), d'anticancéreux (Caelyx[®], Myocet[®] : doxorubicine ; Depocyte[®] : cytarabine), d'hormones et plus récemment d'acides nucléiques. Des liposomes sont également utilisés comme adjuvants dans certains vaccins. Cependant, s'ils ont été largement

INTRODUCTION

commercialisés dans le domaine cosmétique, il font toujours l'objet de nombreuses recherches en sciences pharmaceutiques (Schuber et al., 1998; Rosilio, 2004; C.B.I.P., 2009). Etant donné leur structure et leur composition similaires à celles des membranes cellulaires, les liposomes sont des candidats intéressants comme systèmes de délivrance des médicaments (Lasic, 1998). En effet, ils sont constitués de molécules lipidiques relativement non toxiques, biocompatibles et biodégradables (Sharma and Sharma, 1997) et sont capables d'encapsuler des molécules hydrophiles dans leur compartiment aqueux, des molécules lipophiles dans leur bicouche lipidique ainsi que des molécules amphiphiles. Il s'agit de véhicules intéressants pour la formulation d'un bon nombre de substances actives insolubles dans l'eau (Sharma and Sharma, 1997; Singh et al., 2002). En outre, l'encapsulation de principes actifs dans des liposomes permet de les protéger, d'envisager l'administration de doses moins élevées (donc de diminuer leur toxicité) et sous certaines conditions de les diriger vers des cibles spécifiques (vectorisation). Notons également que la diminution de la toxicité de certains principes actifs pourrait résulter de la faible capture des liposomes dans des tissus tels que le cœur, le cerveau, les reins et dans le tractus gastro-intestinal (Sharma and Sharma, 1997; Lasic, 1998). Les liposomes font partie de la nouvelle génération de formes galéniques qui favorisent la délivrance de certains principes actifs dont le faible indice thérapeutique, le manque de spécificité, les effets indésirables, la fragilité et l'accessibilité difficile au site d'action rendent l'administration délicate (Rosilio, 2004).

Les liposomes peuvent être administrés par voie pulmonaire, topique ou parentérale (intraveineuse notamment) et selon la voie d'administration, différents types de formulations peuvent être envisagées : suspensions, aérosols, formes semi-solides ou poudres sèches (Lasic, 1998).

La voie intraveineuse semble la plus prometteuse (Lasic, 1998). Cependant, les liposomes sont reconnus comme des particules étrangères par les cellules du système des phagocytes mononucléés (MPS), principalement les macrophages fixes du foie (cellules de Kupffer) et de la rate et par conséquent, ils sont endocytés (Lasic, 1998; Rosilio, 2004). Ceci n'est intéressant que si l'on désire cibler ces cellules (Lasic, 1998). Des liposomes stabilisés stériquement avec des temps de circulation dans le sang prolongés (liposomes pégylés dits «furtifs») ont été développés. Le ciblage actif de cellules tumorales par exemple peut être accompli en couplant des ligands ou anticorps spécifiques aux lipides (Sharma and Sharma, 1997; Lasic, 1998). Notons qu'un ciblage passif basé sur l'effet «EPR» («Enhanced Permeability and Retention») peut également être envisagé (Maeda et al., 2009). Cet effet repose sur le phénomène d'augmentation de l'extravasation de macromolécules à partir des

INTRODUCTION

vaisseaux sanguins des tumeurs et de leur rétention dans les tissus tumoraux, ce qui n'est pas observé en condition non pathologique. Ceci permettrait d'éviter les coûts importants du ciblage actif.

L'administration par voie topique est également largement étudiée (Kaur et al., 2004; de Leeuw et al., 2009). En ce qui concerne l'application dermique, les liposomes peuvent avoir différents effets. Ils peuvent tout d'abord avoir un effet local. Certains liposomes seraient utilisés pour leur aptitude à cibler les annexes cutanées, particulièrement les unités pilo-sébacées (follicules pileux et glandes sébacées). Bien que des effets transdermiques ne soient que rarement décrits, certains types de liposomes (vésicules ultradéformables) pourraient pénétrer intacts dans les couches profondes de la peau et ainsi atteindre la circulation systémique (Maghraby et al., 2008).

Des liposomes cationiques sont utilisés dans la formulation de lipoplexes (interaction électrostatique des lipides cationiques constitutifs avec des molécules polyanioniques). Ils sont notamment intéressants en thérapie génique pour l'introduction d'acides nucléiques à l'intérieur des cellules par endocytose principalement. La transfection optimale de complexes acides nucléiques/liposomes cationiques est obtenue pour des ratios acides nucléiques⁻/lipides⁺ de 0,2 à 0,5 correspondant à un excès de lipides cationiques (Barenholz, 2001). Cet excès de charges positives favorise l'interaction avec les membranes cellulaires chargées négativement. L'administration de petits ARN interférants (siRNA) via l'utilisation de liposomes cationiques, fait actuellement l'objet de recherches prometteuses sur le plan thérapeutique (Ichim et al., 2004; Sato et al., 2007; Geusens et al., 2009).

Des formulations de liposomes « pH-sensibles » (PSL pour « pH-Sensitive Liposomes ») peuvent être réalisées à l'aide de lipides sensibles au pH notamment et ce, dans le but d'améliorer la délivrance des substances actives dans le cytosol (Peschka-Süss and Schubert, 2003). L'objectif poursuivi est de favoriser la libération à partir de l'endosome et d'éviter la dégradation des molécules encapsulées, puisqu'à partir d'une valeur critique du pH se situant aux alentours de 5,5 les liposomes deviennent fusogènes, ce qui favorise la fusion avec la membrane de l'endosome.

2 Les cyclodextrines

2.1 Structure et propriétés

2.1.1 Cyclodextrines naturelles

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon. Les trois cyclodextrines naturelles les plus courantes se composent de 6, 7 ou 8 unités α -D-glucopyranose en configuration chaise reliées entre elles par des liaisons α -1,4. Elles sont dénommées respectivement α -, β - ou γ -cyclodextrine. Leur structure en trois dimensions apparaît sous la forme d'un cône tronqué à l'extérieur duquel se trouvent les groupements hydroxyles. La partie extérieure est donc hautement hydrophile. Les hydroxyles secondaires portés par les carbones C₂ et C₃ se situent sur le côté le plus large du cône appelé face secondaire tandis que les hydroxyles primaires en C₆ se trouvent du côté le plus étroit (face primaire) (Figure 14). La libre rotation des hydroxyles primaires diminue le diamètre effectif de la cavité du côté où ils se trouvent alors que les hydroxyles secondaires sont en position plus figée. L'intérieur de la cavité est constituée par des atomes d'hydrogène portés par les carbones C₃ et C₅ ainsi que par les atomes d'oxygène participant à la liaison glycosidique ce qui lui confère un caractère apolaire (Szejtli, 1988; Frömming and Szejtli, 1994; Armspach et al., 1999).

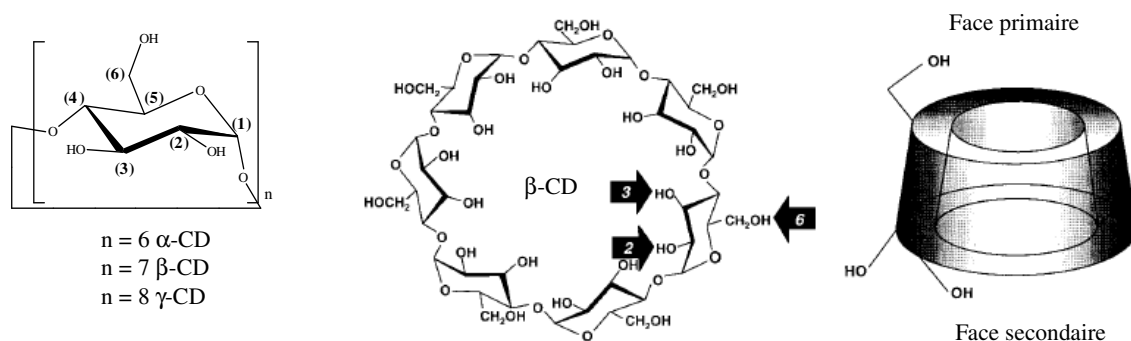


Figure 14 : Représentations de la structure chimique des cyclodextrines naturelles (Uekama et al., 1998; Armspach et al., 1999)

INTRODUCTION

Quelques caractéristiques des cyclodextrines naturelles (α -, β - et γ -CD) sont reprises dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des cyclodextrines naturelles
(Challa et al., 2005; Cal and Centkowska, 2008)

Cyclodextrine	Diamètre de la cavité centrale (Å)	Masse moléculaire	Solubilité aqueuse à 25°C (g/100 ml)	% m/m d'eau de cristallisation
α -CD	4,7 - 5,3	972	14,5	10,2
β -CD	6,0 - 6,5	1135	1,85	13,2 – 14,5
γ -CD	7,5 - 8,3	1297	23,2	8,13 – 17,7

Le diamètre de la cavité et la masse moléculaire augmentent avec le nombre d'unités glucopyranose constitutives. Bien que toutes les cyclodextrines soient solubles en milieu aqueux, leur solubilité dans l'eau augmente dans le sens : β - < α - < γ -CD. Les cyclodextrines se trouvent sous forme hydratée à l'état solide. La teneur en eau à l'équilibre dépend des conditions de cristallisation et de la nature de la cyclodextrine.

2.1.2 Dérivés de synthèse

De nombreux dérivés de cyclodextrines sont décrits dans la littérature (Szente and Szejtli, 1999). Ceux-ci sont synthétisés par greffage de différents groupements sur les fonctions alcooliques des cyclodextrines naturelles. Cependant, ces dernières présentant de nombreux hydroxyles réactionnels (respectivement 18, 21 et 24) et la différence de réactivité entre ces sites étant faible (les hydroxyles primaires sont légèrement plus réactionnels que les secondaires), une substitution sélective n'est pas aisée à réaliser. Les produits commercialisés seront donc fréquemment composés d'un mélange de substances. Le système se complique si le radical greffé présente également une fonction réactionnelle. Les cyclodextrines modifiées fréquemment rencontrées dans le domaine pharmaceutique sont les hydroxypropyl- (HP-), sulfobutyléther (SBE-) et méthyl-cyclodextrines (Mosher and Thompson, 2000). La structure générale de dérivés de la β -CD est représentée à la Figure 15.

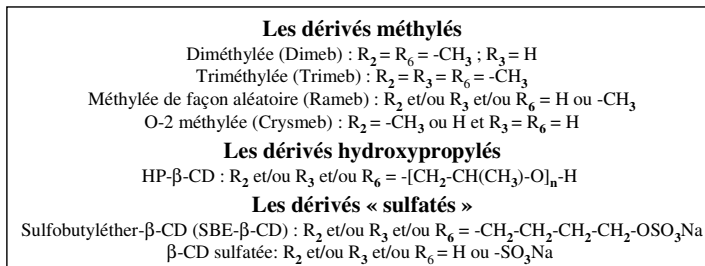
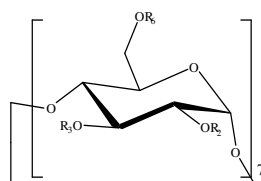


Figure 15 : Structures chimiques de dérivés de la β -CD (adapté de Bertholet, 2005)

Les cyclodextrines modifiées sont le plus généralement caractérisées par leur degré de substitution moyen (D.S.), c'est-à-dire par le nombre moyen d'hydroxyles substitués par unité glucopyranose (de 0 à 3) (Szente and Szejtli, 1999) (Tableau 2). Par conséquent, le D.S. pourra varier d'un lot à l'autre ce qui aura aussi pour incidence de faire varier les masses moléculaires.

Tableau 2 : Caractéristiques de cyclodextrines modifiées

Cyclodextrine	D.S.	Masse moléculaire	Solubilité aqueuse à 25°C (g/100 ml)
Dimeb	2	1331	57 ^a
Trimeb	3	1429	31 ^a
Rameb	1,8	1312	> 50 ^b
Crysmeb	0,57	1191	22 ^c
HP- β -CD	0,65	1400	> 60 ^b
SBE- β -CD	0,9	2163	> 50 ^b
HP- γ -CD	0,6	1576	> 50 ^b

^a(Mosher and Thompson, 2000), ^b(Loftsson and Duchêne, 2007), ^c(Roquette Frères, 2006)

L'un des buts poursuivis par la substitution, même par des substituants hydrophobes comme des groupements méthoxy, est de synthétiser des composés dont la solubilité aqueuse (Tableau 2) est supérieure à celle des composés parents (surtout la β -CD) (Loftsson and Duchêne, 2007) (Tableau 1). Dans le cas de la β -CD, l'augmentation du degré de méthylation favorise la solubilisation jusqu'à ce que 2/3 de tous les groupements hydroxyles soient substitués, au-delà, elle diminue (Frömming and Szejtli, 1994). Dans le cadre de cette thèse, nous utiliserons un dérivé méthylé de la β -CD dédié à la culture cellulaire et commercialisé sous le nom « methyl- β -cyclodextrin » (M β -CD) (D.S. = 1,9).

2.2 Complexes

2.2.1 Formation de complexes

Etant donné leur structure particulière et la dualité de leur polarité, les cyclodextrines sont capables d'augmenter la solubilité aqueuse de composés en formant des complexes d'inclusion. Possédant une cavité plutôt hydrophobe, elles peuvent encapsuler des substances ou des parties de molécules à caractère lipophile (Brewster and Loftsson, 2007). Des complexes de stoechiométries diverses peuvent être formés (Figure 16). On parle de complexe 1:1 lorsqu'une molécule invitée interagit avec une molécule de cyclodextrine. Un complexe 1:2 voire 1:3 est formé si la molécule invitée est de grande taille et si plusieurs molécules de cyclodextrines peuvent interagir avec elle. Par contre, un rapport 2:1 est obtenu dans le cas où la cavité de la cyclodextrine est suffisamment spacieuse pour accueillir deux molécules. La taille de la cavité et de la molécule invitée jouent donc un rôle important dans le processus de complexation (Szejtli, 1988).

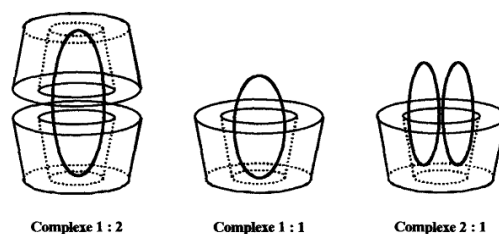


Figure 16 : Représentations schématiques de complexes d'inclusion de stoechiométries différentes (Barillaro, 2006)

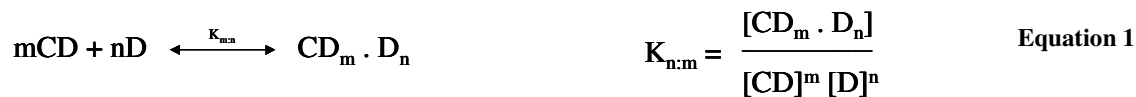
Outre la taille, des facteurs tels que l'encombrement stérique, la charge et la polarité de la molécule invitée sont importants pour la formation de complexes d'inclusion. Il existe une corrélation directe entre le caractère hydrophobe de la molécule ou de certaines parties de celle-ci et la stabilité du complexe formé (Szejtli, 1988).

Aucun lien covalent n'est formé ou rompu durant la complexation. La principale force provoquant la formation des complexes est la stabilisation énergétique du système par le remplacement dans la cavité, des molécules d'eau à haute enthalpie par des molécules hydrophobes qui créent des associations apolaires-apolaires (Del Valle, 2004).

Ce processus réversible (les molécules complexées sont en équilibre avec les molécules libres en solution) peut être quantifié par une constante d'équilibre appelée constante de stabilité (K_c

INTRODUCTION

ou $K_{n:m}$) (Loftsson et al., 2005; Brewster and Loftsson, 2007). L'équation générale d'équilibre peut s'écrire :



La technique la plus simple d'obtention de complexes d'inclusion et qui sera celle utilisée dans cette thèse se réalise en solution par simple contact d'une solution aqueuse de cyclodextrine avec la molécule à inclure (Szejtli, 1988).

Des travaux récents (Loftsson et al., 2004) semblent montrer que les complexes d'inclusion sont une explication simplifiée d'un phénomène beaucoup plus compliqué. Les cyclodextrines seraient capables de former deux types de complexes (d'inclusion et de « non-inclusion »). Les groupements hydroxyles présents sur leur surface externe peuvent former des liaisons hydrogènes avec d'autres molécules ce qui les rend capables, à l'instar d'oligosaccharides non-cycliques et de polysaccharides, de former des complexes avec des substances lipophiles insolubles dans l'eau (Loftsson and Duchêne, 2007). De plus, les cyclodextrines et leurs complexes pourraient former en solution aqueuse des agrégats solubles capables de solubiliser les molécules lipophiles insolubles par une structure ressemblant à celle des micelles (Loftsson et al., 2004).

2.2.2 Etude des complexes

Les analyses effectuées afin de mettre en évidence l'existence d'un complexe d'inclusion en solution, se basent sur les modifications des caractéristiques physico-chimiques de la substance complexée. En théorie, toute méthode qui permettrait de mettre en évidence des changements au niveau par exemple, de la solubilité, de la rétention en chromatographie liquide, de l'absorbance dans l'UV-visible, de la fluorescence ou des déplacements chimiques en résonance magnétique nucléaire, peut être employée pour l'étude des complexes (Loftsson et al., 2005). Les principes de deux méthodes courantes utilisées dans ce travail, à savoir les diagrammes de solubilité et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, seront exposés dans ce chapitre (Piel et al., 2004).

INTRODUCTION

A côté des méthodes d'analyses expérimentales, des méthodes théoriques (modélisation moléculaire) se basant sur des modèles mathématiques peuvent être utilisées (Piel et al., 2001).

2.2.2.1 Diagrammes de solubilité

Les diagrammes de solubilité ou isothermes de solubilité sont réalisés en plaçant un excès de substance en présence de solutions aqueuses de cyclodextrines de concentrations croissantes, à une température donnée. Après un temps d'agitation nécessaire pour atteindre l'équilibre de la complexation (de plusieurs heures à plusieurs jours), on détermine la quantité de substance solubilisée par une méthode de dosage appropriée. Un diagramme de solubilité est alors réalisé en reportant sur un graphique la concentration molaire du soluté sur l'axe vertical et la concentration molaire en agent complexant sur l'axe horizontal. Higuchi et Connors (Higuchi and Connors, 1965) ont classé les différents types de diagrammes caractérisant les interactions substrat-ligand, auxquelles peuvent être assimilées les interactions cyclodextrine-molécule invitée (Figure 17).

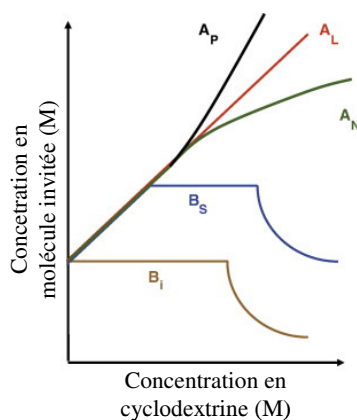


Figure 17 : Types de diagrammes de solubilité selon la classification de Higuchi et Connors (Brewster and Loftsson, 2007b)

Le type A est obtenu quand la solubilité apparente de la substance augmente avec des concentrations croissantes en cyclodextrine (Brewster and Loftsson, 2007b). Les profils A_L (linéaires) sont généralement attribués à la formation de complexes 1:1. Un diagramme de type A_P traduit la formation simultanée de complexes de stoechiométries différentes (1:1 à l'origine, puis 1:2 ou 1:3, ...).

INTRODUCTION

Un profil A_N peut être difficile à interpréter. La chute de solubilité par rapport au profil linéaire peut être liée à des modifications de la solubilité du complexe, de la constante diélectrique du milieu ou à l'association de molécules de cyclodextrines entre elles (Loftsson et al., 2005).

Le type B indique la formation d'un complexe à solubilité limitée dans le milieu (Brewster and Loftsson, 2007b) :

- le profil B_S suit au départ le profil A_L puis à partir d'un point particulier, tout ajout de cyclodextrine entraîne une précipitation du complexe avec l'apparition d'un plateau (au fur et à mesure que le complexe précipite, le principe actif non encore dissous se solubilise sous forme libre) ; la courbe décroît ensuite (tout l'excès de principe actif est dissous et cette fraction libre dissoute est progressivement complexée et précipitée) ;
- la courbe B_I peut être interprétée de la même manière mais dans ce cas, le complexe est tellement insoluble que l'augmentation initiale de solubilité ne peut être détectée.

2.2.2.2 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique permettant d'étudier les noyaux atomiques possédant des propriétés magnétiques (*spin-actifs*) dans un champ magnétique extérieur puissant (^1H , ^{13}C , ...). Etant donné que l'environnement électronique des noyaux influence le champ magnétique perçu par ces noyaux, et que cet environnement électronique est influencé par les liaisons chimiques dans lesquelles sont impliqués ces noyaux, il est possible de mettre en évidence "l'environnement chimique" des noyaux étudiés ("déplacement chimique"). Cette technique est largement utilisée pour la déduction des structures des composés (Vollhardt and Schore, 1995).

L'inclusion d'une molécule dans la cavité d'une cyclodextrine est caractérisée par des variations des déplacements chimiques des protons situés à l'intérieur de cette cavité (H-3 et H-5). Ces déplacements pouvant être observés en RMN ^1H , cette technique est utilisée pour l'étude des interactions de substances avec les cyclodextrines (Piel et al., 2004).

Les techniques RMN à deux dimensions sont également souvent employées pour détecter la formation des complexes. La technique ROESY (pour Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy) qui met en évidence la proximité spatiale des protons sera utilisée dans cette thèse (Schneider et al., 1998; Barillaro et al., 2008).

2.2.2.3 Modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire va permettre de calculer de façon théorique les conformations les plus favorables énergétiquement pour la formation des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines. Dans le cadre de notre travail, la mécanique quantique a été utilisée. L'objectif de la mécanique quantique est de décrire les interactions entre les électrons et les noyaux dans l'espace. Le domaine de probabilité de trouver les électrons autour des atomes est souvent associé aux orbitales atomiques. La méthode LCAO, pour « Linear Combination of Atomic Orbitals », consiste en la recherche d'orbitales moléculaires orthogonales entre elles combinant les orbitales atomiques de façon à obtenir l'énergie minimale du système à une position fixe des noyaux. Un système moléculaire constitué de N atomes peut être décrit par $3N-6$ degrés de liberté. Les calculs deviennent rapidement très complexes pour des molécules de taille importante puisqu'ils concernent les interactions entre tous les domaines de probabilité de trouver tous les électrons autour de chaque atome (Henry de Hassonville, 2004). Depuis les solutions algébriques proposées par Roothaan en 1951, un grand nombre de méthodes ont été développées en vue de rendre les calculs réalisables à l'échelle de molécules incluant jusqu'à 300 atomes (Piel, 2000). Un niveau d'approximation utilisé dans ce travail, est la méthode semi-empirique au niveau AM1 proposée par Dewar, qui ne tient compte que des orbitales atomiques de valence et applique différentes approximations dans le calcul des intégrales biélectroniques (Dewar et al., 1985). La méthodologie *ab initio* Hartree-Fock quant à elle résout l'équation de Roothaan avec une base qui peut être minimale ou étendue (double, triple ... ζ) sans approximation et en utilisant des fonctions non orthogonales (Dive et al., 1993). La base MINI-1 a notamment été utilisée dans notre travail. Ce qui caractérise le niveau *ab initio*, c'est la qualité de la géométrie calculée qui est souvent en bonne adéquation avec les données expérimentales et qui permet l'estimation d'énergies d'interaction fiables (Jensen, 1999). Une autre approche a consisté à utiliser une base double ζ avec des fonctions de polarisation supplémentaires comme la base 6-31G(d) (Hariharan and Pople, 1973) et une fonction d'énergie dérivée de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) comme B3LYP. Quelle que soit la méthode de calcul utilisée, l'optimisation de la géométrie a pour but de trouver la meilleure position à l'équilibre des noyaux les uns par rapport aux autres. Dans ce cadre, la dérivée première de la fonction d'énergie doit être annulée par rapport à tous les degrés de liberté du système étudié. La nature de l'extremum trouvé et les grandeurs thermodynamiques sont accessibles grâce au calcul de la dérivée seconde de la fonction

d'énergie. Dans un minimum énergétique, la matrice des constantes de forces ne doit présenter que des courbures positives (Piel, 2000).

2.3 Applications

2.3.1 Domaine pharmaceutique

Les cyclodextrines sont des molécules intéressantes pour la formulation de médicaments, c'est pourquoi elles sont couramment utilisées dans le domaine de la technologie pharmaceutique. Les principales applications de ces excipients résident dans leur capacité à solubiliser des substances actives peu solubles en milieu aqueux et à améliorer potentiellement la biodisponibilité de molécules hydrophobes. Elles permettent parfois d'augmenter la stabilité, de diminuer la perception du mauvais goût voire les effets indésirables de certains principes actifs. De nombreux complexes à base de cyclodextrines ont été étudiés en solution ou à l'état solide pour être délivrés par différentes voies d'administration (Uekama et al., 1998; Singh et al., 2002; Challa et al., 2005). Certaines de ces « associations » sont disponibles sur le marché pharmaceutique (Loftsson and Duchêne, 2007).

A côté des applications « classiques » pour lesquelles elles sont généralement utilisées, les cyclodextrines font l'objet d'études concernant des applications plus innovantes.

Des complexes avec les cyclodextrines sont souvent utilisés dans des micro- ou nanosphères polymériques, de même que dans la formulation de vésicules lipidiques comme les liposomes afin d'augmenter les quantités de principe actif encapsulées (Singh et al., 2002). Dans ce dernier cas, le complexe hydrophile s'accumule dans la partie aqueuse des liposomes. On parle du concept de « drugs-in-cyclodextrin-in-liposome ». La stabilité des vésicules lipidiques dépendra de l'affinité des cyclodextrines pour la substance active qui devrait idéalement être plus importante que l'affinité pour les lipides constitutifs (Piel et al., 2006).

L'interaction des cyclodextrines avec les lipides peut être mise à profit pour la formulation des systèmes dispersés. L'intérêt des cyclodextrines a été démontré dans la stabilisation d'émulsions (Duchêne et al., 2003; Trichard et al., 2006). Dans le cas d'émulsions hydrophiles (H/E : huile dans l'eau) à base d'huile de soja par exemple, la stabilisation est probablement la conséquence de la formation d'un complexe d'inclusion cyclodextrine-triglycéride à l'interface huile/eau (Shimada et al., 1992).

INTRODUCTION

Un nouveau système dispersé se présentant sous forme de billes semi-solides (de 0,3 à 8 mm) composées de cyclodextrines et d'huile a été développé récemment. Le procédé de fabrication est relativement simple et doux puisqu'elles sont obtenues à partir d'un mélange de cyclodextrines naturelles (α - ou γ -CD), d'eau et d'huile (huiles végétales, minérales ou de silicone) soumis à une agitation orbitale et continue de plusieurs jours à température inférieure à 30 °C (Trichard et al., 2008). Les billes peuvent ensuite être lyophilisées. Un premier type de billes a été obtenu en utilisant l' α -CD et l'huile de soja comme huile végétale (Bochot et al., 2007). Ce type de formulation présente des potentialités intéressantes pour l'encapsulation de principes actifs lipophiles. Des études ont montré que ces billes libèrent efficacement des principes actifs aussi bien après administration orale que cutanée et qu'elles sont bien tolérées par la peau (Trichard et al., 2007; Trichard et al., 2008).

Par ailleurs, les cyclodextrines sont utilisées comme promoteurs de pénétration (Hovgaard and Brondsted, 1995; Matilainen et al., 2008). L'altération des propriétés de barrière des membranes biologiques par des dérivés méthylés s'expliquerait par l'extraction de composés lipidiques ou par leur fluidification, ce qui favoriserait le passage de substances actives (Loftsson et al., 2007). Leur mécanisme d'action comme promoteurs d'absorption (au travers de l'épithélium respiratoire par exemple) pourrait également s'expliquer par leur capacité à ouvrir ou perturber transitoirement les jonctions serrées et donc le passage paracellulaire (Martin et al., 1998; Belhadj Salem et al., 2009).

2.3.2 Industrie alimentaire

Les cyclodextrines peuvent notamment être utilisées pour l'encapsulation des arômes (Szente and Szejtli, 2004). Ces composés volatils peuvent être encapsulés dans le but de limiter leur dégradation ou les pertes durant les étapes de fabrication et de stockage (protection contre l'oxydation, la lumière, la chaleur). L'utilisation de complexes d'inclusion cyclodextrines-arômes peut aussi permettre d'utiliser les arômes en quantité moindre (Astray et al., 2009).

On peut également utiliser des cyclodextrines pour enlever ou masquer des composés conférant une odeur ou un goût désagréable mais aussi pour enlever le cholestérol de produits d'origine animale comme les œufs et les produits laitiers. Ainsi, les caractéristiques nutritionnelles de nombreux produits laitiers comme le lait, la mayonnaise ou la crème, ont pu être améliorées via l'utilisation des propriétés complexantes de la β -CD (Del Valle, 2004; Szente and Szejtli, 2004; Astray et al., 2009). Par ailleurs, la production du beurre pauvre en

cholestérol présent sur la marché belge sous le nom Balade[®], implique l'utilisation de β -CD dans le procédé de fabrication (Szente and Szejtli, 2004 ; Comini and Mentink, 1991).

2.3.3 Applications diverses

Vu leurs propriétés, les cyclodextrines trouvent des applications non seulement dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire mais également en agriculture et dans l'industrie textile, cosmétique ou chimique. Elles peuvent être utilisées dans les méthodes séparatives (séparation d'isomères et d'énantiomères) et dans les réactions catalytiques vu leur faculté à mimer les enzymes (Schneiderman and Stalcup, 2000; Del Valle, 2004).

2.3.4 Biologie cellulaire

Etant donné leur affinité pour les molécules hydrophobes, les cyclodextrines sont utilisées pour moduler les taux de cholestérol membranaire au niveau cellulaire notamment (Kilsdonk et al., 1995; Christian et al., 1997; Zidovetzki and Levitan, 2007).

Par ailleurs, la méthyl- β -CD (M β -CD) est un outil très utile pour l'étude des microdomaines membranaires que sont les radeaux lipidiques et cavéoles. L'extraction du cholestérol par les cyclodextrines perturbant l'organisation de ces microdomaines et pouvant conduire à leur déstructuration, va interférer avec leur fonctionnalité (Ilangumaran and Hoessli, 1998).

De telles applications des cyclodextrines seront détaillées dans le chapitre suivant (paragraphe 3.2).

3 Interactions cyclodextrines-membranes

3.1 Membranes artificielles

3.1.1 Monocouches lipidiques

Des monocouches à l'interface air/eau constituées de lipides purs ou en mélange, ont été utilisées pour étudier leur interaction avec des cyclodextrines naturelles en solution dans la phase aqueuse (Asgharian et al., 1988; Ohvo and Slotte, 1996; Bernat et al., 2007; Grauby-Heywang and Turlet, 2008).

Dans l'étude d'Asgharian et al., les deux lécithines envisagées à savoir la dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) et la di- ω -cyclohexyl-DPPC n'ont pas montré d'interaction significative avec la β -CD alors que dans le cas du cholestérol, une interaction a été clairement démontrée.

Plus récemment, des mesures ont montré que la β -CD était capable de « désorber » la palmitoyl-oleyl phosphatidylcholine et la sphingomyéline à partir de monocouches alors que, dans le cas de la dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC), les résultats n'étaient pas modifiés significativement par comparaison aux essais sans cyclodextrine (Grauby-Heywang and Turlet, 2008).

La capacité de la β -CD à extraire le cholestérol de monocouches vers la phase aqueuse a été démontrée et comparée celle de l' α -CD pour laquelle aucun effet notable n'a pu être détecté (Ohvo and Slotte, 1996).

Cette cyclodextrine, dont la cavité semble trop petite pour inclure le cholestérol, peut néanmoins interagir avec des assemblages phospholipidiques particuliers puisque des mesures ont montré un appauvrissement d'une monocouche de DMPC en présence d' α -CD (Bernat et al., 2007).

L'extraction du cholestérol dans le cas de monocouches mixtes constituées de proportions équimolaires de cholestérol et de didecanoyl phosphatidylcholine (di-10-PC) a pu être observée. Concernant le di-10-PC, la faible « désorption » induite par la β -CD était trop lente pour influencer significativement les résultats. L'utilisation d'autres phospholipides, comme le DPPC ou la N-palmitoyl sphingomyéline, a conduit à des taux d'extraction insignifiants en

comparaison aux taux de cholestérol extraits, ceux-ci dépendant des compositions qualitatives et quantitatives en lipides (« désorption » beaucoup plus lente à partir de monocouches constituées de sphingomyéline par exemple) (Ohvo and Slotte, 1996).

On comprend que les interactions dépendront non seulement du type de cyclodextrine utilisé mais également de la composition des monocouches que l'on doit considérer comme des modèles très simplifiés des membranes biologiques.

3.1.2 Liposomes

L'interaction entre des solutions de cyclodextrines (α -CD, β -CDs, γ -CD) et des liposomes unilamellaires (SUV) constitués de DPPC a été étudiée en termes de stabilité physique (mesures des tailles particulières en fonction du temps d'incubation). L'affinité des cyclodextrines pour les liposomes a également été caractérisée par des « isothermes de liaison ». La quantité de cyclodextrine liée par mole de DPPC augmente dans le sens suivant : γ -CD < β -CD (< Dimeb) << α -CD. Les résultats obtenus sont en corrélation avec la diminution de stabilité physique des membranes (γ -CD < β -CD < α -CD) (Puskas et al., 2006). Des vésicules lipidiques (MLV) constituées de DPPC ou d'un mélange DPPC-cholestérol (10 mol%) ont été utilisées comme modèles biologiques pour l'étude par calorimétrie à balayage différentiel (DSC) des interactions avec des β -CDs (Puglisi et al., 1996). Dans le cas du premier type de vésicules, la présence de β -CD et d'HP- β -CD n'induit pas de modifications des paramètres thermodynamiques. Néanmoins avec la Dimeb, une réduction des valeurs de ΔH en fonction de la quantité de cette cyclodextrine a été observée, ce qui est probablement dû à sa capacité à complexer la DPPC. Dans le cas de la Trimeb, une interaction possible a pu être mise en évidence à une concentration relativement élevée. Concernant les liposomes contenant du cholestérol, les paramètres étudiés ne sont pas modifiés en présence d'HP- β -CD alors que des variations de ΔH ont été mesurées pour la Dimeb, la Trimeb et la β -CD, démontrant leur capacité à extraire le cholestérol.

Des mesures calorimétriques ont également été utilisées non seulement pour étudier l'appauvrissement en cholestérol de liposomes par complexation avec la M β -CD, mais aussi et à l'inverse son insertion dans les membranes via des complexes cholestérol-cyclodextrine (Tsamaloukas et al., 2005).

INTRODUCTION

La M β -CD a été utilisée pour l'étude de l'extraction du cholestérol à partir de modèles membranaires (LUV composés de cholestérol, sphingomyéline (SM) et/ou DOPC en différentes proportions) (Beseničar et al., 2008). Dans ce but, une nouvelle approche expérimentale a été développée (la SPR pour « Surface Plasmon Resonance ») et des mesures de perméabilité membranaire et de tailles particulières ont également été effectuées. Des liposomes composés de DOPC en association avec du cholestérol (DOPC:cholestérol 60:40) voient leur diamètre réduit en présence d'une solution de M β -CD (2 mM) ce qui n'est pas le cas pour des vésicules sans cholestérol. Les auteurs ont conclu à l'absence d'extraction du DOPC dans ces conditions. Les deux types de liposomes étaient par ailleurs non perméables à la calcéine. Des liposomes contenant des ratios variables en lipides ont été testés par la méthode de SPR et les quantités de cholestérol extraites en présence de M β -CD (\leq 2 mM, 30 min) varient selon le type et la composition des liposomes (la présence de SM réduit fortement l'extraction). Concernant les cinétiques d'extraction, la moitié du cholestérol est extraite en 30 secondes de liposomes constitués de DOPC:cholestérol en proportions 70:30 pour une concentration de 2 mM en cyclodextrine. La température influence également les cinétiques de libération puisque l'extraction était plus rapide à 37 °C qu'à 25 °C pour des mélanges DOPC:SM:cholestérol 30:30:40.

Dans le cadre d'une étude sur l'encapsulation de complexes de prednisolone dans des liposomes (composés de PC associée ou non à du cholestérol), l'effet de la β -CD et de son dérivé hydroxypropylé sur l'intégrité membranaire a été étudié (Fatouros et al., 2001). Pour ce faire, des liposomes (DRV) qui encapsulent la 5,6-carboxyfluorescéine et les cyclodextrines « vides » ont été préparés. La rétention du traceur dans les vésicules a pu être mesurée (surtout dans le cas de l'utilisation de la β -CD) comme étant inférieure à celle de liposomes sans cyclodextrine.

Dans le même ordre d'idée, une étude récente s'est intéressée à la stabilité de différents types de liposomes (DRV, MLV ou liposomes unilamellaires (SUV)) de compositions lipidiques différentes (PC, H-PC (PC hydrogénée) ou DSPC (distearoyl PC) avec ou sans cholestérol (1:1 mol/mol) mis en contact avec des solutions de cyclodextrines (M β -CD, HP- β -CD et HP- γ -CD) (Hatzi et al., 2007). La diminution éventuelle de l'intégrité membranaire a été évaluée en encapsulant de la calcéine et confirmée par des mesures de turbidité et de tailles particulières. Quand ils sont composés d'un des trois types de phospholipides, les DRV sont affectés de la même manière quel que soit le dérivé de cyclodextrine utilisé alors que l'introduction de cholestérol dans les membranes les rend plus sensibles au dérivé méthylé.

INTRODUCTION

Pour les deux autres types de vésicules, l'effet déstabilisant de la M β -CD est toujours supérieur à celui des autres cyclodextrines qui n'ont par ailleurs aucun effet significatif sur l'intégrité membranaire des SUV. Hatzi a émis l'hypothèse que l'augmentation de stabilité de ces petites vésicules pourrait s'expliquer par la courbure de la membrane lipidique. Celle-ci ne permettrait pas d'établir un angle de contact suffisant avec les dérivés hydroxypropylés pour interagir avec les bicouches et extraire leurs lipides constitutifs. Les effets observés en présence de cyclodextrines sont donc dépendants du type de vésicules (SUV < DRV < MLV), des lipides constitutifs (compositions contenant du DSPC toujours plus stables) et du type de cyclodextrine utilisée.

Néanmoins dans le cas de systèmes appelés « drugs-in-cyclodextrin-in-liposome », la présence du principe actif dans la cavité de la cyclodextrine peut retarder les interactions avec les composants lipidiques (Piel et al., 2006). Dans ce cas, l'affinité de la molécule pour la cyclodextrine est telle qu'elle ne peut être déplacée par le cholestérol ou les autres composants lipidiques (Hatzi et al., 2007).

La modulation de libération au contact de la Rameb d'une substance hydrophile modèle (l'inuline) encapsulée dans des liposomes chargés positivement ou pégylés et contenant du cholestérol a notamment été évaluée dans l'étude de Boulmedarat et al. (Boulmedarat et al., 2005). Les quantités de la molécule libérée à 37 °C dépendent des concentrations en lipides et en cyclodextrine, du temps de contact et de la composition des liposomes. Ainsi, 5 % m/V de Rameb induisent une libération importante d'inuline surtout à des concentrations lipidiques de l'ordre de 2 mM (l'effet étant moins marqué pour des hautes concentrations soit à 10 mM). Après un contact de 30 min et à cette même concentration en lipides et en cyclodextrine, l'inuline est libérée à 80% à partir des liposomes chargés (SPC:CHOL:SA 60:30:10 mol%) alors qu'elle l'est clairement moins pour les liposomes pégylés (SPC:CHOL:PEG₂₀₀₀-DSPE 64:30:06 mol%). Cependant, après un contact d'un jour, les quantités libérées sont équivalentes. Cette étude avait pour but de mettre au point un système pour l'administration buccale de liposomes chargés en principe actif, dispersés au sein d'un gel bioadhésif et contenant de la Rameb. Cette dernière, introduite dans le système en tant que promoteur d'absorption, peut de surcroît interagir avec les vésicules lipidiques et moduler la libération des molécules encapsulées.

L'extraction du cholestérol par la Rameb à partir de liposomes unilamellaires constitués de DMPC et de cholestérol (DMPC:CHOL 70:30 mol%) a été évaluée en mesurant des modifications de microviscosité membranaire par résonance paramagnétique électronique (RPE) (Grammenos et al., 2009). L'addition de Rameb jusqu'à 20 mM n'induit pas de

diminution de microviscosité après 1 heure d'incubation à 37 °C. Les taux de cholestérol résiduel soit 22%, 15% et 10% ont pu être estimés pour des concentrations supérieures en Rameb c'est-à-dire à 30, 40 et 50 mM respectivement.

3.2 Membranes cellulaires

3.2.1 Modulation du cholestérol membranaire

Au cours des années 1995-2000, l'équipe de Rothblat s'est intéressée aux modulations des quantités de cholestérol cellulaire par l'utilisation de cyclodextrines (Kilsdonk et al., 1995; Yancey et al., 1996; Christian et al., 1997; Atger et al., 1997; Christian et al., 1999; Rothblat et al., 1999; Haynes et al., 2000).

Des β -cyclodextrines (β -CD, M β -CD et HP- β -CD) ont été utilisées comme « accepteurs » de cholestérol cellulaire (Kilsdonk et al., 1995). Une fuite dose-dépendante de cholestérol dans le milieu est induite par les cyclodextrines, la M β -CD étant plus efficace que les deux autres. En effet, après 8 heures d'incubation avec des fibroblastes murins (« L-cells ») en monocouche, 90% du cholestérol sont libérés pour une concentration de 10 mM en M β -CD contre environ 50% pour le dérivé hydroxypropylé. Comme cela a été démontré avec l'HP- β -CD, la majeure partie du cholestérol est libérée durant les deux premières heures d'incubation puis, un équilibre est atteint. L'influence éventuelle du type cellulaire a été étudiée en utilisant également des cellules de l'hépatome de rat (Fu5AH) et des fibroblastes cutanés humains (GM3468A) mais la fuite de cholestérol dans ces conditions (incubation de 10 min avec les dérivés de la β -CD) était similaire dans les deux cas et légèrement supérieure à l'effet obtenu sur les cellules murines. Les auteurs ont également montré que la libération de phospholipides était insignifiante ou inexistante selon la cyclodextrine utilisée en comparaison à celle du cholestérol.

Dans la continuité de cette étude, des essais sur les trois types cellulaires ont montré que la libération du cholestérol induite par l'HP- β -CD était plus marquée lorsque les cellules se trouvaient en suspension (impact encore plus important qu'en agitant les cellules en monocouche) (Yancey et al., 1996). Cet article s'est intéressé à la libération du cholestérol de cellules en suspension en fonction du temps, de la concentration et du type cellulaire. La comparaison des cinétiques de libération à partir des cellules et de membranes artificielles

INTRODUCTION

(LUV) a été étudiée. Yancey a également évalué l'accumulation ou non du cholestérol au niveau cellulaire à partir de complexes formés dans une solution d'HP- β -CD à 100 mM. Des solutions contenant différents ratios cholestérol:cyclodextrine ont été préparées. L'auteur a observé qu'aux ratios élevés, les complexes permettent d'enrichir les membranes en cholestérol, les complexes servant alors de « donneurs » de cholestérol. En revanche, aux ratios faibles, les complexes servent de « capteurs » de cholestérol, provoquant une « déplétion » en cholestérol membranaire.

La M β -CD s'est avérée être un meilleur « donneur » de cholestérol que le dérivé hydroxypropylé comme montré par l'équipe de Christian qui a étudié la modulation des taux de cholestérol de cellules via l'utilisation de complexes de ratios variables (Christian et al., 1997).

Cette équipe de recherche a également démontré que les cyclodextrines à faible concentration peuvent accélérer l'échange de cholestérol entre des cellules et des lipoprotéines de sérum (Atger et al., 1997; Christian et al., 1999). Ainsi, des macrophages J774 incubés avec du sérum et de l'HP- β -CD (≤ 1 mM) libèrent 5 fois plus de cholestérol qu'en présence de sérum uniquement (Atger et al., 1997). L'effet de la M β -CD et d'autres dérivés de synthèse de la β -CD a également été quantifié avec d'autres cellules (Christian et al., 1999). Les essais avec la M β -CD ont démontré une stimulation dose-dépendante de la libération de cholestérol cellulaire. L'EC50 calculée (0,05 mM) a été choisie pour tester les autres dérivés étudiés. Dans ces conditions, la M β -CD permet de doubler le transfert de cholestérol vers le sérum. Agissant comme des « navettes » pour le cholestérol, les cyclodextrines pourraient potentiellement servir d'agents pharmacologiques pour modifier le métabolisme du cholestérol.

Enfin, l'étude des cinétiques de libération du cholestérol cellulaire par les cyclodextrines semble démontrer que le cholestérol impliqué proviendrait de la membrane plasmique dans laquelle se trouverait en grande majorité le cholestérol cellulaire (Haynes et al., 2000; Zidovetzki and Levitan, 2007). Notons qu'il a été démontré que les taux de cholestérol dans les membranes intracellulaires sont régulés par les taux de cholestérol de la membrane plasmique (Zidovetzki and Levitan, 2007) et qu'une redistribution vers la membrane plasmique est probable suite à l'action des cyclodextrines.

3.2.2 Effet au niveau des microdomaines membranaires

De nombreux travaux récents, mettent à profit l'extraction du cholestérol par les cyclodextrines pour étudier la fonction des radeaux lipidiques et des cavéoles membranaires. Ces microdomaines hétérogènes riches en sphingolipides et cholestérol, auxquels sont également associés des molécules spécifiques telles que les récepteurs à activité tyrosine kinase (Anderson and Jacobson, 2002), sont impliqués dans la transduction des signaux cellulaires (Fielding and Fielding, 2003; Pike, 2004). Les radeaux lipidiques jouent de plus un rôle significatif dans divers processus biologiques comme l'apoptose (Gniadecki, 2004), l'adhésion et la migration cellulaire, les transmissions synaptiques, l'organisation du cytosquelette, ... (Munro, 2003). Enfin, de nombreux pathogènes utilisent les microdomaines de la membrane cellulaire de l'hôte comme « porte d'entrée » (Thomas et al., 2004). L'existence, le maintien et la fonction des radeaux lipidiques dépendent du taux de cholestérol membranaire.

L'extraction du cholestérol par les cyclodextrines perturbe l'organisation de ces microdomaines et interfère avec leur fonctionnalité (Nguyen and Taub, 2002; Pike and Casey, 2002). Les β -cyclodextrines seraient capables d'appauvrir en cholestérol des fractions de membranes correspondant aux radeaux lipidiques (« raft fractions ») ou non (« non-raft fractions »). Bien que les proportions extraites varient en fonction des protocoles utilisés, ces études suggèrent que le cholestérol serait libéré plus rapidement à partir des zones correspondant aux radeaux lipidiques (Zidovetzki and Levitan, 2007).

Comme déjà évoqué précédemment, la M β -CD est un des outils les plus utilisés en biologie cellulaire pour l'étude des radeaux lipidiques, des cavéoles et des fonctions cellulaires qui y sont associées. On ne compte plus le nombre de publications relatives à son utilisation vu la variété de types cellulaires et de fonctions pouvant être étudiées. L'introduction des mots « cyclodextrin » et « lipid rafts » dans un moteur de recherche scientifique conduit à plus de 1300 références d'où l'impossibilité de résumer de manière exhaustive les effets des cyclodextrines au niveau des microdomaines membranaires.

Si les interactions cyclodextrines-cholestérol membranaires sont utilisées pour étudier la fonction des radeaux lipidiques, des études montrent que ces interactions peuvent présenter un intérêt thérapeutique (Strauss et al., 2002; Barenholz, 2004; Praputbut, 2006). La modulation des taux de cholestérol via l'utilisation de cyclodextrines pourrait être mise à profit pour traiter des maladies ou infections impliquant ces microdomaines.

4 Bibliographie

Anderson, R.G., Jacobson, K., 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science*, 296, 1821-1825.

Armspach, D., Gattuso, G., Königer, R., Stoddart, J.F., 1999. Cyclodextrins. In: *Bioorganic Chemistry : Carbohydrates*. Hecht, S.M. (Ed.), Oxford University Press, Oxford, 458-488.

Asgharian, B., Cadenhead, D.A., Goddard, E.D., 1988. The Sequestering of Surfactants from Insoluble Monolayers by α -, β - and γ -Cyclodextrins. *Colloids and Surfaces*, 34, 143-149.

Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., Simal-Gandara, J., 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23, 1631-1640.

Atger, V.M., Moya, M.D., Stoudt, G.W., Rodriguez, W.V., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., 1997. Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. *Journal of Clinical Investigation*, 99, 773-780.

Bacia, K., Scherfeld, D., Kahya, N., Schwille, P., 2004. Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. *Biophysical Journal*, 87, 1034-1043.

Bacia, K., Schwille, P., Kurzchalia, T., 2005. Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 3272-3277.

Barenholz, Y., 2001. Liposome application: problems and prospects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6, 66-77.

Barenholz, Y., 2004. Sphingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and rafts to potential medical applications. *Subcellular Biochemistry*, 37, 167-215.

Barenholz, Y., Crommelin, D.J.A., 1994. Liposomes as Pharmaceutical Dosage Forms. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Volume 9, Swarbrick, J. and Boylan, J.C.E. (Eds.), Marcel Dekker, New York, 1-40.

Barillaro, V., 2006. Etude de l'inclusion du miconazole dans les cyclodextrines à l'aide du dioxyde de carbone supercritique : aspects galéniques et modélisation moléculaire, Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège.

INTRODUCTION

Barillaro, V., Dive, G., Bertholet, P., Evrard, B., Delattre, L., Frédérick, M., Ziémons, E., Piel, G., 2008. Theoretical and experimental investigations of organic acids/cyclodextrin complexes and their consequences upon the formation of miconazole/cyclodextrin/acid ternary inclusion complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 347, 62-70.

Belhadj Salem, L., Bosquillon, C., Dailey, L.A., Delattre, L., Martin, G.P., Evrard, B., Forbes, B., 2009. Sparing methylation of β -cyclodextrin mitigates cytotoxicity and permeability induction in respiratory epithelial cell layers in vitro. *Journal of Controlled Release*, 136, 110-116.

Bernat, V., Ringard-Lefebvre, C., Le Bas, G., Lesieur, S., 2007. Action of α -cyclodextrin on phospholipid assemblies. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 113-119.

Bertholet, P., 2005. Intérêt des cyclodextrines dans le développement galénique de formes pulmonaires à base de Ro 28-2653, un inhibiteur des métalloprotéases matricielles, Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège.

Beseničar, M.P., Bavdek, A., Kladnik, A., Macek, P., Anderluh, G., 2008. Kinetics of cholesterol extraction from lipid membranes by methyl- β -cyclodextrin - A surface plasmon resonance approach. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778, 175-184.

Bochot, A., Trichard, L., Le Bas, G., Alphandary, H., Grossiord, J.L., Duchêne, D., Fattal, E., 2007. α -Cyclodextrin/oil beads: An innovative self-assembling system. *International Journal of Pharmaceutics*, 339, 121-129.

Botham, K.M., Mayes, P.A., 2008. Lipides importants sur le plan physiologique. In: *Biochimie de Harper*. De Boeck Université, Bruxelles, 121-131.

Boulmedarat, L., Piel, G., Bochot, A., Lesieur, S., Delattre, L., Fattal, E., 2005. Cyclodextrin-mediated drug release from liposomes dispersed within a bioadhesive gel. *Pharmaceutical Research*, 22, 962-971.

Brewster, M.E., Loftsson, T., 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 645-666.

C.B.I.P., 2009. Répertoire Commenté des Médicaments. Maloteaux, J.M. (Ed.), Imprimerie Joh. Enschedé/Van Muysewinkel, Bruxelles, 503 p.

Cal, K., Centkowska, K., 2008. Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68, 467-478.

INTRODUCTION

Campbell, N., Reece, J., 2007a. Structure et fonction des macromolécules. In: *Biologie*. Editions du Renouveau Pédagogique, Pearson Education, Paris, 71-96.

Campbell, N., Reece, J., 2007b. Structure et fonction des membranes. In: *Biologie*. Editions du Renouveau Pédagogique, Pearson Education, Paris, 129-147.

Campillo, C.C., Schroder, A.P., Marques, C.M., Pepin-Donat, B., 2009. Composite gel-filled giant vesicles: Membrane homogeneity and mechanical properties. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 29, 393-397.

Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., Khar, R.K., 2005. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *APPS Pharmscitech*, 6, E329-E357.

Christian, A.E., Byun, H.S., Zhong, N., Wanunu, M., Marti, T., Furer, A., Diederich, F., Bittman, R., Rothblat, G.H., 1999. Comparison of the capacity of β -cyclodextrin derivatives and cyclophanes to shuttle cholesterol between cells and serum lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 40, 1475-1482.

Christian, A.E., Haynes, M.P., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of Lipid Research*, 38, 2264-2272.

Comini, S., Mentink, L., 1991. Refining mixtures containing complexes of cyclodextrins with lipophilic compounds such as fatty acids. *Eur Pat. Appl. EP 440539*.

Couet, J., Belanger, M.M., Roussel, E., Drolet, M.C., 2001. Cell biology of caveolae and caveolin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49, 223-235.

de Leeuw, J., de Vijlder, H.C., Bjerring, P., Neumann, H.A.M., 2009. Liposomes in dermatology today. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 23, 505-516.

Coste, V., 2006. Formation de domaines de type « rafts » dans des vésicules unilamellaires et mécanismes physico-chimiques de l'extraction de domaines membranaires, Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.

Del Valle, E.M.M., 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39, 1033-1046.

Dewar, M.J.S., Zoebisch, E.G., Healy, E.F., Stewart, J.J.P., 1985. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *Journal of the American Chemical Society*, 107, 3902-3909.

INTRODUCTION

Dietrich, C., Bagatolli, L.A., Volovyk, Z.N., Thompson, N.L., Levi, M., Jacobson, K., Gratton, E., 2001. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophysical Journal*, 80, 1417-1428.

Dive, G., Dehareng, D., Ghuysen, J.M., 1993. Energy Analysis on Small to Medium-Sized H-Bonded Complexes. *Theoretica Chimica Acta*, 85, 409-421.

Dousset, N., Douste-Blazy, L., 1985. Méthodes de préparation des liposomes. In: *Les liposomes - applications thérapeutiques*. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, 41-72.

Duchêne, D., Bochet, A., Yu, S.C., Pepin, C., Seiller, M., 2003. Cyclodextrins and emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 266, 85-90.

Düzgüneş, N., Bagatolli, L.A., Meers, P., Oh, Y.-K., Straubinger, R.M., 2003. Fluorescence methods in liposome research. In: *Liposomes*. Torchilin, V.P. and Weissig, V. (Eds.), Oxford University Press, Oxford, 105-147.

Fatouros, D.G., Hatzidimitriou, K., Antimisiaris, S.G., 2001. Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: Comparison of membrane integrity and drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 287-296.

Fielding, C.J., Fielding, P.E., 2003. Relationship between cholesterol trafficking and signaling in rafts and caveolae. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1610, 219-228.

Flaten, G.E., Dhanikula, A.B., Luthman, K., Brandl, M., 2006. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: A novel approach for studying passive diffusion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, 80-90.

Frömming, K.-H., Szejtli, J., 1994. *Cyclodextrins in Pharmacy*. Davies, J.E.D. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 224 p.

Geusens, B., Lambert, J., De Smedt, S.C., Buyens, K., Sanders, N.N., Van Gele, M., 2009. Ultradeformable cationic liposomes for delivery of small interfering RNA (siRNA) into human primary melanocytes. *Journal of Controlled Release*, 133, 214-220.

Gniadecki, R., 2004. Depletion of membrane cholesterol causes ligand-independent activation of Fas and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320, 165-169.

Grammenos, A., Bahri, M.A., Guelluy, P.H., Piel, G., Hoebeke, M., 2009. Quantification of Randomly-methylated- β -cyclodextrin effect on liposome: an ESR study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390, 5-9.

INTRODUCTION

Grauby-Heywang, C., Turllet, J.M., 2008. Study of the interaction of β -cyclodextrin with phospholipid monolayers by surface pressure measurements and fluorescence microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 322, 73-78.

Hariharan, P.C., Pople, J.A., 1973. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theoretica Chimica Acta*, 28, 213-222.

Hatzi, P., Mourtas, S., Klepetsanis, P.G., Antimisiaris, S.G., 2007. Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: Effect of liposome type and lipid composition. *International Journal of Pharmaceutics*, 333, 167-176.

Haynes, M.P., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., 2000. Efflux of cholesterol from different cellular pools. *Biochemistry*, 39, 4508-4517.

Heimburg, T., 2007. Membranes - An Introduction. In: *Thermal Biophysics of Membranes*. Herrmann, A and Hofmann, K.-P. (Eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 1-13.

Henry de Hassonville, S., 2004. Etude de l'influence de l'interaction entre les cyclodextrines et l'acétate de cyprotérone sur sa pénétration cutanée, Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège.

Higuchi, T., Connors, K.A., 1965. Phase-solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, 4, 117-212.

Hovgaard, L., Brondsted, H., 1995. Drug delivery studies in Caco-2 monolayers. IV. Absorption enhancer effects of cyclodextrins. *Pharmaceutical Research*, 12, 1328-1332.

Ichim, T.E., Li, M., Qian, H., Popov, I.A., Rycerz, K., Zheng, X.F., White, D., Zhong, R., Min, W.P., 2004. RNA interference: A potent tool for gene-specific therapeutics. *American Journal of Transplantation*, 4, 1227-1236.

Ilangumaran, S., Hoessli, D.C., 1998. Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochemical Journal*, 335, 433-440.

Jain, S.K., Gupta, Y., Jain, A., Bholra, M., 2007. Multivesicular liposomes bearing celecoxib- β -cyclodextrin complex for transdermal delivery. *Drug Delivery*, 15, 327-335.

Jain, S.K., Jain, R.K., Chourasia, M.K., Jain, A.K., Chalasani, K.B., Soni, V., Jain, A., 2005. Design and development of multivesicular liposomal depot delivery system for controlled systemic delivery of acyclovir sodium. *AAPS Pharmscitech*, 6, E35-E41.

INTRODUCTION

Jensen, F., 1999. Introduction to computational chemistry. Wiley-VCH, Chichester, 429 p.

Kaur, I.P., Garg, A., Singla, A.K., Aggarwal, D., 2004. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 269, 1-14.

Kilsdonk, E.P., Yancey, P.G., Stoudt, G.W., Bangerter, F.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., 1995. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 17250-17256.

Kirby, C., Gregoriadis, G., 1984. Dehydration-Rehydration Vesicles: A Simple Method for High Yield Drug Entrapment in Liposomes. *Biotechnology*, 2, 979-984.

Lasch, J., Weissig, V., Brandl, M., 2003. Preparation of liposomes. In: *Liposomes*. Torchilin, V.P. and Weissig, V. (Eds.), Oxford University Press, Oxford, 3-29.

Lasic, D.D., 1997. *Liposomes in Gene Delivery*. CRC Press, Boca Raton, 295 p.

Lasic, D.D., 1998. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16, 307-321.

Loftsson, T., Duchêne, D., 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 329, 1-11.

Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M., Järvinen, T., 2005. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2, 335-351.

Loftsson, T., Masson, M., Brewster, M.E., 2004. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, 1091-1099.

Loftsson, T., Vogensen, S.B., Brewster, M.E., Konradsdottir, F., 2007. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 2532-2546.

Lopez, O., de la Maza, A., Coderch, L., Parra, J.L., 1996. Formation and characterization of liposomes from lipid/proteic material extracted from pig stratum corneum. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 73, 443-448.

Lorin, A., Flore, C., Thomas, A., Brasseur, R., 2004. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 8, 163-176.

INTRODUCTION

Maeda, H., Bharate, G.Y., Daruwalla, J., 2009. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71, 409-419.

Maghraby, G.M., Barry, B.W., Williams, A.C., 2008. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34, 203-222.

Marttin, E., Verhoef, J.C., Merkus, F.W.H.M., 1998. Efficacy, safety and mechanism of cyclodextrins as absorption enhancers in nasal delivery of peptide and protein drugs. *Journal of Drug Targeting*, 6, 17-36.

Matilainen, L., Toropainen, T., Vihola, H., Hirvonen, J., Jarvinen, T., Jarho, P., Jarvinen, K., 2008. In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells. *Journal of Controlled Release*, 126, 10-16.

McMullen, T.P.W., Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R.N., 2004. Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8, 459-468.

Mosher, G., Thompson, D.O., 2000. Complexation and Cyclodextrins. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Volume 19, Swarbrick, J. and Boylan, J.C.E. (Eds.), Marcel Dekker, New York, 49-88.

Mukherjee, S., Zha, X.H., Tabas, I., Maxfield, F.R., 1998. Cholesterol distribution in living cells: Fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophysical Journal*, 75, 1915-1925.

Munro, S., 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, 115, 377-388.

Murray, R.K., Granner, D.K., 2008. Membranes : structure et fonction. In: *Biochimie de Harper*. De Boeck Université, Bruxelles, 422-441.

Nguyen, D.H., Taub, D., 2002. Cholesterol is essential for macrophage inflammatory protein 1 β binding and conformational integrity of CC chemokine receptor 5. *Blood*, 99, 4298-4306.

Ohvo, H., Slotte, J.P., 1996. Cyclodextrin-mediated removal of sterols from monolayers: effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate. *Biochemistry*, 35, 8018-8024.

Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J., Papahadjopoulos, D., 1979. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 557, 9-23.

INTRODUCTION

Ottova, A.L., Tien, H.T., 1997. Self-assembled bilayer lipid membranes: from mimicking biomembranes to practical applications. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 42, 141-152.

Papahadjopoulos, D., Kimelberg, H.K., 1973. Phospholipid vesicles (liposomes) as models for biological membranes : Their properties and interactions with cholesterol and proteins. *Progress in surface science*, 4, 141-232.

Parton, R.G., Simons, K., 2007. The multiple faces of caveolae. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 185-194.

Peschka-Süss, R., Schubert, R., 2003. pH-sensitive liposomes. In: *Liposomes*. Torchilin, V.P. and Weissig, V. (Eds.), Oxford University Press, Oxford, 305-318.

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. Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège.

Piel, G., Dive, G., Evrard, B., Van Hees, T., Henry de Hassonville, S., Delattre, L., 2001. Molecular modeling study of β - and γ -cyclodextrin complexes with miconazole. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 271-279.

Piel, G., Moutard, S., Perly, B., Henry de Hassonville, S., Bertholet, P., Barillaro, V., Piette, M., Delattre, L., Evrard, B., 2004. Comparison of two methods currently used to determine the interaction between cyclodextrins and drugs: phase solubility diagrams and NMR spectroscopy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 14, 87-91.

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. *International Journal of Pharmaceutics*, 312, 75-82.

Pike, L.J., 2004. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochemical Journal*, 378, 281-292.

Pike, L.J., Casey, L., 2002. Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. *Biochemistry*, 41, 10315-10322.

Praputbut, S., 2006. Caveolae: From cell biology to therapeutic strategies. *Naresuan University Journal*, 14, 49-60.

Puglisi, G., Fresta, M., Ventura, C.A., 1996. Interaction of natural and modified β -cyclodextrins with a biological membrane model of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Journal of Colloid and Interface Science*, 180, 542-547.

INTRODUCTION

Puskas, I., Barcza, L., Szente, L., Csempez, F., 2006. Features of the interaction between cyclodextrins and colloidal liposomes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 54, 89-93.

Razani, B., Lisanti, M., 2002. The role of caveolae and the caveolins in mammalian physiology. *Reviews in Undergraduate Research*, 1, 44-50.

Rosilio, V., 2004. Liposomes. In: *Nouvelles formes médicamenteuses. Technique et Documentation*, Lavoisier, Paris, 223-235.

Rothblat, G.H., Llera-Moya, M., Atger, V., Kellner-Weibel, G., Williams, D.L., Phillips, M.C., 1999. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *Journal of Lipid Research*, 40, 781-796.

Roquette Frères, 2006. Technical Brochure : KLEPTOSE[®] CRYSMEB exp. - Methyl Beta-cyclodextrin from Roquette, 14 p.

Sato, A., Takagi, M., Shimamoto, A., Kawakami, S., Hashida, M., 2007. Small interfering RNA delivery to the liver by intravenous administration of galactosylated cationic liposomes in mice. *Biomaterials*, 28, 1434-1442.

Schneider, H.J., Hacket, F., Rudiger, V., Ikeda, H., 1998. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chemical Reviews*, 98, 1755-1785.

Schneiderman, E., Stalcup, A.M., 2000. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 745, 83-102.

Schuber, F., Kichler, A., Boeckler, C., Frisch, B., 1998. Liposomes: from membrane models to gene therapy. *Pure and Applied Chemistry*, 70, 89-96.

Sharma, A., Sharma, U.S., 1997. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154, 123-140.

Shimada, K., Kawano, K., Ishii, J., Nakamura, T., 1992. Structure of inclusion complexes of cyclodextrins with triglyceride at vegetable oil/water interface. *Journal of Food Science*, 57, 655-656.

Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U.C., 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*, 20, 341-359.

INTRODUCTION

Strauss, L., Fuenzalida, M., Illanes, J., Dabancens, A., Diaz, E., Lemus, D., Guerrero, A., 2002. Effect of sulfated β -cyclodextrin, a water soluble cycloamylose, on the promotion and/or inhibition of angiogenesis. *Pathology and Oncology Research*, 8, 47-53.

Szejtli, J., 1988. *Cyclodextrin Technology*. Davies, J.E.D (Ed.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 450 p.

Szente, L., Szejtli, J., 1999. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36, 17-28.

Szente, L., Szejtli, J., 2004. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 137-142.

Thomas, S., Suman, R.K., Brumeanu, T.D., 2004. Role of lipid rafts in T cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 52, 215-224.

Trichard, L., Duchêne, D., Bochot, A., 2006. Cyclodextrins in dispersed systems. In: *Cyclodextrins and Their complexes : Chemistry, Analytical Methods, Applications*. Dodziuk, H. (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim, 423-449.

Trichard, L., Fattal, E., Besnard, M., Bochot, A., 2007. α -Cyclodextrin/oil beads as a new carrier for improving the oral bioavailability of lipophilic drugs. *Journal of Controlled Release*, 122, 47-53.

Trichard, L., Fattal, E., Le Bas, G., Duchêne, D., Grossiord, J.L., Bochot, A., 2008. Formulation and characterisation of beads prepared from natural cyclodextrins and vegetable, mineral or synthetic oils. *International Journal of Pharmaceutics*, 354, 88-94.

Tsamaloukas, A., Szadkowska, H., Slotte, J.P., Heerklotz, H., 2005. Interactions of cholesterol with lipid membranes and cyclodextrin characterized by calorimetry. *Biophysical Journal*, 89, 1109-1119.

Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T., 1998. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chemical Reviews*, 98, 2045-2076.

Varma, R., Mayor, S., 1998. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*, 394, 798-801.

Voet, D., Voet, J.G., 1998. Lipides et membranes. In: *Biochimie*. De Boeck Université, Bruxelles, 277-330.

INTRODUCTION

Vollhardt, C., Schore, N.E., 1995. La déduction des structures par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire. In: *Traité de Chimie Organique*. De Boeck Université, Bruxelles, 324-371.

Wertz, P.W., Abraham, W., Landmann, L., Downing, D.T., 1986. Preparation of liposomes from stratum corneum lipids. *Journal of Investigative Dermatology*, 87, 582-584.

Yancey, P.G., Rodrigueza, W.V., Kilsdonk, E.P., Stoudt, G.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., 1996. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 16026-16034.

Zepik, H.H., Walde, P., Kostoryz, E.L., Code, J., Yourtee, D.M., 2008. Lipid vesicles as membrane models for toxicological assessment of xenobiotics. *Critical Reviews in Toxicology*, 38, 1-11.

Zidovetzki, R., Levitan, I., 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768, 1311-1324.

Zuidam, N.J., de Vruh, R., Crommelin, D.J.A., 2003. Characterization of liposomes. In: *Liposomes*. Torchilin, V.P. and Weissig, V. (Eds.), Oxford University Press, Oxford, 31-78.

Chapitre I

Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes

G. Piel, M. Piette, V. Barillaro, D. Castagne, B. Evrard and L. Delattre

International Journal of Pharmaceutics, 338 (1-2):35-42, 2007

1 Chapitre I : Mise en évidence de l'interaction des cyclodextrines avec des modèles membranaires et leurs constituants lipidiques

1.1 Introduction

Des liposomes unilamellaires de compositions lipidiques simples, mais proches de celles des membranes cellulaires par leur proportion en cholestérol, ont été utilisés comme modèles membranaires afin d'observer les interactions avec différentes cyclodextrines couramment utilisées en Technologie Pharmaceutique : β -CD, γ -CD, HP- β -CD, HP- γ -CD, Dimeb, Rameb, Crysmeb, Trimeb et SBE- β -CD. L'intégrité de liposomes constitués de phosphatidylcholine de soja (SPC) avec ou sans cholestérol (CHOL) a été évaluée en mesurant la variation de leur taille et la fuite d'un traceur fluorescent (la calcéïne) encapsulé dans leur cavité interne, en présence de solutions de cyclodextrines. Les résultats obtenus ont été mis en relation avec les capacités des cyclodextrines à solubiliser les constituants des membranes liposomales (CHOL et SPC). La méthode des diagrammes de solubilité a été utilisée.

1.2 Résumé des résultats

- **Effet des cyclodextrines sur la fuite d'un traceur fluorescent encapsulé dans les liposomes**

Aucune augmentation significative de la fluorescence n'a été observée après addition de solutions de β -CD, Crysmeb, HP- β -CD, HP- γ -CD et SBE- β -CD aux liposomes contenant du cholestérol (SPC:CHOL:SA 60:30:10 mol%) dans les conditions testées. Concernant les autres cyclodextrines utilisées, l'intégrité membranaire de ces vésicules dépend du dérivé et/ou des concentrations utilisées, l'effet étant le plus marqué pour la Dimeb (Dimeb > Rameb > Trimeb >> γ -CD) (Figure 18).

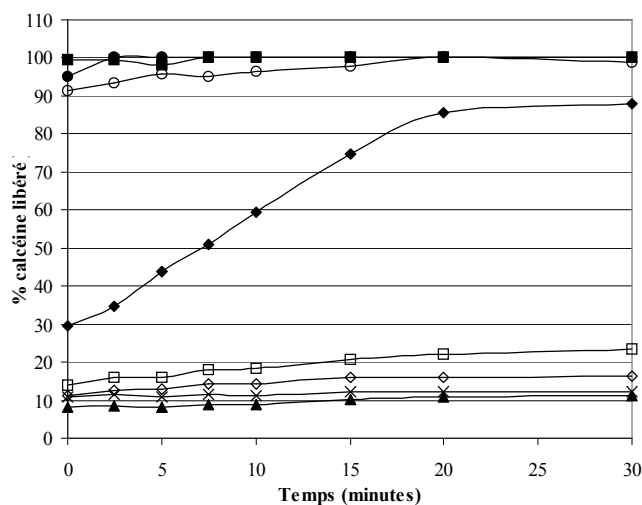


Figure 18 : Pourcentages de calcéine libérés à partir de liposomes SPC:CHOL:SA (60:30:10) en l'absence de cyclodextrine (X) ou en présence de Trimeb (◇), Rameb (□), γCD (Δ) ou Dimeb (○). Symboles blancs = 20 mM et noirs = 50 mM (n > 3)

Afin de comprendre si les perturbations observées sont dues à l'extraction du cholestérol membranaire, les mêmes expériences ont été réalisées sur des liposomes ne contenant pas de cholestérol (SPC:SA 90:10 mol%). Seules les Dimeb, Rameb et Trimeb ont induit une fuite de calcéine significative (Dimeb > Rameb > Trimeb). La comparaison des effets obtenus avec des solutions de ces dérivés méthylés hautement substitués sur les deux types de liposomes montrent que les vésicules contenant du cholestérol y sont plus sensibles. En présence de Crismeb par contre, la rétention de la calcéine n'est pas modifiée par rapport aux conditions sans cyclodextrines, quelle que soit la composition liposomale.

▪ **Effet des cyclodextrines sur la solubilité des constituants des membranes liposomales**

Les interactions entre les cyclodextrines et les composants membranaires lipidiques (cholestérol, SPC) ont été évaluées individuellement par diagrammes de solubilité dans le but d'expliquer les résultats précédents. Les diagrammes de solubilité et le calcul des efficacités de complexation (CE) nous ont permis de classer les cyclodextrines en fonction de leur affinité pour le cholestérol : β -CD = γ -CD = HP- γ -CD = SBE- β -CD < HP- β -CD < Crismeb < Dimeb < Rameb = Trimeb. Remarquons que les quatre premières cyclodextrines ne forment pas de complexes solubles ou que les quantités solubilisées ne sont pas détectables (Figure 19).

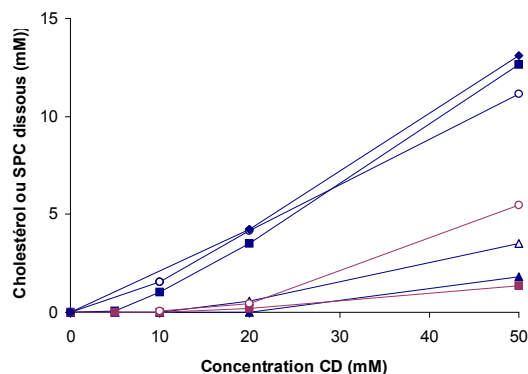


Figure 19 : Diagrammes de solubilité du cholestérol (en bleu) et de la SPC (en pourpre) en présence de différentes cyclodextrines : Trimeb (◆), Rameb (■), Dimeb (○), Crysmeb (△) ou HP-β-CD de D.S. = 0.6 (▲) (n ≥ 3)

Une bonne corrélation entre la capacité des cyclodextrines à induire la fuite du traceur fluorescent et à dissoudre le cholestérol a été mise en évidence. Les diagrammes de solubilité de la SPC avec certaines cyclodextrines sont présentés à la Figure 19. Les CE obtenues en présence de SPC étaient systématiquement inférieures à celles obtenues avec le cholestérol ($\text{HP-}\beta\text{-CD} \leq \text{Crysmeb} < \text{Trimeb} < \text{Rameb} < \text{Dimeb}$) mais la bonne affinité de la Dimeb pour la SPC pourrait expliquer le fait qu'elle perturbe de manière aussi marquée l'intégrité membranaire.

▪ Effet des cyclodextrines sur la taille des liposomes

Enfin, des analyses de distribution de tailles particulières ont été réalisées et ont montré que la Crysmeb n'induisait pas de modifications significatives de la taille ou de la structure des liposomes à l'inverse des autres dérivés méthylés. Ceci appuie les résultats précédents en confirmant la destruction des membranes des liposomes par ces dérivés.

1.3 Conclusions

L'effet des cyclodextrines sur l'intégrité membranaire des liposomes a été étudié de même que les interactions spécifiques de ces molécules avec les composants membranaires. Les résultats montrent que quand on utilise des cyclodextrines naturelles comme la γ -CD ou la β -CD, les effets sont peu importants voire nuls. Les dérivés hydroxypropylés et sulfobutylés de la β -CD n'induisent pas de modifications de la perméabilité membranaire. Les cyclodextrines

RESULTATS

méthylées, hormis la Crysmeb (dérivé faiblement substitué) provoquent une fuite de calcéine caractéristique de perturbations de l'intégrité membranaire et une modification des tailles particulières. Il a été démontré que ces perturbations pouvaient être corrélées avec l'affinité des cyclodextrines pour les constituants membranaires.

RESULTATS

1^{ère} page de la publication (consulter la référence suivante)

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. International Journal of Pharmaceutics, 338, 35-42. doi:[10.1016/j.ijpharm.2005.12.044](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.044)

RESULTATS

2^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

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. International Journal of Pharmaceutics, 338, 35-42. doi:[10.1016/j.ijpharm.2005.12.044](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.044)

RESULTATS

3^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

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. International Journal of Pharmaceutics, 338, 35-42. doi:[10.1016/j.ijpharm.2005.12.044](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.044)

RESULTATS

4^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

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. International Journal of Pharmaceutics, 338, 35-42. doi:[10.1016/j.ijpharm.2005.12.044](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.044)

RESULTATS

5^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

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. International Journal of Pharmaceutics, 338, 35-42. doi:[10.1016/j.ijpharm.2005.12.044](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.044)

RESULTATS

6^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

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. International Journal of Pharmaceutics, 338, 35-42. doi:[10.1016/j.ijpharm.2005.12.044](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.044)

RESULTATS

7^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

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. International Journal of Pharmaceutics, 338, 35-42. doi:[10.1016/j.ijpharm.2005.12.044](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.044)

RESULTATS

8^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

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. International Journal of Pharmaceutics, 338, 35-42. doi:[10.1016/j.ijpharm.2005.12.044](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.044)

Chapitre II

Effect of cyclodextrins on the viability of endothelial cells

D. Castagne, L. Belhadj Salem, L. Delattre, B. Nusgens and G. Piel

Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 57 (1-4):105-107, 2007

Special Issue : Proceedings of the XIIIth International Cyclodextrin Symposium

2 Chapitre II : Etude préliminaire de l'effet des cyclodextrines sur la viabilité de cellules endothéliales

2.1 Introduction

Pour cette étude, des cultures de cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVEC) immortalisées (lignée LT2) ont été utilisées. Ces cellules ont été incubées pendant 1 heure en présence de solutions de cyclodextrines naturelles (α -CD, β -CD et γ -CD) ou de certains de leurs dérivés (HP- α -CD, HP- β -CD, HP- γ -CD, Crysmeb, Rameb, Dimeb, Trimeb, SBE- β -CD et β -CD sulfatée) préparées par dissolution dans le milieu de culture. La viabilité des cellules en monocouches suite aux traitements par les cyclodextrines a été déterminée par une mesure indirecte du nombre de cellules adhérentes. A cette fin, l'ADN a été dosé par une méthode fluorimétrique.

2.2 Résumé des résultats

Des concentrations comprises entre 0 et 10 mM (0,0 - 0,1 - 1,0 et 10,0 mM) ont pu être testées hormis avec la β -CD (0 - 0,1 mM) pour laquelle nous avons observé une précipitation aux hautes concentrations, probablement due à la formation de complexes insolubles avec des constituants du sérum.

Pour la concentration maximale testée, soit 10 mM, la Dimeb a donné les résultats les plus défavorables sur le plan de la viabilité cellulaire puisqu'une diminution significative des quantités d'ADN a pu être mesurée (par comparaison aux conditions contrôles sans cyclodextrine) (Figure 20).

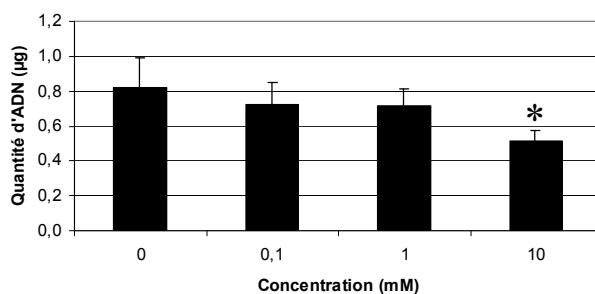


Figure 20 : Quantités d'ADN mesurées pour des cellules LT2 incubées durant 1 heure avec des solutions de Dimeb (0 - 10 mM) (n = 3) (* diminution significative)

RESULTATS

Les tests statistiques ont en effet démontré que les valeurs calculées dans le cas de la Trimeb (quantité d'ADN moyenne assez faible) et des autres cyclodextrines à cette même concentration n'étaient pas significativement différentes de celles obtenues dans les conditions contrôles (tests t de Student, risque α de 0,05).

2.3 Conclusions

A la lumière des résultats obtenus, les cyclodextrines, mises à part la Dimeb et la β -CD, peuvent être utilisées à 10 mM dans les conditions de cette étude, c'est-à-dire dans un milieu contenant du sérum durant une incubation de courte durée (1 heure), sans induire de diminution significative de la viabilité cellulaire.

Il est néanmoins possible que l'utilisation d'un milieu sans sérum, favorisant davantage les interactions cyclodextrines-composés membranaires, conduise à une cytotoxicité plus importante.

RESULTATS

1^{ère} page de la publication (consulter la référence suivante)

Castagne, D., Belhadj Salem, L., Delattre, L., Nusgens, B., Piel, G., 2007. Effect of cyclodextrins on the viability of endothelial cells, 2007. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 105-107. doi:[10.1007/s10847-006-9211-1](https://doi.org/10.1007/s10847-006-9211-1)

RESULTATS

2^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

Castagne, D., Belhadj Salem, L., Delattre, L., Nusgens, B., Piel, G., 2007. Effect of cyclodextrins on the viability of endothelial cells, 2007. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 105-107. doi:[10.1007/s10847-006-9211-1](https://doi.org/10.1007/s10847-006-9211-1)

RESULTATS

3^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

Castagne, D., Belhadj Salem, L., Delattre, L., Nusgens, B., Piel, G., 2007. Effect of cyclodextrins on the viability of endothelial cells, 2007. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 105-107. doi:[10.1007/s10847-006-9211-1](https://doi.org/10.1007/s10847-006-9211-1)

Chapitre III

Study of the cholesterol extraction capacity of β -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models

D. Castagne, M. Fillet, L. Delattre, B. Evrard, B. Nusgens and G. Piel

Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 63 (3-4):225-231, 2009

3 Chapitre III : Etude de la cytotoxicité de la β -cyclodextrine et de ses dérivés et mise en relation avec leur capacité d'extraction du cholestérol cellulaire

3.1 Introduction

Les essais suivants ont été réalisés sur des cellules HUVEC en l'absence de sérum afin d'éviter des interactions éventuelles avec ses composants et de favoriser ainsi les interactions cyclodextrines-membrane cellulaire. Les effets de la β -CD et de ses dérivés méthylés (Crysmeb, Rameb, M β -CD, Dimeb et Trimeb) ou hydroxypropylé (HP- β -CD) sur la viabilité et les taux de cholestérol cellulaires ont été évalués. Par ailleurs, une corrélation avec les résultats obtenus sur vésicules lipidiques a été établie.

3.2 Résumé des résultats

- **Effet des cyclodextrines sur la viabilité cellulaire (test au MTT)**

Des premiers essais de viabilité ont été réalisés à l'aide du test dit au « MTT ». Une diminution de la métabolisation du réactif MTT en formazan a été mesurée pour la Trimeb et la Dimeb à 10 mM. Nous avons donc limité pour les essais suivants la concentration maximale pour ces deux cyclodextrines à 5 mM. La sensibilité différente observée par rapport à l'étude précédente pourrait s'expliquer par l'utilisation de solutions de cyclodextrines sans sérum ou par le choix des cellules non immortalisées (HUVEC versus LT2).

- **Etude des capacités des cyclodextrines à extraire le cholestérol cellulaire**

Des mesures des taux de cholestérol cellulaire résiduel après incubation avec des solutions de cyclodextrines (0 à 5 ou 10 mM) ont ensuite été réalisées.

Par comparaison des résultats des dosages des protéines totales dans chaque échantillon, nous avons pu évaluer de manière indirecte le nombre des cellules résiduelles après traitement par les cyclodextrines et déterminer les concentrations permettant de garantir 100% de cellules adhérentes. Alors que l'HP- β -CD et la Crysmeb n'induisent une baisse des taux de protéines totales qu'à partir de 10 mM, une diminution se manifeste dès 5 mM dans le cas de la β -CD et de la Trimeb. Pour les autres cyclodextrines méthylées ($1,8 \leq$

RESULTATS

D.S. ≤ 2), la concentration maximale n'induisant pas de dommage a été évaluée à 1 mM. Les résultats obtenus à l'aide des tests décrits ci-dessus combinés à l'évaluation des modifications morphologiques induites observées par microscopie, nous ont permis de sélectionner les concentrations non toxiques pour les conditions testées (confirmation par des essais au bleu trypan). Suivant leur effet délétère sur l'intégrité des cellules, les cyclodextrines peuvent être classées comme suit : Dimeb \geq M β -CD \geq Rameb $>$ Trimeb \geq β -CD $>$ Crysmeb \geq HP- β -CD.

Dans cette étude, nous avons pu mesurer des diminutions des taux de cholestérol avec toutes les cyclodextrines et à toutes les concentrations testées et ce, de manière dose-dépendante. C'est la Trimeb qui semble présenter la capacité d'extraction la moins importante surtout aux faibles concentrations testées (Figure 21).

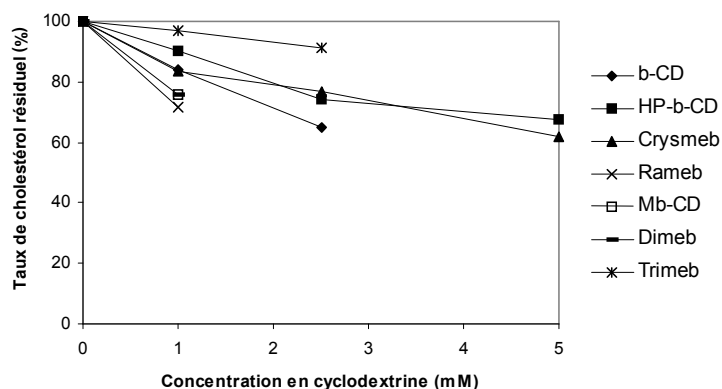


Figure 21 : Taux de cholestérol résiduel après traitement des cellules HUVEC par les cyclodextrines à des concentrations évaluées comme non toxiques (n \geq 6)

Dans un but de comparaison des capacités d'extraction, la concentration de 1 mM qui a été déterminée comme étant non toxique pour toutes les cyclodextrines, a été choisie. Des tests t de Student ont permis de comparer les résultats deux à deux (risque α de 0,05). Les dérivés peu substitués de la β -CD (Crysmeb et HP- β -CD) n'ont pas montré de différences significatives dans leur capacité d'extraction du cholestérol à 1 mM, tout comme les trois dérivés présentant des degrés de substitution proches de 2 ($1,8 \leq$ D.S. ≤ 2). Sur base des taux résiduels moyens obtenus à cette concentration, les cyclodextrines peuvent donc être classées comme suit selon leur capacité à extraire le cholestérol : Trimeb \leq HP- β -CD \leq Crysmeb = β -CD $<$ Dimeb = M β -CD \leq Rameb (Figure 21).

3.3 Conclusion

Les concentrations qui permettraient de garantir la viabilité cellulaire ont été évaluées par des essais au MTT, la détermination des quantités protéiques totales, des observations morphologiques et des tests au bleu trypan.

Les taux de cholestérol cellulaire résiduel suite au traitement par les cyclodextrines ont été mesurés et les capacités d'extraction des cyclodextrines comparées aux résultats obtenus avec les diagrammes de solubilité.

En conclusion, les résultats obtenus au niveau cellulaire confirment généralement, excepté pour la Trimeb et la β -CD, les résultats obtenus sur les membranes artificielles. Nous avons pu démontrer que les dérivés faiblement substitués permettent de maintenir l'intégrité des liposomes, sont les moins cytotoxiques et ont une affinité moindre pour le cholestérol. Des conclusions inverses ont été établies avec les dérivés méthylés de D.S. proches de 2.

RESULTATS

1^{ère} page de la publication (consulter la référence suivante)

Castagne, D., Fillet, M., Delattre, L., Evrard, B., Nusgens, B., Piel, G., 2007. Study of the cholesterol extraction capacity of β -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63, 225-231. doi:[10.1007/s10847-008-9510-9](https://doi.org/10.1007/s10847-008-9510-9)

RESULTATS

2^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

Castagne, D., Fillet, M., Delattre, L., Evrard, B., Nusgens, B., Piel, G., 2007. Study of the cholesterol extraction capacity of β -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63, 225-231. doi:[10.1007/s10847-008-9510-9](https://doi.org/10.1007/s10847-008-9510-9)

RESULTATS

3^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

Castagne, D., Fillet, M., Delattre, L., Evrard, B., Nusgens, B., Piel, G., 2007. Study of the cholesterol extraction capacity of β -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63, 225-231. doi:[10.1007/s10847-008-9510-9](https://doi.org/10.1007/s10847-008-9510-9)

RESULTATS

4^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

Castagne, D., Fillet, M., Delattre, L., Evrard, B., Nusgens, B., Piel, G., 2007. Study of the cholesterol extraction capacity of β -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63, 225-231. doi:[10.1007/s10847-008-9510-9](https://doi.org/10.1007/s10847-008-9510-9)

RESULTATS

5^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

Castagne, D., Fillet, M., Delattre, L., Evrard, B., Nusgens, B., Piel, G., 2007. Study of the cholesterol extraction capacity of β -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63, 225-231. doi:[10.1007/s10847-008-9510-9](https://doi.org/10.1007/s10847-008-9510-9)

RESULTATS

6^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

Castagne, D., Fillet, M., Delattre, L., Evrard, B., Nusgens, B., Piel, G., 2007. Study of the cholesterol extraction capacity of β -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63, 225-231. doi:[10.1007/s10847-008-9510-9](https://doi.org/10.1007/s10847-008-9510-9)

RESULTATS

7^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

Castagne, D., Fillet, M., Delattre, L., Evrard, B., Nusgens, B., Piel, G., 2007. Study of the cholesterol extraction capacity of β -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63, 225-231. doi:[10.1007/s10847-008-9510-9](https://doi.org/10.1007/s10847-008-9510-9)

RESULTATS

8^{ème} page de la publication (consulter la référence suivante)

Castagne, D., Fillet, M., Delattre, L., Evrard, B., Nusgens, B., Piel, G., 2007. Study of the cholesterol extraction capacity of β -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63, 225-231. doi:[10.1007/s10847-008-9510-9](https://doi.org/10.1007/s10847-008-9510-9)

Chapitre IV

Effect of β -cyclodextrin and its derivatives on caveolae disruption, relationships with their cholesterol extraction capacities

D. Castagne, B. Evrard, B. Nusgens, G. Piel

Manuscrit soumis (Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry)

4 Chapitre IV : Effets de la β -cyclodextrine et de ses dérivés sur la déstructuration des cavéoles

4.1 Introduction

Cette étude s'est intéressée aux effets de la β -cyclodextrine et de ses dérivés méthylés sur la déstructuration des microdomaines membranaires de cellules endothéliales. Puisqu'ils contiennent de fortes proportions en sphingolipides et en cholestérol, les radeaux lipidiques et cavéoles peuvent être isolés dans les fractions légères de gradients de densité. L'isolement des microdomaines a été réalisé par l'utilisation d'une méthode sans détergent et de gradients de saccharose discontinus (5/35/45%). Les microdomaines doivent théoriquement se concentrer à l'interface des solutions à 5 et 35% après ultracentrifugation. La détection d'un marqueur des cavéoles (la protéine cavéoline-1) dans les fractions de gradients récupérées ensuite, a été utilisée pour déterminer l'influence d'un traitement par les cyclodextrines.

4.2 Résumé des résultats

- **Détermination de l'interaction éventuelle des cyclodextrines avec les phospholipides**

Des essais préliminaires ont permis de montrer que les cyclodextrines, utilisées sur des cellules HUVEC dans les conditions sélectionnées dans l'étude précédente, n'induisent pas de diminution significative des quantités de phospholipides, confirmant leur spécificité vis-à-vis du cholestérol (Figure 22).

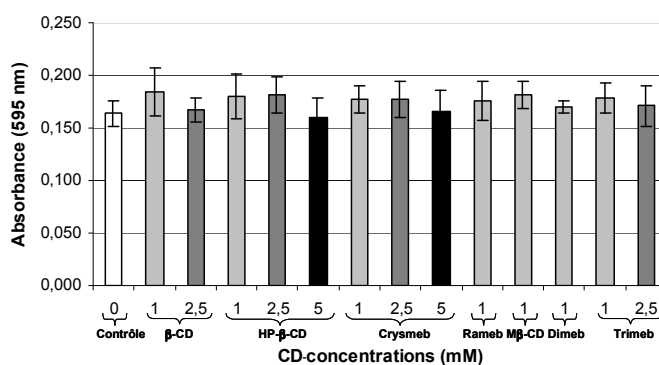


Figure 22 : Evaluation de l'effet des cyclodextrines sur les quantités de phospholipides de cellules HUVEC par un essai colorimétrique (n ≥ 9).

RESULTATS

▪ Effets de la β -cyclodextrine et de ses dérivés sur la déstructuration de microdomaines membranaires

La suite du travail s'est intéressée à l'étude de la déstructuration des cavéoles de cellules endothéliales humaines (HUVEC) ou bovines (ABAEC) traitées par des cyclodextrines (à 0, 1 et/ou 10 mM).

Pour valider la méthode de fractionnement utilisée, des mesures de densités des solutions et des fractions de gradients de saccharose ont été réalisées. Nous avons pu déterminer quelles étaient les fractions les plus légères et où se situait l'interface 5/35% en saccharose.

Le traitement des cellules HUVEC par l'outil généralement utilisé pour l'étude des microdomaines, c'est-à-dire la M β -CD, s'est avéré plus efficace à 10 mM qu'à 1 mM. La concentration de 10 mM, par ailleurs couramment utilisée dans la littérature, a donc été choisie pour la suite des expériences.

En comparant le résultat d'un traitement des deux types de cellules par la Dimeb, nous avons pu démontrer que l'effet sur les cellules ABAEC était plus marqué puisqu'une accumulation de la cavéoline-1 a été observée dans le fond du gradient.

Les cellules bovines ont donc été utilisées pour l'étude comparative des capacités de déstructuration des cavéoles par différentes cyclodextrines (Figure 23).

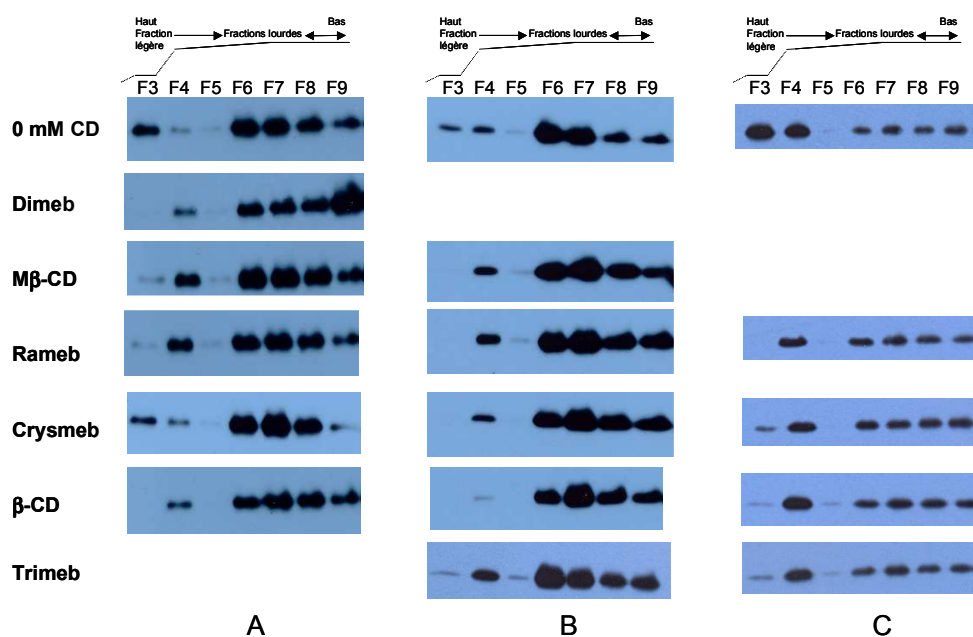


Figure 23 : Comparaison de l'effet du traitement de cellules ABAEC par des solutions de cyclodextrines à 10 mM lors de 3 expériences indépendantes (A, B ou C).

Quelle que soit la cyclodextrine testée, nous avons pu mettre en évidence un déplacement de la cavéoline-1 des fractions légères vers des fractions plus lourdes par rapport aux conditions contrôles, ce qui est caractéristique d'une déstructuration des cavéoles. L'effet le plus important a été obtenu avec la Dimeb puisque la cavéoline-1 n'est plus détectable dans la fraction légère et qu'elle s'accumule dans le fond du gradient. La β -CD et les cyclodextrines présentant un degré de méthylation légèrement inférieur à 2, c'est-à-dire la Rameb et la M β -CD, ont un effet moins marqué. Ces deux dernières donnent par ailleurs des résultats similaires. La Crysmeb et la Trimeb ayant montré dans les études précédentes une capacité d'extraction du cholestérol cellulaire faible, semblent avoir le moins d'effet sur la déstructuration des cavéoles. Nous avons en effet pu mesurer dans le cas du traitement par ces cyclodextrines, des quantités résiduelles moyennes de cavéoline-1 plus importantes dans la fraction où se localiseraient les cavéoles (fraction légère) par rapport aux autres cyclodextrines testées.

4.3 Conclusions

Dans les conditions expérimentales de notre étude, les effets des cyclodextrines semblent devoir être attribués exclusivement à l'extraction du cholestérol.

Des essais préliminaires nous ont permis de sélectionner la concentration et les cellules les plus appropriées pour comparer les capacités de déstructuration des cavéoles par différentes cyclodextrines. La β -CD et les dérivés méthylés ayant un D.S. proche de 2 ($1,8 \leq \text{D.S.} \leq 2$) induisent un déplacement de la cavéoline-1 vers les fractions lourdes de gradients de densité, caractéristique d'une déstructuration. L'effet le plus important a été obtenu avec la Dimeb alors que Crysmeb et la Trimeb seraient moins efficaces comme le laissait présager leur faible capacité d'extraction du cholestérol.

Effect of β -cyclodextrin and its derivatives on caveolae disruption, relationships with their cholesterol extraction capacities

Delphine Castagne^{a,*}, Brigitte Evrard^a, Betty Nusgens^b, Géraldine Piel^a

^a *Laboratory of Pharmaceutical Technology, CIRM, University of Liège, 1 av. de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium*

^b *Laboratory of Connective Tissues Biology, GIGA-R, University of Liège, 3 av. de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium*

Abstract

Endothelial cells (HUVEC) were treated with β -cyclodextrin (β -CD) and hydroxypropylated or methylated derivatives solutions to confirm their lack of affinity with phospholipids and their specificity towards cholesterol. Further studies were performed on bovine aortic endothelial cells to assess the effect of β -CDs (mainly methylated derivatives) on membrane microdomains (lipid rafts or caveolae), by detecting the caveolae marker caveolin-1 in fractions of sucrose gradients. A displacement from the lighter to the heavier fractions, characteristic of caveolae disruption, was observed using CDs. The strongest effect was obtained with dimethyl- β -CD, for which an accumulation of caveolin-1 was observed in the bottom of the gradient. Crysmeb[®] and trimethyl- β -CD seemed to have the weaker effects as a significative amount of caveolin-1 was still detected in the light fraction corresponding to caveolae. β -CD and CDs having a degree of methylation a bit lower than 2 showed intermediate effects. The results of the present study on microdomains seem in good correlation with the cell cholesterol extraction capacities of CDs previously determined.

Keywords: Cyclodextrins, endothelial cells, lipid rafts, caveolae, cholesterol, phospholipids

1. Introduction

For years, the fluid mosaic model of Singer and Nicolson has provided the foundation of our understanding of the structure of cellular membranes [1]. Recently, this model was challenged by the concept of "lipid rafts" supported by findings of detergent insoluble membrane fragments more concentrated in certain lipids like sphingomyelin and cholesterol [2]. Caveolae are small plasma-membrane invaginations of similar lipid composition. The invaginated structure of caveolae seems to be stabilized by the protein caveolin-1 [3]. Caveolae domains are found in most cell types, particularly in terminally differentiated cells such as adipocytes, muscle cells and endothelial cells [4]. Lipid rafts and caveolae were shown to represent membrane compartments enriched in a large number of signalling molecules whose structural integrity is essential for many signalling pathways [5]. These microdomains seem to be involved in many biological processes mediated by various receptors [6].

Cyclodextrins (CDs), due to their affinity with hydrophobic molecules, are used to modulate membrane cholesterol levels [7,8]. For this purpose some CDs have been widely used namely β -CD or its derivatives (this group will be called β -CDs). Numerous studies have shown that exposing cells to β -CDs results in removal of cellular cholesterol at a rate depending on the concentration, incubation time, temperature and type of cells [9]. It is important to note that their efficiency is also dependent on the derivative used (methyl- β -CD was shown to be more efficient compared to hydroxypropylated derivatives) [7-9] explaining why methyl- β -CD is the most currently used tool in cell biology to study lipid rafts and caveolae [10,11]. Various methylated derivatives differently substituted are commercially available. In a previous study, we have shown that the cholesterol extraction capacity was also dependent on the degree of substitution (DS) [12]. Indeed, the low substituted derivative Crysmeb[®] (as well as trimethyl- β -CD) presented lower affinity for cholesterol while derivatives with DS around 2 were more effective. This previous study should predict the potentiality of these molecules to induce changes in cellular functions.

*Corresponding author. Tel.: +32-4-366-4510; fax: +32-4-366-4302
E-mail address: dcastagne@ulg.ac.be (Delphine Castagne)

The present work will focus on investigating the effect of β -CDs on caveolae and try to evaluate the relation with the cholesterol extraction capacities of different methylated derivatives.

Because there is not enough consistent information to predict the impact of β -CDs on the non-cholesterol lipid components of the membrane [9], preliminary assays will be performed with different derivatives in order to confirm their specificity towards cholesterol.

As they contain high levels of sphingolipids and cholesterol, lipid rafts and caveolae are low density membrane domains [13]. To isolate these microdomains, different approaches are possible. They can be extracted from other cellular material, generally based on their relative insolubility in certain detergent or nondetergent conditions. They are then isolated by virtue of their high buoyancy when centrifuged on a density gradient consisting either of sucrose or Optiprep[®] [4,14]. A conventional method to prepare lipid rafts uses Triton[®] X-100 at low temperature (4°C) but a variety of other detergents have been proposed including Nonidet[®] P40, octylglucoside, CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), Lubrol[®] WX or PX and Brij[®] 56, 96, or 98 [13,15]. Several methods have been established to isolate rafts from cells fractionated in the absence of detergent. Among these, Song et al. [16] recovered cells in a pH 11 sodium carbonate buffer. Following sonication of the lysate, the rafts are isolated by centrifugation on a discontinuous 5/35/45% sucrose gradient where they concentrate at the 5 and 35% sucrose interface [13,15,16].

This relatively easy detergent-free procedure, associated with caveolin-1 detection in the fractions obtained after ultracentrifugation, will be used here to assess the effect of CD treatment on endothelial cells microdomains. By reducing cholesterol levels, CDs could lead to the disruption of rafts [17] or caveolae, interfere with processes involving these microdomains and have thus biological and potential medical applications [6].

2. Experimental

2.1. Materials

β -cyclodextrin (β -CD) and dimethyl- β -cyclodextrin (Dimeb; D.S. 2.0) were kindly donated by Cyclolab (Budapest, Hungary). Hydroxypropylated β -cyclodextrin (HP- β -CD; D.S. 0.61) and Kleptose[®] Crysmeb (Crysmeb; D.S. 0.5) were given by Roquette Frères (Lestrem, France). Randomly methylated β -cyclodextrin (Rameb; D.S. 1.8) was offered by Wacker-Chemie GmbH (Munich, Germany). Methyl- β -CD (M β -CD; D.S. 1.9) and trimethyl- β -cyclodextrin (Trimeb, from Fluka; D.S.

3.0) were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium).

Adult bovine aortic endothelial cells (ABAEC) were a kind gift from the Molecular Biology and Genetic Engineering Unit of the University of Liège. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from Lonza (Verviers, Belgium) as well as foetal calf serum (FCS), non-essential amino acids (NEAA), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose with Ultraglutamine and phosphate buffer saline (PBS). MCBD 131 culture medium, L-glutamine and penicillin-streptomycin were from Gibco[®]-Invitrogen. The endothelial cell growth supplement (ECGS) was purchased from Becton Dickinson Biosciences and basic recombinant mouse fibroblast growth factor (bFGF) from R&D Systems. Gentamicin (Geomycine[®]) was obtained from Schering-Plough and amphotericin B (Fungizone[®]) from Bristol-Myers Squibb. Concerning secondary antibodies, polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins/HRP and Alexa Fluor[®] 488 goat anti-rabbit IgGs were respectively from Dako Cytomation (Carpinteria, USA) and Molecular Probes[®]. All other chemicals and cell culture reagents were purchased from Sigma Aldrich (Bornem, Belgium) or Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Cell culture

HUVEC were grown on 2% pork skin gelatin-coated culture dishes in MCBD 131 medium supplemented with 20% FCS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 25 μ g/ml gentamicin, 0.5 μ g/ml amphotericin B, 50 μ g/ml ECGS and 7 U/ml heparin. They were used at passages between 2 and 6.

ABAEC were grown in DMEM high glucose with Ultraglutamine supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 1% NEAA and 1 ng/ml bFGF. They were used at passages not higher than 11.

Cells were maintained in a humidified 5% CO₂ and 95% air atmosphere at 37°C and supplied with fresh medium every 2 or 3 days.

2.3. Cyclodextrin treatments

CD test solutions were prepared by dissolution in serum- and growth supplement-free medium. CD mass was corrected for water content when calculating the molarity using a Mettler DL 35 Karl-Fischer titrator. The solutions were sterilized by filtration in aseptic conditions.

Each condition was tested on one 10 cm dish of cultured cells grown to near confluence : 10 ml of CD solutions were applied on cell monolayers for a 1 hour incubation. The cells were rinsed twice on ice with PBS before further analysis.

2.4. Phospholipids measurements

As well as for cholesterol measurements, the Folch's method, using chloroform/methanol at a 2:1 volume ratio [12,18], gave good results for phospholipids extraction in HUVEC. The cells were scraped in ice-cold PBS, centrifuged at 1000 rpm and the resulting pellet was homogenized in 500 μ l of distilled water by sonication. Phospholipids were extracted with the organic solvent mixture from a volume of cell lysate corresponding to 150 μ l (at least in duplicate). After centrifugation at 4000 rpm, the organic phase was collected and evaporated to dryness. The phospholipids contents were evaluated by an enzymatic method (LabAssay Phospholipid, choline oxidase - DAOS method, Wako Chemicals, Neuss, Germany). Using this colorimetric assay, phospholipids are hydrolyzed to choline in a reaction catalyzed by phospholipase D. The oxidation of choline in betaine by choline oxidase leads to a quantitative production of hydrogen peroxide, which causes DAOS (N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline sodium salt) and 4-Aminoantipyrine to undergo an oxidative condensation catalyzed by peroxidase, producing a blue pigment. The absorbance of the blue color is thus proportional to phospholipids contents. This assay was successfully used for microplate reading using a Labsystems Multiskan MS microplate reader at 595 nm.

2.5. Rafts/caveolae isolation

The hyperosmotic carbonate method, a detergent free method described by Song [16] was used for caveolae isolation with minor modification [4,14]. The cells were scraped into 2.5 ml of 0.5 M sodium carbonate containing protease inhibitors and transferred to a prechilled Potter homogenizer to be homogenized with 20 strokes on ice. They were then homogenized in a glass tube using the Ultra-Turrax[®] T25 basic (IKA[®]-Werke, Staufen, Germany) equipped with a S 25 N - 10 G dispersing tool (three 20 sec bursts at medium speed). This step was followed by sonication (three 20 sec bursts at 50% of maximal power) and an aliquot of the homogenate was taken for protein determination using the Lowry technique according to the manufacturer's instructions (*DC* Protein Assay Kit[®], BioRad). In Seton open-top polyallomer centrifuge tubes (14 x 95 mm) (Science Services, Munchen, Germany), 0.5 M sodium carbonate solution was added to determined volumes of lysates in order to obtain similar protein contents in 2 ml. The resulting dilutions were brought to 45% sucrose by the addition of 2 ml of 90% sucrose in MES buffered saline (MBS : 25 mM MES, pH 6.5 and 150 mM NaCl) and overlaid with two layers of 35% and 5% sucrose in MBS containing 0.25 M carbonate (4 ml each). The gradient was then

centrifuged using a SW 40 Ti rotor in a Beckman L8-70 Ultracentrifuge (38 000 rpm for 16h).

2.6. Gradient fractionation

For analysis of the resulting gradients, fractions were recovered from the top to the bottom of the centrifuge tubes using the Piston Gradient Fractionator of a BioComp Gradient Station (BioComp Instruments, Fredericton, Canada). With this technology, a piston is forced into the tube from above and it seals against its inside wall, forcing the gradient out of the tube layer by layer. The size of the collected fractions is determined by the length of the piston stroke. A low motor velocity was chosen (0.2 mm/sec) in order to avoid perturbations of the gradient and fractions were recovered every 10 mm. The collection system was cleaned out between each fraction. Eight fractions of equal volumes and a "bottom" fraction, corresponding to the end of the tube, were taken.

2.7. Western Blotting

Detection of caveolin-1, a 21-24 kDA marker protein of the caveolae structures, was performed after the gradient separation. Each fraction was diluted in threefold concentrated Laemmli sample buffer, heated and resolved by SDS-PAGE using 15% polyacrylamide gels. The proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes by electroblotting. Membranes were blocked by nonfat dry milk (3% in PBS-Tween[®] 20 buffer) before a 1 hour incubation at room temperature with the anti-caveolin-1 antibody dilution (1:5000 in blocking buffer). Immunoreactive bands were revealed after a 1 hour incubation with horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit antibody and the signals were detected by chemiluminescence using an ECL Western Blotting Analysis System (Thermo Fisher Scientific) and x-ray film exposure. For semi-quantitative analysis of protein levels, densitometry was performed on digital images obtained from western blots using the Bio-Rad Quantity one 4.6 Software. The amount of caveolin-1 in each fraction was expressed in percentages (%) of the sum of the values measured in each fraction taken as 100%.

2.8. Immunofluorescence staining

HUVEC cells were seeded on gelatin-coated glass coverslip in a 12-well plate (25,000 cells/well). After overnight incubation, they were fixed in paraformaldehyde 2% in PBS for 20 min and permeabilized with 0.1% Triton[®] X-100 in PBS for 10 min. The coverslip was then exposed for 1 hour to a 1:200 dilution of the anti-caveolin-1 antibody (in 1% bovine serum albumin) and after to the labelled secondary antibody dilution (1:1000 anti-rabbit Alexa Fluor[®] 488, 1 hour). After washing,

RESULTATS

the coverslip was mounted with Aqua-Poly/Mont (Polysciences) and viewed with a fluorescence microscope using the appropriate filter (Axiovert 25, Zeiss).

3. Results and discussion

In order to evaluate the potential effects of CDs on the extraction of cell membrane lipids other than cholesterol, the LabAssay Phospholipid kit was used to assess the phospholipids contents in HUVEC cells. This assay allows the simultaneous determination of different components (phosphatidylcholine, sphingomyelin and lysolecithin). Preliminary assays were performed on an increasing number of cells in order to evaluate the efficiency of the phospholipids extraction protocol. A linear response was obtained with the colorimetric assay confirming that phospholipids were completely extracted by the solvent mixture (Fig. 1).

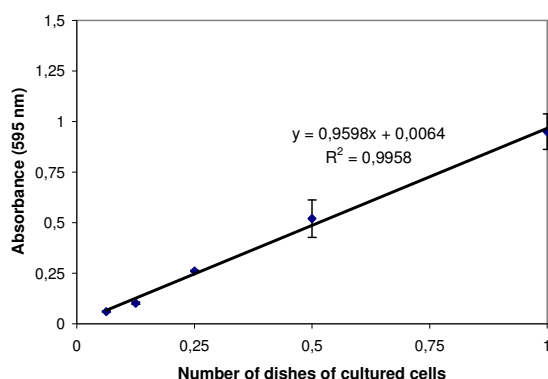


Fig. 1 Phospholipid assay after extraction by the Folch's method on increasing HUVEC cell number (n = 2)

Compared to the previously described protocol for cholesterol measurements [12], relatively high absorbance values were obtained with low cell number, allowing to perform the following analyses on smaller quantity of cell lysates. The different CD concentrations tested here were chosen according to previous results [12]. This previous study allowed us to select the concentrations that did not induce cell loss by detachment after treatment (recovery of 100% total protein). When compared to the control condition (0 mM CD), none of the β -CDs and concentration used here induced a significant decrease in the phospholipids measurements (Fig. 2). These results seem to be in contradiction with those obtained by phase solubility diagrams as Dimeb and to a lower extent Rameb were able to solubilize phosphatidylcholine [19] but these experiments were performed on purified lipids, a condition far from the complexity of the lipid mixtures in cell membrane. The results of the

present study suggest a lack of affinity for phospholipids compared to cholesterol in the tested conditions (i.e. the type of CDs and the very short incubation period used).

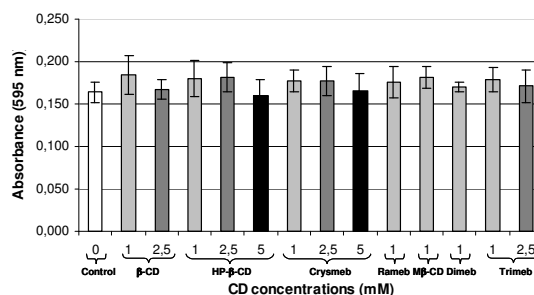


Fig. 2 Phospholipids determination in HUVEC cells after treatment with different CDs and concentrations (n \geq 9)

The inner cavity of β -CD, and as a consequence of its derivatives, should not be as suitable as the smallest CD (α -CD) to interact with phospholipids [20]. Other studies which compared the effect of natural CDs on phospholipids removal from cell [21,22], found that α -CD was actually the most efficient. A number of studies reported only minimal release of phospholipids from cell membranes under exposure to CDs [9]. For instance, Kilsdonk et al. [8] observed that a maximum of 2% of cellular phospholipids were released from L-cells when using methyl- β -CD but with relatively high concentration and long incubation period (5 mM for 4 hours) while no measurable phospholipid was detected in the media with a 10 mM HP- β -CD solution for 2 hours. Niu et al. [23] noted that the amount of phospholipids extracted from rod outer segment disk membranes became significant at concentrations of methyl- β -CD above 15 mM. Differences between the protocols used could also explain the better results obtained in some cases. As an example, β -CD was able to extract up to about 25% phospholipids from erythrocytes [21] but the study was performed in suspension allowing better interactions contrary to experiments performed on cells in monolayer. In papers reporting high efficiency [22,24], phospholipids measurements were done in the CD solutions incubated with cells, a procedure which differs from the present method that evaluated the cellular phospholipids contents. By determining lipids released in the incubation buffer, no difference can be done between the amounts extracted by CDs or due to cell detachment and/or lysis. Particular attention is essential when comparing results as some authors consciously used toxic concentrations to study the release of phospholipids from cells [22]. Finally, results obtained on enterocytes [25] are consistent with

RESULTS

ours as methyl- β -CD removed the major part of microvillar cholesterol without affecting the membrane contents of phospholipids. Despite the contradictions, all the authors are in accordance with the potency of β -CDs to preferentially extract cholesterol from cell membranes. Their high specificity towards cholesterol should explain their potential implication in lipid raft disruption as it has extensively been described in the literature for methyl- β -CD.

The next step was to try to evaluate the effect of different β -CDs, especially the methylated derivatives, on membrane microdomains in order to assess the impact of the substitution on their disruption.

A detergent-free method using sodium carbonate was chosen to study caveolae which can be detected by their specific marker protein (caveolin-1). According to the literature caveolae should be located, due to their enriched composition in cholesterol, in the light fractions of density gradients [14,26]. Discontinuous sucrose gradients were obtained by overlaying 3 solutions of different concentrations (45, 35 and 5% m/V sucrose) in centrifuge tubes. The densities of the 3 stock solutions were evaluated experimentally by weighting known volumes and calculations were performed in order to obtain values in mg/ml. The densities of 9 fractions (noted F1 to F9 from top to bottom) prepared without sample and recovered after ultracentrifugation as described above were also evaluated and compared to fractions obtained before ultracentrifugation (Fig. 3). The figure shows that the ultracentrifugation step does not induce any perturbation of the gradient which remains discontinuous. Caveolae should be located at the interface between 5 and 35% sucrose as stated before. According to the density measurements illustrated in Fig. 3, we were able to determine the localization of this interface (when using our fractionation protocol) in the fraction F3. Moreover, by comparison to the value obtained for the 35% sucrose stock solution, it can be stated that F4 belongs to the heavier fractions.

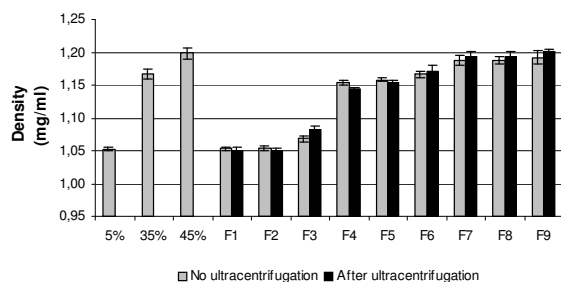


Fig. 3 Densities of sucrose stock solutions (left part) and of their resulting fractions (before and after ultracentrifugation) (right part)

The first experiment was performed using HUVEC cells treated or not with the methylated β -derivative generally used in cell biology experiments (Fig. 4). M β -CD was used at 0, 1 or 10 mM. No caveolin was detected in the top of the tubes (fractions F1 and F2, not shown) confirming the localization of caveolae at the interface between lighter and heavier fractions.

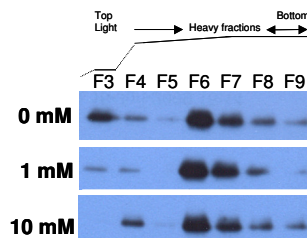


Fig. 4 Effects on caveolae for HUVEC cells treated with M β -CD solutions (0, 1 and 10 mM)

Even in control conditions (0 mM CD), caveolin is not only present in the light fractions but also found in the heavier ones suggesting a probable intracellular localization of the protein. To confirm this hypothesis, immunofluorescence staining was performed on untreated HUVEC cells using the Alexa Fluor[®] 488 conjugated secondary antibody to detect the anti-caveolin-1 antibody (Fig. 5).

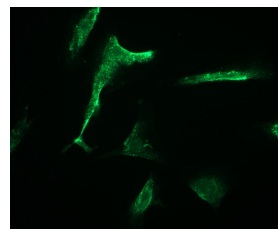


Fig. 5 Immunofluorescence staining of caveolin-1 in HUVEC cells (40x magnification)

As shown on the figure, caveolin-1 is both membrane-associated and localized inside the cells [5]. It has indeed been reported to be present in multiple subcellular locations [27]: the presence of non-caveolar pools of caveolin in recycling endosomes, the trans-Golgi network and in mobile chaperone complexes is now recognized [28]. Structures containing caveolin-1 are found in endothelial cells including detached plasmalemmal vesicles and tubular-vesicular channels [29]. Despite these considerations, the first assay showed a little displacement from F3 to the heavier fractions when using M β -CD at 1 mM, the effect being slightly more pronounced with 10 mM (Fig. 4). This concentration, generally used in the literature to study lipid rafts, was thus chosen for the further trials.

RESULTATS

In a second experiment, Dimeb, another CD exhibiting also good cholesterol extraction capacity was used in order to evaluate its potential stronger effect on another cell line. As a matter of fact, Labrecque et al. [4] reported good results on caveolae disruption when using bovine aortic endothelial cells (BAEC) and the hyperosmotic carbonate method. The Fig. 6 illustrates the results obtained on HUVEC and ABAEC cells. A displacement to the heavier fractions was observed, the stronger effect being obtained with ABAEC. Indeed, 10 mM Dimeb solution induced an accumulation of caveolin-1 in the bottom of the tube for ABAEC cells. This stronger effect obtained using bovine cells prompted us to use the ABAEC cell line for the following experiments.

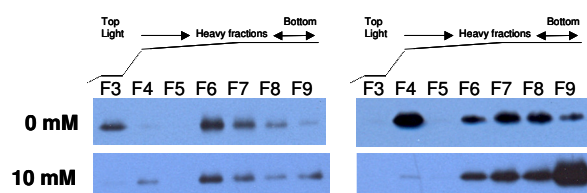


Fig. 6 Effects on caveolae for HUVEC (left part) versus ABAEC cells (right part) treated with Dimeb solutions (0 and 10 mM)

The different methylated β -CDs were thus tested on ABAEC cells at 10 mM. The results of 3 independent experiments (A, B or C) performed on this cell line are presented in Fig. 7.

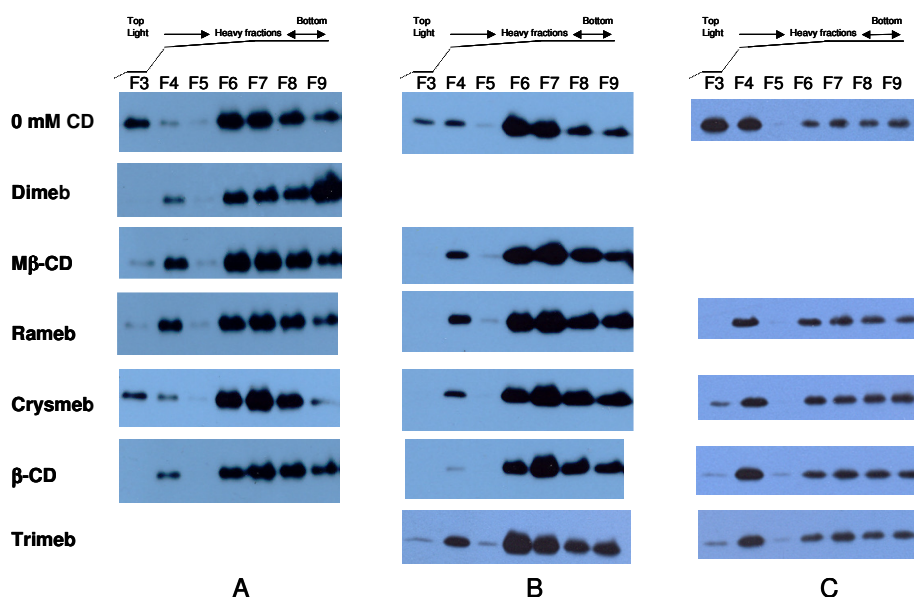


Fig. 7 Effects on caveolae for 3 independent experiments on ABAEC cells (A, B and C) : comparison of treatments with a control solution (0 mM) versus 10 mM CD solutions

In absence of CD, a significant amount of caveolin-1 was detected in the light fraction F3 corresponding to caveolae localization (Table 1). If we consider each series independently by comparison with the control condition, the CDs induced in each case a displacement from the low (F3) to higher density fractions which is characteristic of caveolae disruption (Fig. 7). The drastic effect of Dimeb already observed in Fig. 6, was confirmed in the experiment A. Although less remarkable, a displacement from the light fraction to the heavier ones was also shown for β -CD, M β -CD and Rameb, the two latter ones giving very similar signal patterns (Fig. 7) as confirmed by the semi-quantification of the immunoreactive protein bands (Table 1). This finding indicates that the methyl- β -CD supplied by Sigma is a randomly methylated β -CD and that Rameb or M β -CD could be used as well to obtain similar results. The CDs having lower cholesterol extraction capacities [12], namely Crysmeb and Trimeb, seem to have weaker effects on caveolae disruption as shown in Fig. 7. When comparing to the other CDs, a significant amount of caveolin-1 could be detected in the light fraction F3 (Table 1). The semi-quantitative analysis of caveolin-1 signals in fractions F3 to F9 for the 3 experiments performed on ABAEC cells is shown in Table 1. The results are expressed in each fraction as the percentage of the total amount of caveolin-1 in the sample. These quantifications carried out on the blots from Fig. 6 and 7 for Dimeb confirm the strong effect of this CD for which no caveolin-1 was detected in F3 but high amount was actually displaced to the last fraction F9.

Table 1. Distribution (in % of total) of caveolin-1 in fractions F3 to F9 in ABAEC cells (n ≥ 2)

CD	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Control (0 mM CD)	18,9 ± 13,4	12,3 ± 11,7	0,3 ± 0,5	21,9 ± 12,3	20,2 ± 7,6	14,8 ± 5,7	11,6 ± 2,0
Dimeb (D.S. 2)	0,0 ± 0,0	4,6 ± 4,0	0,0 ± 0,0	19,1 ± 3,6	22,2 ± 4,8	16,7 ± 4,2	37,4 ± 1,3
Mβ-CD (D.S. 1,9)	1,1 ± 1,6	14,1 ± 3,6	0,0 ± 0,0	26,6 ± 0,9	28,1 ± 4,7	22,5 ± 0,7	7,5 ± 0,8
Rameb (D.S. 1,8)	0,4 ± 0,7	19,2 ± 7,0	0,2 ± 0,3	21,5 ± 2,6	24,6 ± 2,7	19,7 ± 2,3	14,3 ± 6,2
Crysmeb (D.S. 0,5)	4,1 ± 3,2	11,7 ± 11,1	0,0 ± 0,0	22,5 ± 6,9	27,7 ± 9,8	19,9 ± 3,8	14,1 ± 10,9
β-CD (D.S. 0)	0,6 ± 1,0	14,3 ± 14,7	0,4 ± 0,8	18,9 ± 4,3	27,8 ± 8,3	22,9 ± 4,8	15,0 ± 0,6
Trimeb (D.S. 3)	3,2 ± 2,1	21,5 ± 10,2	0,7 ± 1,0	21,9 ± 10,4	21,2 ± 0,4	14,4 ± 0,6	17,2 ± 2,7

Mβ-CD, Rameb and β-CD, as shown in Fig. 7 and Table 1, also induced a displacement of caveolin-1 from F3 to heavier fractions although much less marked than Dimeb. Trimeb and Crysmeb did not induce as strong effects as the other methylated CDs since some caveolin was still present in F3 (Table 1) while the percentages for Mβ-CD, Rameb, β-CD or Dimeb treatments were close or equal to 0%. The results of the present study on microdomains seem in good correlation with the cell cholesterol extraction capacities of CDs that we previously determined [12]. As a matter of fact, the methylated CDs which induced weak cell cholesterol depletions, namely Crysmeb and Trimeb, did not induce such high caveolae disruption at 10 mM.

4. Conclusion

Preliminary phospholipids assays performed on HUVEC cells showed that β-CDs display a specificity towards cholesterol in our tested conditions as no significant decrease in the cellular phospholipids measurements could be observed. Concerning their caveolae disruptive capacity, first trials allowed the authors to select the most appropriate CD concentration and endothelial cell line to compare the effect of β-CDs (mainly methylated derivatives). Using methylated CDs a displacement to the heavier fractions of sucrose gradients was observed, which is characteristic of caveolae disruption, the stronger effect being obtained with Dimeb. Crysmeb and Trimeb seemed to have weaker effects which is in agreement with their low cholesterol extraction abilities.

This work enabled to predict the potentiality of β-CDs to induce changes in raft-related cellular functions and to select the better derivatives for future studies. A perspective should be to investigate their effect on proteins co-localized with caveolin-1 in endothelial caveolae i.e. a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGFR-2) implicated in angiogenesis. CDs could thus represent a new potential therapeutic strategy for inhibiting angiogenesis.

Acknowledgements

The authors are grateful to Laurence Collard from the Laboratory of Pharmaceutical Technology, University of Liège, for her technical support during the phospholipids measurements.

References

1. Pike, L.J.: Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **44**, 655-667 (2003).
2. Prenner, E., Honsek, G., Honig, D., Mobius, D., Lohner, K.: Imaging of the domain organization in sphingomyelin and phosphatidylcholine monolayers. *Chem. Phys. Lipids* **145**, 106-118 (2007).
3. Pike, L.J.: Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* **378**, 281-292 (2004).
4. Labrecque, L., Royal, I., Surprenant, D.S., Patterson, C., Gingras, D., Beliveau, R.: Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol. Biol. Cell* **14**, 334-347 (2003).

5. Quest, A.F., Leyton, L., Parraga, M.: Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem. Cell Biol.* **82**, 129-144 (2004).
6. Barenholz, Y.: Sphingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and rafts to potential medical applications. *Subcell. Biochem.* **37**, 167-215 (2004).
7. Christian, A.E., Haynes, M.P., Phillips, M.C., Rothblat, G.H.: Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.* **38**, 2264-2272 (1997).
8. Kilsdonk, E.P., Yancey, P.G., Stoudt, G.W., Bangerter, F.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C., Rothblat, G.H.: Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* **270**, 17250-17256 (1995).
9. Zidovetzki, R., Levitan, I.: Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1768**, 1311-1324 (2007).
10. Barnes, K., Ingram, J.C., Bennett, M.D., Stewart, G.W., Baldwin, S.A.: Methyl-beta-cyclodextrin stimulates glucose uptake in Clone 9 cells: a possible role for lipid rafts. *Biochem. J.* **378**, 343-351 (2004).
11. Huang, P., Xu, W., Yoon, S.I., Chen, C.G., Chong, P.L.G., Liu-Chen, L.Y.: Cholesterol reduction by methyl-beta-cyclodextrin attenuates the delta opioid receptor-mediated signaling in neuronal cells but enhances it in non-neuronal cells. *Biochem. Pharmacol.* **73**, 534-549 (2007).
12. Castagne, D., Fillet, M., Delattre, L., Evrard, B., Nusgens, B., Piel, G.: 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 (2009).
13. Macdonald, J.L., Pike, L.J.: A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J. Lipid Res.* **46**, 1061-1067 (2005).
14. Ostrom, R.S., Insel, P.A.: Methods for the study of signaling molecules in membrane lipid rafts and caveolae. *Methods Mol. Biol.* **332**, 181-191 (2006).
15. Thomas, S., Suman, R.K., Brumeau, T.D.: Role of lipid rafts in T cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **52**, 215-224 (2004).
16. Song, K.S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L.A., Sargiacomo, M., Lisanti, M.P.: Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J. Biol. Chem.* **271**, 9690-9697 (1996).
17. Bang, B., Gniadecki, R., Gajkowska, B.: Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **14**, 266-272 (2005).
18. Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509 (1957).
19. Piel, G., Piette, M., Barillaro, V., Castagne, D., Evrard, B., Delattre, L.: Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes. *Int. J. Pharm.* **338**, 35-42 (2007).
20. Bernat, V., Ringard-Lefebvre, C., Le Bas, G., Lesieur, S.: Action of alpha-cyclodextrin on phospholipid assemblies. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 113-119 (2007).
21. Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K., Pitha, J.: Differential-Effects of Alpha-Cyclodextrins, Beta-Cyclodextrins and Gamma-Cyclodextrins on Human-Erythrocytes. *European Journal of Biochemistry* **186**, 17-22 (1989).
22. Monnaert, V., Tilloy, S., Bricout, H., Fenart, L., Cecchelli, R., Monflier, E.: Behavior of alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrins and their derivatives on an in vitro model of blood-brain barrier. *Pharmacol. Exp. Ther.* **310**, 745-751 (2004).
23. Niu, S.L., Mitchell, D.C., Litman, B.J.: Manipulation of cholesterol levels in rod disk membranes by methyl-beta-cyclodextrin. Effects on receptor activation. *J. Biol. Chem.* **277**, 20139-20145 (2002).
24. Ottico, E., Prinetti, A., Prioni, S., Giannotta, C., Basso, L., Chigorno, V., Sonnino, S.: Dynamics of membrane lipid domains in neuronal cells differentiated in culture. *J. Lipid Res.* **44**, 2142-2151 (2003).
25. Hansen, G.H., Immerdal, L., Thorsen, E., Niels-Christiansen, L.L., Nystrom, B.T., Demant, E.J.F., Danielsen, E.M.: Lipid rafts exist as stable cholesterol-independent microdomains in the brush border membrane of enterocytes. *J. Biol. Chem.* **276**, 32338-32344 (2001).
26. Bender, F., Montoya, M., Monardes, V., Leyton, L., Quest, A.F.G.: Caveolae and caveolae-like membrane domains in cellular signaling and disease: Identification of downstream targets for the tumor suppressor protein caveolin-1. *Biol. Res.* **35**, 151-167 (2002).
27. Fielding, C.J.: *Lipid Rafts and Caveolae: From Membrane Biophysics to Cell Biology.* Wiley-VCH, Weinheim (2006).
28. Fielding, C.J., Fielding, P.E.: Relationship between cholesterol trafficking and signaling in rafts and caveolae. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**, 219-228 (2003).
29. Frank, P.G., Woodman, S.E., Park, D.S., Lisanti, M.P.: Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1161-1168 (2003).

Chapitre V

Spectroscopic studies and molecular modeling for understanding the interactions between cholesterol and cyclodextrins

D. Castagne, G. Dive, B. Evrard, M. Frédérich, G.Piel

Manuscrit soumis (European Journal of Pharmaceutical Sciences)

5 Chapitre V : Etudes spectroscopiques et de modélisation moléculaire afin de comprendre les interactions entre le cholestérol et les cyclodextrines

5.1 Introduction

Les études précédentes de solubilisation et d'extraction du cholestérol à partir des cellules ont permis de mettre en évidence l'interaction entre cette molécule hydrophobe et les β -CDs méthylées notamment et d'expliquer leurs effets au niveau membranaire. Des études de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) en phase liquide (RMN à une et à deux dimension(s)) ont été réalisées dans le but d'étudier l'inclusion du cholestérol dans la cavité de ces dérivés. L'utilisation de méthodes théoriques (modélisation moléculaire) a été envisagée afin de déterminer les complexes énergétiquement favorables avec les β -CDs. Les stoechiométries et modes d'inclusion les plus favorables sont généralement déduits à partir de ces études.

5.2 Résumé des résultats

▪ Etudes RMN à une dimension

La β -CD native ne permettant pas une solubilisation aqueuse suffisante du cholestérol n'a pas pu être utilisée dans nos études RMN réalisées dans de l'eau deutérée (D_2O). Néanmoins, des interactions existent puisque la β -CD est utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour l'extraction du cholestérol du beurre (Comini and Mentink, 1991; Szente and Szejtli, 2004) et peut extraire le cholestérol au niveau cellulaire. Le spectre proton (1H) à une dimension de l'échantillon réalisé par saturation d'une solution de Dimeb par le cholestérol, a permis de montrer des variations des déplacements chimiques des protons internes de la cavité notamment, ce qui est caractéristique d'une inclusion. La formation de complexes 1:2 pourrait trouver confirmation dans cette étude (variations des déplacements des protons pour les groupements méthyles en position 2 et 6). Aucune modification significative des déplacements chimiques des protons de la Crismeb n'a pu être calculée en présence de cholestérol. Des variations de déplacements chimiques n'ont pu être calculées lors de l'utilisation de la Trimeb car l'ajout de cholestérol induit une déformation importante du spectre. Les signaux déformés pourraient être attribués à la

superposition des pics correspondants aux espèces complexées et non complexées. Pour la Rameb, qui est un mélange de β -CD méthylées, l'attribution des protons est difficile, ce qui rend l'interprétation compliquée mais n'exclut pas la possibilité de former des complexes d'inclusion avec le cholestérol.

▪ Etudes RMN à deux dimensions : spectroscopie ROESY

Les interactions cholestérol-Dimeb ont été confirmées par les spectres en deux dimensions. La spectroscopie ROESY a permis d'observer des interactions bien que relativement faibles entre le cholestérol et la Crysmeb. Des taches de corrélations ont également été mises en évidence en cas d'utilisation de la Trimeb et de la Rameb ce qui rend compte des possibilités d'interactions entre le cholestérol et ces dérivés méthylés.

▪ Modélisation moléculaire

La méthode semi-empirique AM1 a été utilisée pour l'étude des complexes 1:1 entre le cholestérol et la β -CD ou ses dérivés méthylés. Les énergies d'interactions qui ont été obtenues sont favorables bien que relativement faibles et ce, quelle que soit la cyclodextrine utilisée. Les énergies de complexation sont quant à elles favorables pour les complexes avec la β -CD et la Crysmeb mais défavorables pour les cyclodextrines hautement méthylées. La déformation importante des cyclodextrines avait déjà été démontrée antérieurement. Concernant le cholestérol, molécule relativement rigide, les énergies de déformation les plus élevées ont été obtenues en cas de complexation avec la Trimeb ce qui rend compte de la difficulté de formation des complexes. D'autres niveaux de calculs en base minimale ou double ont également été mis en œuvre pour l'étude des complexes 1:1. Le niveau AM1 est actuellement le seul envisageable pour étudier des systèmes aussi compliqués que les complexes 1:2. Les structures des conformations étudiées avec les cyclodextrines méthylées et présentant les énergies de complexation les plus favorables sont représentées dans la Figure 24. Ces énergies bien plus élevées que celles obtenues dans le cas des complexes 1:1 tendent à confirmer la plus forte probabilité d'obtenir ces stoechiométries avec les dérivés méthylés de la β -cyclodextrine.

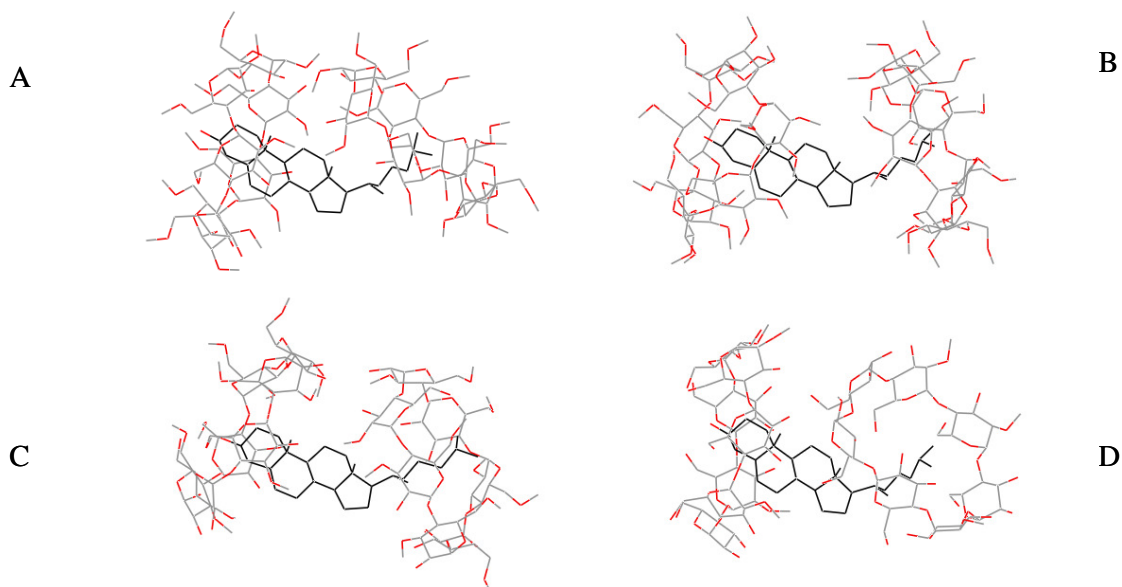


Figure 24 : Structures des complexes 1:2 les plus favorables :
A: Dimeb; B : Trimeb; C : Rameb and D: Crysmeb
(en noir : molécule de cholestérol ; en gris et rouge : molécule de cyclodextrine)

5.3 Conclusions

Les études par RMN n'ont pas permis l'étude des complexes cholestérol- β -CD. Elles ont montré les possibilités d'interactions du cholestérol avec les dérivés méthylés de la β -CD plutôt que les modes préférentiels d'inclusion. Les études théoriques ont permis de déterminer quelles sont les conformations les plus favorables énergétiquement.

Spectroscopic studies and molecular modeling for understanding the interactions between cholesterol and cyclodextrins

Delphine Castagne^a, Georges Dive^b, Brigitte Evrard^a, Michel Frédérick^c, Géraldine Piel^{a*}

^a *Laboratory of Pharmaceutical Technology, CIRM, Department of Pharmacy, University of Liège, 1 av. de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium*

^b *Center for Protein Engineering, Chemical Department, University of Liège, 3 Allée de la Chimie, B-4000 Liège, Belgium*

^c *Laboratory of Pharmacognosy, CIRM, Department of Pharmacy, University of Liège, 1 av. de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium*

Abstract

Cholesterol is a major lipid constituent of biological membranes which could be included in cyclodextrin (CD) cavities. Solubilization and cell extraction of cholesterol have been previously performed in order to study its interaction with β -CD and methylated β -derivatives notably. The present work aims at confirming the formation of inclusion complexes using liquid-state NMR spectroscopy (¹H NMR studies and ROESY experiments). Rather than preferential conformations, these spectroscopic studies showed us the possible interactions between cholesterol and dimethyl- β -CD, trimethyl- β -CD, randomly methylated β -CD or Crysmeb[®]. Weak interactions were detected using the latter one, confirming the advantage of the low substitution to decrease membrane loss of integrity and cytotoxicity. Molecular modeling studies are theoretical methods which should be used to determine which stoichiometry and conformations are energetically more favorable. The semi-empirical AM1 level was used to investigate both 1:1 and 1:2 complexes whereas 1:1 complexes were also studied using minimal or double ζ basis sets. Four conformations for each 1:2 complexes have been envisaged and studied for the methylated CDs.

Keywords : Cyclodextrins, cholesterol, membranes, interactions, NMR spectroscopy, molecular modeling

1. Introduction

Cyclodextrins (CDs) are water-soluble compounds containing a hydrophobic core able to solubilize non polar substances. Thus, they have been used as excipients to deliver hydrophobic drugs (Kilsdonk et al., 1995; Yancey et al., 1996). Cholesterol is a lipidic molecule, member of the sterol family. It is a major lipid constituent of biological membranes.

Due to their affinity for hydrophobic molecules, CDs may be able to extract membrane cholesterol which could explain the toxicity of some methylated derivatives (Leroy-Lechat et al., 1994; Castagne et al., 2009). Methylated derivatives are assumed to increase drug flux by altering barrier properties of the membrane through component extraction or fluidization (Loftsson et al., 2007). Their mechanism of action as absorption enhancing compounds (i.e. through the respiratory epithelium) may be also explained by their ability to transiently open/perturb tight junctions (Marttin et al., 1998; Salem et al., 2009).

In vitro, β -CD and its derivatives have a high affinity for sterols compared to other lipids and because of the relatively high specificity with cholesterol, it has been suggested that these compounds might be effective in modifying cholesterol metabolism in vivo (Kilsdonk et al., 1995). Therefore, they could act as potential pharmacological agents by influencing the development of the atherosclerotic plaque. CDs are currently used to modulate membrane cholesterol levels by depleting or repleting them by the use of cholesterol-CD complexes (Christian et al., 1997). These molecules are tools to study specialized membrane microdomains called lipid rafts/caveolae because of their enrichment in cholesterol particularly. Specific molecules such as receptors are associated with these microdomains explaining their involvement in various cellular functions (Brown and London, 1998; Quest et al., 2004). By interfering with these microdomains, CDs can lead to their destructuration explaining why methyl- β -CD is currently used to study cellular functions (Ilangumaran and Hoessli, 1998). Thus, reduction of cholesterol level interferes with many processes which involve rafts and could be applied for

*Corresponding author. Tel.: +32-4-366-4308; fax: +32-4-366-4302
E-mail address: Geraldine.Piel@ulg.ac.be (Géraldine Piel)

treating raft-related infections and diseases (Barenholz, 2004). Moreover, it has been shown that cholesterol depletion using methyl- β -CD increases permeability of intestinal cells monolayers by displacing specific proteins from cholesterol rich domains associated with tight junctions (Lambert et al., 2005; Lambert et al., 2007; Lynch et al., 2007; Sugibayashi et al., 2009). *In vitro* studies using model membranes (unilamellar liposomes) have been performed and could be used to predict the effects of CDs on biological membranes (Ohvo-Rekila et al., 2000; Piel et al., 2007a; Beseničar et al., 2008). Among these, the interaction of cholesterol with CDs in aqueous solution was investigated quantitatively (phase solubility diagrams) and correlated with liposome loss of integrity (Piel et al., 2007a; Piel et al., 2007b). Another method such as NMR spectroscopy (Piel et al., 2004) could be used to determine the interaction between CDs and cholesterol. Different authors already studied the interactions of cholesterol with β -CD and its dimethylated (Dimeb) and trimethylated (Trimeb) derivatives (Ravichandran and Divakar, 1998; Nishijo et al., 2003; Nishijo et al., 2004). In the present work, ^1H NMR and ROESY spectra will be taken in the same conditions in order to compare complexes with Dimeb and Trimeb with the one obtained with the randomly methylated derivative (Rameb) and a low substituted derivative (Crysmeb[®]). Another mean to predict interactions are theoretical studies. Molecular modeling studies (AM1 calculations) were used to study different host-guest inclusion complexes (Piel et al., 2001; de Hassonville et al., 2002; Pascal et al., 2005; Bertholet et al., 2005; Ziemons et al., 2007; Barillaro et al., 2007). Such theoretical methods will be used here to study cholesterol complexes with β -CD and its methylated derivatives.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Dimethyl- β -cyclodextrin (Dimeb, D.S. 2.0), Kleptose[®] Crysmeb (Crysmeb ; D.S. 0.5) and randomly methylated β -cyclodextrin (Rameb ; D.S. 1.8) were kindly donated by Cyclolab (Budapest, Hungary), Roquette Frères (Lestrem, France) and Wacker-Chemie GmbH (Munich, Germany) respectively. Trimethyl- β -cyclodextrin (Trimeb ; D.S. 3.0), a Fluka product, and cholesterol were obtained from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). Deuterium oxide (99.97 %) was purchased from Eur-isotop (Saint-Aubain, France). All other compounds were of analytical grade.

2.2. Methods

2.2.1. NMR spectroscopy

2.2.1.1. ^1H NMR studies

One-dimensional ^1H NMR spectra were recorded at 25 °C on a Bruker Avance 500 operating at a proton NMR frequency of 500.13 MHz using a 5 mm probe and a simple pulse-acquire sequence. Acquisition parameters consisted of a spectral width of 10,333.6 Hz, a 30° pulse, an acquisition time of 3.17 sec and a relaxation delay of 1 s. For each sample, 128 scans were recorded. FIDs were Fourier transformed with LB = 0.3 Hz and GB = 0. The resonance due to residual solvent (HOD) was used as internal reference.

CD reference solutions were prepared by dissolving appropriate amounts of Dimeb, Trimeb, Crysmeb and Rameb directly in 700 μl D₂O in order to obtain concentrations around 50 mM. Sample solutions were prepared by adding excess amounts of cholesterol to the CD solutions. The resulting suspensions were shaken at 25 °C during one hour and then filtered through a 0.4 μm membrane filter. The cholesterol reference solution (around 11 mM) was prepared in DMSO.

Variation of ^1H NMR chemical shifts of CD protons ($\Delta\delta$) caused upon complexation were calculated to confirm the interaction with cholesterol according to the following formula :

$$\Delta\delta = \delta_{(\text{complexed state})} - \delta_{(\text{free state})}$$

where $\delta_{(\text{complexed state})}$ corresponds to the chemical shifts values in the complexed state and $\delta_{(\text{free state})}$ in the free state.

2.2.1.2. ROESY experiments

Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy (ROESY) spectra were acquired in the phase sensitive mode using the same spectrophotometer and Bruker standard parameters (pulse program roesyph). Each spectrum consisted of a matrix of 2K (F2) by 256 (F1) points covering a spectral width of 5122.9 Hz. Spectra were obtained from the same sample solutions prepared for the ^1H NMR studies, using a spin-lock mixing time of 350 μs . Before Fourier transformation, the sine apodization function was applied in both dimensions. 32 scans were collected for each of the experiments.

2.2.2. Molecular modeling

The geometries were fully optimized without any constraint by minimisation of the analytical gradient. The nature of the located critical points is determined by vibrational frequency calculation derived from the second derivative matrix. When all the eigenvalues of this Hessian matrix are positive, the energy is minimum in each direction associated to the variables. Nowadays, Austin Model 1 (AM1) calculations (Dewar et al., 1985)

can be run routinely, the time requested for a geometry optimization of around 250 atoms into 200 iterations being less than 2 hours. This semi-empirical level is limited to the valence atomic orbitals (A.O) only and applies several approximations in the calculation of the bielectronic integrals. In the case of the complex between cholesterol and Crysmeb, the number of A.O is 560. The Hartree-Fock *ab initio* level solves the Roothaan equation using a basis set which can be minimal or extended (double, triple... ζ) without integral approximation and using non orthogonal functions. With the MINI-1 basis set (Dive et al., 1993), the number of A.O grows up to 669 and the time requested is more than 2 cpu days on a 8 processors machine. The most interesting feature of the *ab initio* level is the quality of the calculated geometry very often in good agreement with experimental data and also the estimation of reliable interaction energies (Jensen, 1999). The upper step is to use a double ζ basis set with additional polarization functions as the 6-31G(d) basis set (Hariharan et al., 1973) and a energy function derived from the Density Functional Theory (DFT) as B3LYP (Becke, 1993). The basis set used 1229 functions and the geometry optimization time is more than 8 cpu days on a 8 processors machine again for cholesterol and Crysmeb. This time becomes enormous for cholesterol-Dimeb complexes (more than 20 days) to solve the equations generated with 1954 functions.

All the calculations have been performed using the Gaussian 03 suite of programs (Frisch et al., 2004). Different softwares were used as X-Win 32, Molden and Mercury 2.2. to generate illustrations of the complexes.

Two types of 1:1 complexes were studied. The AP notation corresponds to the conformation where the aliphatic chain of cholesterol is located towards the primary alcohol groups of the CD while for the AS conformation, the chain is close to the secondary face (Fig.1). Four types of 1:2 complexes (A, B, C or D conformations) were investigated depending on the part of cholesterol which is included in the CD cavity and on the relative orientation of the CD cavities. Schematic representations of all the possible conformations are presented in Fig. 1.

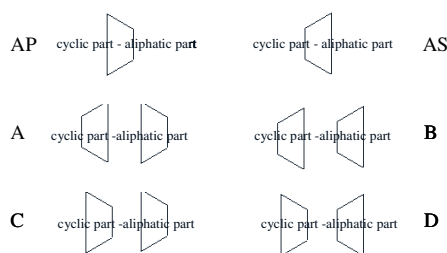


Fig. 1. Schematic representations of the conformations envisaged for the 1:1 (AP and AS) and 1:2 complexes (A, B, C and D)

The atomic coordinates of the β -CD molecule (refcode POBRON of the Cambridge Structural Database) has been selected as starting geometry for a complete optimization of the isolated β -CD. The methylated derivatives were built-up by adding methyl groups (CH_3) to β -CD on each glucopyranose units for Dimeb and Trimeb (respectively on O-2 and O-6 and O-2, O-3 and O-6 positions). Crysmeb which is methylated selectively at the secondary O-2 position was built-up by adding 4 CH_3 on this position for the 1, 3, 5 and 7 glucose residues leading to a D.S. of approximately 0.57 (close to the one proposed by Roquette). Concerning Rameb (D.S. 1.8), 13 substituents were added on the natural core namely 3 CH_3 on the O-2 position for the 3, 4 and 7 glucopyranose units, 3 groups on the O-3 for the 1, 2 and 5 glucose residues and finally 7 on each O-6 position except for the last unit.

The calculation procedure is the following: starting from the optimized geometry of each complex, cholesterol and CD were reoptimized separately. This procedure allows the determination of consistent energetic data, as each relative energy is calculated by reference to the geometry of the complex (Ziemons et al., 2007).

3. Results

3.1. NMR studies

Atoms notations for cholesterol, according to Ravichandran (Ravichandran and Divakar, 1998), can be seen in Fig. 2 which shows the 500 MHz ^1H NMR spectrum of cholesterol in DMSO up to 6.0 ppm.

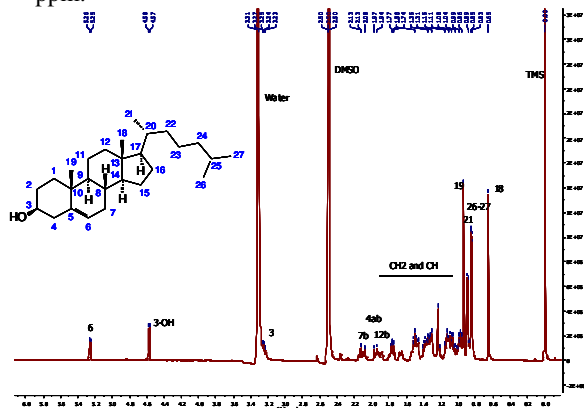


Fig. 2. ^1H NMR spectrum of cholesterol in DMSO and atoms notations

Due to the different media used for the reference and sample solutions, no shifts variations were calculated upon complexation for cholesterol.

RESULTATS

The ^1H NMR spectra between 2.7 and 6.1 ppm of Dimeb in D_2O alone (reporting the protons) or associated in the complex with cholesterol are shown in Fig. 3.

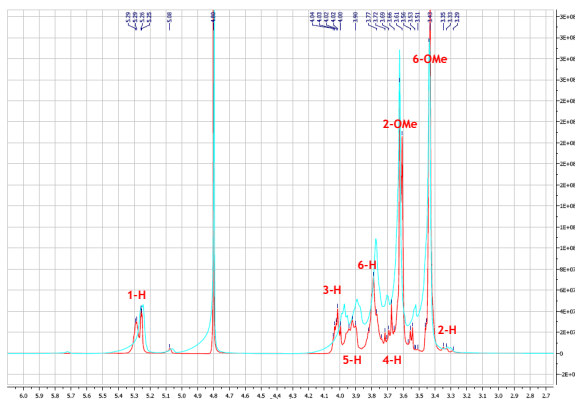


Fig. 3. Partial ^1H NMR spectra of the cholesterol-Dimeb complex solution (blue) and of the Dimeb solution in D_2O with assignment of the signals of the CD (in red)

Table 1 reports the differences between ^1H NMR chemical shifts values of Dimeb protons in the complexed and free state ($\Delta\delta$). Proton signals due to H-3 shifted upfield prominently followed by the signals due to H-5 as it has already been shown (Nishijo et al., 2003). Because these protons are located inside the CD cavity, their shifts suggest that cholesterol is included inside the Dimeb.

Table 1. Variation of ^1H NMR chemical shifts (ppm) of Dimeb or Crsymeb protons in the presence of cholesterol

Protons	$\Delta\delta$ Dimeb	$\Delta\delta$ Crsymeb
H-1	-0.02	+0.01
H-2	-0.02	+0.01
H-3	-0.06	0
H-4	+0.04	+0.01
H-5	-0.03	0
H-6	-0.02	0
2-OMe	+0.01	+0.02
6-OMe	+0.01	

$$\Delta\delta = \delta_{(\text{complexed state})} - \delta_{(\text{free state})}$$

The interactions are also confirmed in the two-dimensional ROESY experiment as correlation spots are clearly detectable between cholesterol and the CD inner protons (especially H-3) (Fig. 4). Also, it is considered that the shifts variations of 2-OMe and 6-OMe (Table 1) occur because they come into contact with another methyl of a second CD confirming the formation of 1:2 complexes (Nishijo et al., 2003).

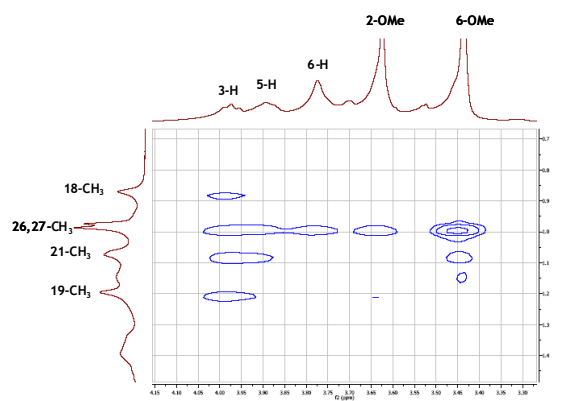


Fig. 4. Two-dimensional ROESY spectrum of a solution containing Dimeb (50 mM) saturated with cholesterol

To summarize, as shown in Fig. 4, cross peaks connecting the H-3, H-5 and H-6 of Dimeb, as well as 2O-Me and 6O-Me, to the 18- CH_3 , 26- CH_3 , 27- CH_3 , 21- CH_3 and/or 19- CH_3 can be observed. All the results obtained are mostly in accordance with those of Nishijo et al. (Nishijo et al., 2003) and confirm the formation of inclusion complexes. To interpret the results in two dimensions, mostly the protons corresponding to the aliphatic chain of cholesterol have been considered. Interpretations concerning the double bond and CHOH (cyclic part) would be difficult because of the localization of these signals in the area of the spectrum corresponding to the ones of the CD and water (Fig. 2 and 3).

The protons of Trimeb alone were assigned by comparison to the spectrum obtained by Nishijo et al. (Nishijo et al., 2004) (Fig. 5).

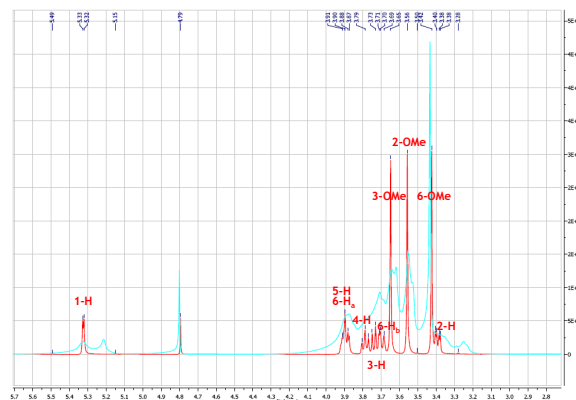


Fig. 5. Partial ^1H NMR spectra of the cholesterol-Trimeb complex solution (blue) and of the Trimeb solution in D_2O with assignment of the signals of the CD (in red)

As shown in the figure, the ^1H NMR spectrum of Trimeb in presence of cholesterol is deformed when compared to the one of Trimeb alone. Attributions are thus difficult for Trimeb in presence of cholesterol. It was therefore not possible to

RESULTATS

calculate proton shifts variations in this case. The broad deformed signals could consist in the superposition of complexed species and uncomplexed one because of slow exchange rate between complexed species and the free one as suggested by the group of Nishijo (Nishijo et al., 2004). However, cholesterol seems to interact with Trimeb as shown on the ROESY spectrum of the mixture showing cross peaks between protons of cholesterol and methyl groups (3-OMe and 6-OMe) of the CD (Fig. 6). The formation of inclusion complexes between the two molecules cannot be excluded as correlation spots could probably be attributed to an interaction with the inner protons unfortunately difficult to assign because of the broad deformed signals (Fig. 6).

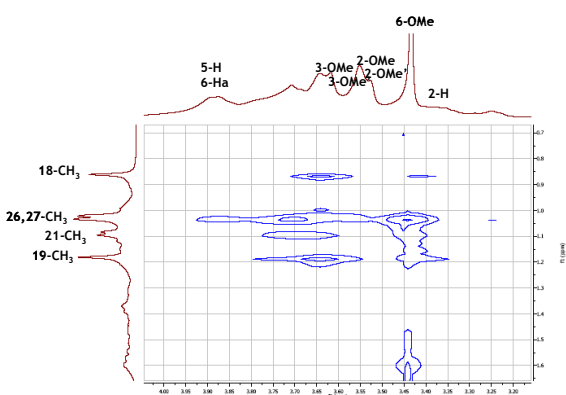


Fig. 6. Two-dimensional ROESY spectrum of a solution containing Trimeb (50 mM) saturated with cholesterol

NMR studies on Rameb are difficult because it is not a single pure compound, but rather a mixture of randomly methylated molecules of β -CD (Hazekamp and Verpoorte, 2006). Only partial proton attributions could be done by comparison to the spectrum obtained with the well characterized Dimeb. The presence of cholesterol is related to an upfield shift of 2-OMe (+0.02 ppm) which seems to suggest its involvement in the interactions while no shift appeared for 6-OMe (Fig. 7). Concerning the protons of the inner cavity, data on H-3 were inconclusive when H-5 shifted down with cholesterol (-0.02 ppm). So, based on these data, only limited conclusions can be made on the involvement of the CD protons. On the ROESY spectrum (Fig. 8), correlation spots between a couple of protons of cholesterol and 2- but also 6-OMe can be seen confirming the implication of the latter one in the interactions. From the two types of NMR experiments, it is possible to assume the interactions of cholesterol with the methyl groups of Rameb. Despite the difficulty to assign the methine protons of the CD after complexation, the interactions shown in Fig. 8 probably involve CD protons such as 3-H or 5-H.

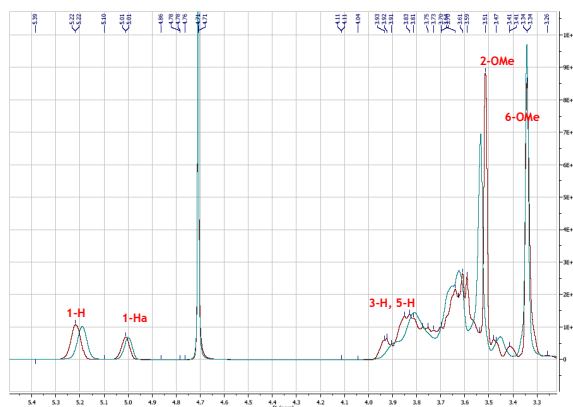


Fig. 7. Partial ^1H NMR spectra of the cholesterol-Rameb complex solution (blue) and of the Rameb solution in D_2O with partial assignment of the signals of the CD (in red)

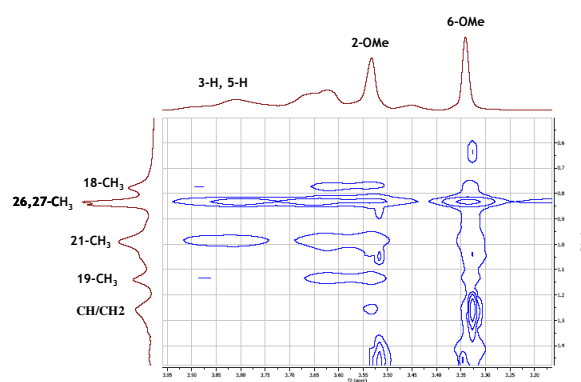


Fig. 8. Two-dimensional ROESY spectrum of a solution containing Rameb (50 mM) saturated with cholesterol

In Fig. 9, protons were assigned for the one-dimensional spectrum obtained with the Crysmeb solution in reference with the work of Bakkour (Bakkour, 2005). As shown in this figure and in Table 1, no significant shifts variations were evaluated for the cholesterol-CD solution.

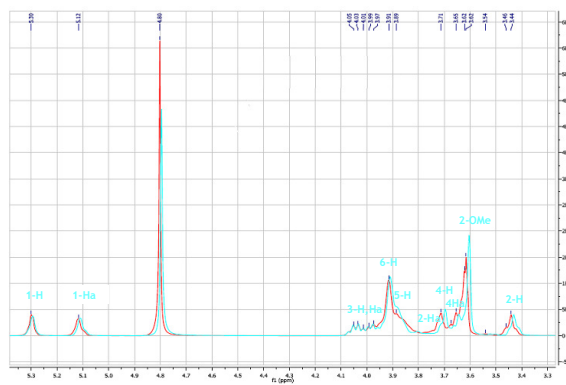


Fig. 9. Partial ^1H NMR spectra of the cholesterol-Crysmeb complex solution (red) and of the Crysmeb solution in D_2O with assignment of the signals of the CD (in blue)

RESULTATS

However, weak interactions were detected in two dimensions between the 18-CH₃, 26-CH₃, 27-CH₃, 21-CH₃ and 19-CH₃ of cholesterol and 3-H, 5-H or 6-H of the CD (Fig. 10) confirming the formation of cholesterol-Crysmeb inclusion complexes. The weakness of the interactions observed could be due to the lower solubilization of cholesterol with Crysmeb at equivalent concentration of 50 mM leading to weaker detectable interactions than with other studied CD.

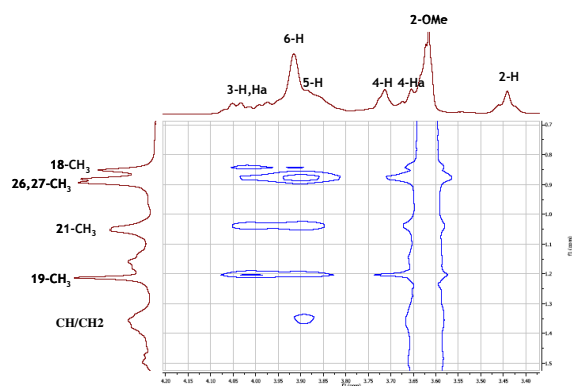


Fig. 10. Two-dimensional ROESY spectrum of a solution containing Crysmeb (50 mM) saturated with cholesterol

3.2 Molecular modeling

As previously determined, phase solubility diagrams of cholesterol with Dimeb, Trimeb, Rameb and Crysmeb are of the Ap type following the Higuchi and Connors classification (Piel et al., 2007b). Therefore, in aqueous solutions, two types of complexes having molar ratios of 1:1 and 1:2 are possible. In the case of cholesterol with Dimeb or Trimeb, 1:2 complexes are formed more easily. As a matter of fact, $K_{1:2}$ values calculated by Nishijo (Nishijo et al., 2003; Nishijo et al., 2004) are higher than $K_{1:1}$ values (at 25°C, $K_{1:2-Dimeb} = 56,800 \text{ M}^{-1} \gg K_{1:1-Dimeb} = 109 \text{ M}^{-1}$; $K_{1:2-Trimeb} = 75,500 \text{ M}^{-1} \gg K_{1:1-Trimeb} = 77 \text{ M}^{-1}$). Molecular modeling should be used here to determine which type of complexes and conformations are more favorable. Concerning β -CD, for which no increase in cholesterol aqueous solubility could be determined, only the 1:1 complexes were investigated.

Results are presented as energetic outcomes expressed as interaction, deformation and complexation energies (Fig. 11).

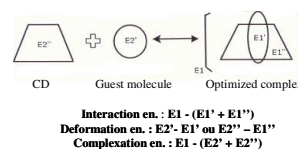


Fig. 11. Schematic definitions of the interaction, deformation and complexation energies

The interaction energy is defined as the difference between the energy of the complex and the sum of the energies of both partners at their complex geometry. The deformation energy is determined by the difference between the energy of one of the partners of the complex at its equilibrium geometry (which is obtained by reoptimization of the one found in the complex) and its energy at the complex geometry. The complexation energy is the difference between the energy of the complex and the sum of the energy of each partner at their respective equilibrium geometry.

The results obtained for the 1:1 complexes with AM1 calculations are given in Table 2. The interaction energies are always favorable although they are relatively low compared to other studied complexes especially in the case of miconazole (Piel et al., 2001). Complexation energies values are negative for the complexes with β -CD and Crysmeb which means that their formation is energetically favorable. On the contrary the high substituted methylated CDs show positive values suggesting lower probabilities for 1:1 complexes. The deformation of cholesterol is weaker than the deformation of CDs. This is reasonably due to the rigidity of the four-ringed backbone of this molecule. Dimeb and Trimeb exhibit more deformability upon complexation as suggested by the high values obtained compared to the other CDs. The highest deformation energies for cholesterol are generally obtained with Trimeb which means that complex formation should be difficult. For all the five 1:1 complexes, the *ab initio* MINI-1 calculations have been performed and the results are given in Table 3. What is surprising is to obtain non stabilizing interaction energies by opposite to the AM1 calculations (Table 2).

RESULTATS

Table 2. Interaction, deformation and complexation energies in Kcal/mole for 1:1 complexes with the reference to reoptimized CDs and cholesterol (AM1 calculations)

CD	β-CD		Dimeb		Trimeb		Rameb		Crysmeb	
	AP	AS	AP	AS	AP	AS	AP	AS	AP	AS
Interaction en.	-5.182	-5.788	-4.802	-3.536	-5.538	-4.943	-4.921	-4.214	-7.046	-5.074
Deformation en.										
- cholesterol	-0.598	-0.358	-0.918	-1.110	-2.241	-3.629	-2.403	-1.088	-1.309	-0.413
- CD	-1.330	-1.169	-6.943	-7.987	-3.621	-7.732	-3.687	-3.554	-2.298	-3.424
Complexation en.	-3.254	-4.261	3.058	5.571	0.325	6.418	1.169	0.429	-3.440	-1.237

Table 3. Interaction, deformation and complexation energies in Kcal/mole for 1:1 complexes with the reference to reoptimized CDs and cholesterol (MINI-1 calculations)

CD	β-CD		Dimeb		Trimeb		Rameb		Crysmeb	
	AP	AS	AP	AS	AP	AS	AP	AS	AP	AS
Interaction en.	4.991	2.437	0.102	6.467	4.111	4.802	5.711	6.024	-0.074	0.197
Deformation en.										
- cholesterol	-0.281	-0.505	-0.257	-1.283	-2.329	-0.961	-3.357	-0.554	-0.092	-0.401
- CD	-1.189	-0.406	-1.253	-4.500	-7.892	-11.004	-6.428	-8.159	-0.261	-0.841
Complexation en.	6.461	3.348	1.612	12.250	14.332	16.766	15.496	14.737	0.280	1.439

With the MINI-1 basis set, the interatomic distances are overestimated and this feature could have a great incidence on the interactions occurring in a so closed environment. In order to refine the results, the geometries of the complexes with each CDs except Trimeb have been optimized at the B3LYP/6-31G(d) level. The 8 interaction energies are generally in good agreement with the AM1 results (Table 4). This result is satisfactory. Nevertheless, with regard to the MINI-1 calculations, the question remains open concerning the ability of AM1 to describe a very dense H-bond network. Two additional rather fast computations (energy only without minimization of the gradient) have been run using the DFT/6-31G(d) level at the AM1 and the MINI-1 geometries noted in Table 4 B3LYP//AM1 and B3LYP//MINI-1. They confirm that AM1 is not very efficient to describe H-bond network in inclusion complexes. Moreover, the good agreement between B3LYP//MINI-1 results

and B3LYP//B3LYP ones could suggest a significant part of the correlation energy in such complexes which is taken into account in DFT and not at the Hartree-Fock level. This could explain the differences between MINI-1//MINI-1 and B3LYP//MINI-1 values. It remains that AM1//AM1 seems to give reliable interaction energies in rather good accordance with the most elaborate results B3LYP//B3LYP else if the poor description of the H-bond network effect in the complex was counterbalanced by the same poor description in the cyclodextrin alone giving rise to a cancellation of errors. Nevertheless, for the first time, the present study clearly points out the need to use more elaborate method than the semi-empirical ones in order to obtain a good geometry description of inclusion complexes with cyclodextrins. More in-depth analysis is actually under investigation in particular the size of the basis set in order to have a reasonable compromise between quality and cpu time.

RESULTATS

Table 4. Comparison of the interaction energies in Kcal/mole for the 1:1 complexes obtained with different calculation methods

CD	β -CD		Dimeb		Trimeb		Rameb		Crysmeb	
	AP	AS	AP	AS	AP	AS	AP	AS	AP	AS
AM1//AM1	-5.182	-5.788	-4.802	-3.536	-5.538	-4.943	-4.921	-4.214	-7.046	-5.074
MINI-1//MINI-1	4.991	2.437	0.102	6.467	4.111	4.802	5.711	6.024	-0.074	0.197
B3LYP//B3LYP	0.124	-3.189	-5.607	-1.130	-	-	-4.871	-2.647	-3.998	-6.167
B3LYP//AM1	10.529	7.838	11.923	15.450	11.246	17.155	15.529	15.668	10.018	7.904
B3LYP//MINI-1	-1.856	-4.634	-5.161	-1.589	-2.965	-2.160	-2.187	-3.342	-3.802	-6.097

Because increasing the size of systems renders the use of basis sets such as the MINI-1 prohibitively expensive and time-consuming only the semi-empirical AM1 calculations were carried out concerning the 1:2 complexes. Results for 1:2 complexes with Dimeb, Trimeb, Rameb and Crysmeb are presented in Table 5. The interaction energies calculated in these cases are really higher compared to the 1:1 complexes (and values differ significantly between the conformations or CD envisaged). The lower interaction energies were obtained for complexes with Trimeb whereas the highest values were obtained with Crysmeb. The complexation energies are stabilizing for all the conformations envisaged with Dimeb, Rameb and Crysmeb. For Trimeb, the C and D conformations are not favorable. With each CD, except for Crysmeb, higher negative values were obtained with the A conformation suggesting higher probability for this one. For Crysmeb, the B conformation is the most favorable followed by the A, D and then C. In Fig. 12, the structures for the most favorable 1:2 complexes are represented. The complexation energies obtained for the 1:2 complexes with the methylated derivatives are always more favorable than those obtained for the 1:1 complexes, allowing to confirm the higher probability for these stoichiometries.

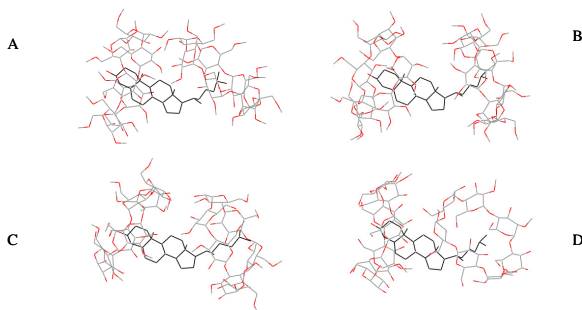


Fig. 12. Structures of the most favorable 1:2 complexes (A: Dimeb; B : Trimeb; C : Rameb and D: Crysmeb)

4. Discussion

It is well known that the native β -CD exhibits poor water solubility which could explain the poor solubility of the cholesterol- β -CD complex in water (Ravichandran, Divakar, 1998). As a consequence β -CD was not able to dissolve detectable amounts of cholesterol as shown with the phase-solubility diagram in the previous study (Piel et al., 2007a; Piel et al., 2007b). This CD was thus not used in our NMR experiments performed in deuterated water. However, the very low concentrations of β -CD used in cellular culture allowed to extract relatively high amounts of cholesterol from cell membranes (Castagne et al., 2009). Moreover, the production of the low-cholesterol butter known under the tradename Balade[®] implies the use of β -CD in the manufacturing process (Comini, Mentik, 1991; Szente, Szejtli, 2004). This suggested the possibility even for this CD to interact with cholesterol. Molecular modeling reinforced this hypothesis as complexation energies calculated at the AM1 level are favorable (Table 2). β -CD is thus able to interact with cholesterol, forming insoluble or very low soluble complexes. In the chosen conditions, the present studies, as well as phase-solubility diagrams, did not allow us to elucidate which type of stoichiometry should be the most probable with β -CD.

¹H NMR and ROESY experiments enabled to investigate the interactions between cholesterol and four methylated β -CDs substituted in various ways. These spectroscopic studies showed us the possibility of an inclusion rather than preferential conformations. The high substituted Dimeb (D.S. 2) and Rameb (D.S. 1.8) are efficient cholesterol solubilizers or extractors from cell membranes. We have previously shown that this could be responsible of their destructive effect on liposomes and of their cytotoxicity (Piel et al., 2007b; Castagne et al., 2009). The interactions were confirmed by spectroscopic studies as shown on the

RESULTATS

Table 5. Interaction, deformation and complexation energies in Kcal/mole for 1:2 complexes with the reference to reoptimized CDs and cholesterol (AM1 calculations)

Conformation	A	B	C	D
Interaction en.	-16.164	-13.458	-16.893	-10.544
Deformation en.				
- Dimeb 1_cycl.	-5.093	-3.102	-3.891	-0.897
- cholesterol	-2.253	-2.581	-3.222	-1.862
- Dimeb 2_aliph.	-0.945	-1.703	-4.841	-1.287
Complexation en.	-7.872	-6.073	-4.939	-6.499
Interaction en.	-11.441	-9.632	-6.253	-10.733
Deformation en.				
- Trimeb 1_cycl.	-0.823	-1.144	-10.975	-8.573
- cholesterol	-0.950	-0.598	-2.672	-1.983
-Trimeb 2_aliph.	-0.391	-1.733	-0.252	-2.431
Complexation en.	-9.277	-6.158	7.645	2.253
Interaction en.	-17.018	-12.705	-11.473	-10.922
Deformation en.				
- Rameb 1_cycl.	-2.198	-0.872	-1.619	-0.980
- cholesterol	-2.420	-1.075	-1.106	-2.822
- Rameb 2_aliph.	-0.578	-1.139	-0.469	-1.657
Complexation en.	-11.822	-9.618	-8.279	-5.463
Interaction en.	-12.946	-18.706	-12.067	-17.196
Deformation en.				
- Crysmeb 1_cycl.	-0.824	-1.442	-1.084	-3.756
- cholesterol	-0.855	-1.252	-1.658	-3.060
- Crysmeb 2_aliph.	-1.050	-2.410	-4.778	-0.566
Complexation en.	-10.217	-13.602	-4.547	-9.814

ROESY spectra. In the case of Dimeb, it was possible from the ^1H NMR spectrum to calculate upfield shifts of the inner cavity protons which confirm the inclusion. Finally, as suggested by molecular modeling at the AM1 level, 1:1 complexes with these CDs are not favorable while each 1:2 conformations are possible.

In cell culture, Trimeb showed an unexpected behaviour as it was not able to extract high amounts of cholesterol despite its good solubilization properties (Piel et al., 2007b; Castagne et al., 2009). In membranes, cholesterol is associated with other lipids for which it can have an affinity and it is not as free as in solution. Using cholesterol containing liposomes, Trimeb had already shown lower damageable effect on the membrane integrity than CDs having similar dissolution ability (with D.S. around 2) (Piel et al., 2007b). Biological membranes are even more complicated than the simplified liposomal models and the interactions could be more difficult due to the steric bulk of this

molecule. Deformation energies calculated when using Trimeb were generally high which supports this suggestion. Moreover, only two of all the complexes conformations envisaged with this CD gave complexation energies favorable which could explain its difficulty to form complexes and to extract cholesterol. Another explanation could come from the ^1H NMR studies. As suggested by Nishijo et al. (Nishijo et al., 2004), the spectrum obtained upon complexation could be due to slow exchange rate between complexed species and the free one.

The results obtained with the spectroscopic studies confirm the lower affinity for the lipidic molecule when using the low substituted derivative Crysmeb as weaker interactions have been observed. This was already evaluated *in vitro* on cell membranes (Castagne et al., 2009) and by phase solubility diagrams (Piel et al., 2007b). In this last study, a 50 mM Crysmeb solution allowed the solubilization of very low concentrations of cholesterol (3.5 mM)

compared to the results obtained with the other methylated CDs (Dimeb : 11.15 mM, Rameb : 12.5 mM, Trimeb : 13.1 mM). As ^1H NMR spectra are measured in deuterated water, similar solubilization capacities as in aqueous solutions should be obtained. The lower solubilization of cholesterol has been correlated with good liposome membrane integrity in presence of Crysmeb solutions (Piel et al., 2007b). The better cell viability after contact with Crysmeb solutions has been attributed to lower cholesterol extraction or solubilization (Castagne et al., 2009). However, at the AM1 level the highest interaction or complexation energies were generally obtained with this CD for 1:2 complexes as well as for 1:1 complexes.

As a conclusion, these studies allowed us to confirm the interactions between cholesterol and β -CDs especially the methylated derivatives.

Acknowledgements

M. Frédéric is senior research associate of the Fonds de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS). G. Dive is research associate of the FRS-FNRS. He thanks the FRS-FNRS for the financial support of the high performance computing systems installed in Liège and Louvain-la-Neuve and also the Interuniversity Poles of Attraction initiated by the Belgian state PAI/6-19 for financial support.

References

Bakkour, Y., 2005. Etude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines natives et polymérisées. Université des Sciences et Technologies de Lille 1, Lille.

Barenholz, Y., 2004. Spingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and rafts to potential medical applications. *Subcell. Biochem.*, 37, 167-215.

Barillaro, V., Dive, G., Bertholet, P., Evrard, B., Delattre, L., Ziémons, E., Piel, G., 2007. Theoretical and experimental investigations on miconazole/cyclodextrin/acid complexes: Molecular modeling studies. *Int. J. Pharm.*, 342, 152-160.

Becke, A.D., 1993. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, 98, 5648-5652.

Belhadj Salem, L., Bosquillon, C., Dailey, L.A., Delattre, L., Martin, G.P., Evrard, B., Forbes, B., 2009. Sparing methylation of β -cyclodextrin mitigates cytotoxicity and permeability induction in respiratory epithelial cell layers in vitro. *J. Control. Release*, 136, 110-116.

Bertholet, P., Gueders, M., Dive, G., Albert, A., Barillaro, V., Perly, B., Cataldo, D., Piel, G., Delattre, L., Evrard, B., 2005. The effect of cyclodextrins on the aqueous solubility of a new MMP inhibitor: phase solubility, ^1H -NMR spectroscopy and molecular modeling studies, preparation and stability study of nebulizable solutions. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 8, 147-158.

Beseničar, M.P., Bavdek, A., Kladnik, A., Macek, P., Anderluh, G., 2008. Kinetics of cholesterol extraction from lipid membranes by methyl- β -cyclodextrin - A surface plasmon resonance approach. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, 1778, 175-184.

Brown, D.A., London, E., 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 14, 111-136.

Castagne, D., Fillet, M., Delattre, L., Evrard, B., Nusgens, B., Piel, G., 2009. Study of the cholesterol extraction capacity of β -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 63, 225-231.

Christian, A.E., Haynes, M.P., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.*, 38, 2264-2272.

Comini, S., Mentink, L., 1991. Refining mixtures containing complexes of cyclodextrins with lipophilic compounds such as fatty acids. *Eur Pat. Appl. EP 440539*.

Dewar, M.J.S., Zoebisch, E.G., Healy, E.F., Stewart, J.J.P., 1985. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 3902-3909.

Dive, G., Dehareng, D., Ghuyssen, J.M., 1993. Energy analysis on small to medium sized H-bonded complexes. *Theor. Chim. Acta*, 85, 409-421.

Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Montgomery, J.A., Jr., Vreven, T., Kudin, K.N., Burant, J.C., Millam, J.M., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X., Knox, J.E., Hratchian, H.P., Cross, J.B., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Ayala, P.Y., Morokuma, K., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Zakrzewski, V.G., Dapprich, S., Daniels, A.D., Strain, M.C., Farkas, O., Malick, D.K., Rabuck, A.D., Raghavachari, K., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cui, Q., Baboul, A.G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B.B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R.L., Fox, D.J., Keith, T., Al-Laham, M.A., Peng, C.Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P.M.W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M.W., Gonzalez, C., Pople, J.A., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004. *Gaussian 03, Revision D.02*.

Hariharan, P.C., Pople, J.A., 1973. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theor. Chim. Acta*, 28, 213-222.

RESULTATS

- Hazekamp, A., Verpoorte, R., 2006. Structure elucidation of the tetrahydrocannabinol complex with randomly methylated β -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29, 340-347.
- Henry de Hassonville, S., Perly, B., Piel, G., Van Hees, T., Barillaro, V., Bertholet, P., Delattre, L., Evrard, B., 2002. Inclusion complexes of cyproterone acetate with cyclodextrins in aqueous solution. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 44, 289-292.
- Ilangumaran, S., Hoessli, D.C., 1998. Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.*, 335 (Pt 2), 433-440.
- Jensen, F., 1999. Introduction to computational chemistry. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Kilsdonk, E.P., Yancey, P.G., Stoudt, G.W., Bangerter, F.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., 1995. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.*, 270, 17250-17256.
- Lambert, D., O'Neill, C.A., Padfield, P.J., 2005. Depletion of Caco-2 cell cholesterol disrupts barrier function by altering the detergent solubility and distribution of specific tight-junction proteins. *Biochem. J.*, 387, 553-560.
- Lambert, D., O'Neill, C.A., Padfield, P.J., 2007. Methyl- β -cyclodextrin increases permeability of caco-2 cell monolayers by displacing specific claudins from cholesterol rich domains associated with tight junctions. *Cell. Physiol. Biochem.*, 20, 495-506.
- Leroy-Lechat, F., Wouessidjewe, D., Andreux, J.-P., Puisieux, F., Duchêne, D., 1994. Evaluation of the cytotoxicity of cyclodextrins and hydroxypropylated derivatives. *Int. J. Pharm.*, 101, 97-103.
- Loftsson, T., Vogensen, S.B., Brewster, M.E., Konradsdottir, F., 2007. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *J. Pharm. Sci.*, 96, 2532-2546.
- Lynch, R.D., Francis, S.A., McCarthy, K.M., Casas, E., Thiele, C., Schneeberger, E.E., 2007. Cholesterol depletion alters detergent-specific solubility profiles of selected tight junction proteins and the phosphorylation of occludin. *Exp. Cell Res.*, 313, 2597-2610.
- Martin, E., Verhoef, J.C., Merkus, F.W.H.M., 1998. Efficacy, safety and mechanism of cyclodextrins as absorption enhancers in nasal delivery of peptide and protein drugs. *J. Drug Target.*, 6, 17-36.
- Nishijo, J., Moriyama, S., Shiota, S., 2003. Interactions of cholesterol with cyclodextrins in aqueous solution. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 51, 1253-1257.
- Nishijo, J., Moriyama, S., Shiota, S., Kamigauchi, M., Sugiura, M., 2004. Interaction of heptakis (2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin with cholesterol in aqueous solution. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 52, 1405-1410.
- Ohvo-Rekila, H., Akerlund, B., Slotte, J.P., 2000. Cyclodextrin-catalyzed extraction of fluorescent sterols from monolayer membranes and small unilamellar vesicles. *Chem. Phys. Lipids*, 105, 167-178.
- Piel, G., Dive, G., Evrard, B., Van Hees, T., Henry de Hassonville, S., Delattre, L., 2001. Molecular modeling study of β - and γ -cyclodextrin complexes with miconazole. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13, 271-279.
- Piel, G., Moutard, S., Perly, B., Henry de Hassonville, S.H., Bertholet, P., Barillaro, V., Piette, M., Delattre, L., Evrard, B., 2004. Comparison of two methods currently used to determine the interaction between cyclodextrins and drugs: phase solubility diagrams and NMR spectroscopy. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 14, 87-91.
- Piel, G., Piette, M., Barillaro, V., Castagne, D., Evrard, B., Delattre, L., 2007a. Study of the interaction between cyclodextrins and liposome membranes: effect on the permeability of liposomes. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 57, 309-311.
- Piel, G., Piette, M., Barillaro, V., Castagne, D., Evrard, B., Delattre, L., 2007b. Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes. *Int. J. Pharm.*, 338, 35-42.
- Quest, A.F., Leyton, L., Parraga, M., 2004. Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem. Cell Biol.*, 82, 129-144.
- Ravichandran, R., Divakar, S., 1998. Inclusion of ring a of cholesterol inside the β -cyclodextrin cavity: Evidence from oxidation reactions and structural studies. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recogn.*, 30, 253-270.
- Sugibayashi, K., Onuki, Y., Takayama, K., 2009. Displacement of tight junction proteins from detergent-resistant membrane domains by treatment with sodium caprate. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 36, 246-253.
- Szente, L., Szejtli, J., 2004. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Technol.*, 15, 137-142.
- Yancey, P.G., Rodriguez, W.V., Kilsdonk, E.P., Stoudt, G.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., 1996. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J. Biol. Chem.*, 271, 16026-16034.

RESULTATS

Ziémons, E., Dive, G., Debrus, B., Barillaro, V., Frédéricich, M., Lejeune, R., Angenot, L., Delattre, L., Thunus, L., Hubert, P., 2007. Study of the physicochemical properties in aqueous medium and molecular modeling of tagitinin C/cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43, 910-919.

Mise en évidence de l'interaction des cyclodextrines avec des modèles membranaires et leurs constituants lipidiques

Dans la première partie de notre recherche, l'utilisation de vésicules lipidiques unilamellaires comme modèles membranaires a permis de mettre en évidence une modification de l'intégrité membranaire en présence de certaines cyclodextrines. Les cyclodextrines natives testées, c'est-à-dire la γ -CD et la β -CD, induisent une fuite faible ou nulle du traceur encapsulé. Les dérivés méthylés de la β -CD de D.S. élevé, surtout la Dimeb, ont un effet marqué (Dimeb > Rameb > Trimeb), alors que la Crysmeb maintient l'intégrité membranaire. Des mesures de tailles particulières confirment ces observations puisqu'aucune modification de la distribution des tailles des liposomes n'a été mesurée en présence de cette dernière cyclodextrine. La comparaison des effets obtenus sur des vésicules contenant du cholestérol ou non, montre qu'en présence de cholestérol, les liposomes sont plus sensibles à l'effet des cyclodextrines méthylées, hormis la Crysmeb. Ces résultats sont en corrélation avec les conclusions d'autres auteurs. Beseničar et son équipe ont par exemple mis en évidence un rétrécissement de LUV constitués de DOPC et de cholestérol en utilisant la M β -CD (dérivé dont la substitution est proche de la Rameb), ce qui n'avait pas été observé lors de l'utilisation de DOPC seule (Beseničar et al., 2008). Dans l'étude de Hatzi utilisant notamment des liposomes unilamellaires de composition qualitative proche des liposomes étudiés dans le cadre de nos travaux (PC/CHOL), la rétention de la calcéine diminue significativement au cours du temps en contact avec la M β -CD à 40 mg/ml (soit 30 mM). Ceci n'est pas observé avec les dérivés hydroxypropylés testés, ce qui confirme également nos résultats.

L'augmentation de la perméabilité des liposomes serait probablement due à la formation de pores transitoires suite à la solubilisation de composants membranaires lipidiques comme le cholestérol (Boulmedarat et al., 2005). Ces derniers auteurs évaluaient notamment la modulation de la libération d'inuline encapsulée dans des liposomes de composition identique à ceux utilisés dans notre étude, au contact de la Rameb. Les taux d'inuline libérée à 37 °C après 30 min de contact avec cette cyclodextrine à 5% m/V (soit 38 mM) atteignaient 80%, soit une fuite proche de celle obtenue dans notre cas avec la Rameb à 50 mM. La transposition ne peut cependant pas être totale puisque la concentration en cyclodextrine est inférieure, que la taille de la molécule encapsulée est plus élevée ($PM_{\text{inuline}} > PM_{\text{calcéine}}$) et que la quantité lipidique totale est sans doute différente. On peut toutefois conclure à une déstructuration importante des liposomes dans les conditions de l'expérience.

Nishijo et al. ayant étudié l'interaction en solution aqueuse entre la Dimeb ou la Trimeb et le cholestérol ont obtenu des diagrammes de solubilité similaires quelle que soit la cyclodextrine (Nishijo et al., 2004). Les diagrammes sont de type Ap selon la classification de Higuchi et Connors, ce qui suppose la formation simultanée de complexes 1:1 et 1:2. Le calcul des constantes de stabilité leur ont permis de conclure à la formation plus aisée de complexes 1:2. En effet, leurs résultats mettent en évidence des valeurs plus élevées des constantes $K_{1:2}$ (à 25 °C, $K_{1:2-Dimeb} = 56\ 800\ M^{-1} \gg K_{1:1-Dimeb} = 109\ M^{-1}$; $K_{1:2-Trimeb} = 75\ 500\ M^{-1} \gg K_{1:1-Trimeb} = 77\ M^{-1}$) (Nishijo et al., 2003; Nishijo et al., 2004). Les cyclodextrines utilisées dans notre étude, hormis les β -CD, γ -CD, HP- γ -CD et SBE- β -CD qui ne solubilisent pas le cholestérol, donnent également des diagrammes de type Ap. Grâce aux diagrammes et au calcul des efficacités de complexation, nous avons pu les classer en fonction de leur affinité pour le cholestérol : HP- β -CD < Crysmeb < Dimeb < Rameb = Trimeb. Les Dimeb et Trimeb présentent des diagrammes de solubilité proches dans notre cas également. Nous avons pu montrer que les cyclodextrines ayant un pouvoir solubilisant élevé du cholestérol, à savoir les β -cyclodextrines méthylées dont le D.S. est élevé, provoquaient une déstructuration des membranes liposomales. Une relation entre leur capacité à induire la fuite du traceur encapsulé et la solubilisation du cholestérol a donc été établie. Nous avons également pu mesurer une augmentation significative de la solubilité de la PC en solution aqueuse en présence de la Rameb et surtout de la Dimeb. La bonne affinité de la Dimeb pour la PC associée à une bonne solubilisation du cholestérol pourrait expliquer pourquoi l'intégrité membranaire est autant perturbée en présence de ce dérivé.

Une β -cyclodextrine faiblement méthylée, la Crysmeb, a été récemment introduite comme nouvel excipient par les laboratoires Roquette. Elle pourrait offrir l'avantage, à l'instar de l'HP- β -CD, d'augmenter la solubilité de substances actives tout en maintenant une bonne tolérance biologique. Dans notre étude, la simulation de la membrane biologique via l'utilisation de liposomes SPC:CHOL:SA (60:30:10 mol%), a permis de conclure au maintien de l'intégrité membranaire en présence de Crysmeb contrairement aux dérivés hautement substitués. La plus faible solubilisation du cholestérol membranaire semble en être responsable.

Etude de la cytotoxicité des cyclodextrines et mise en relation avec leur capacité d'extraction du cholestérol cellulaire

Des tests d'hémolyse, par ailleurs relativement simples et rapides, ont souvent été utilisés pour classer les cyclodextrines selon leur effet cytotoxique (Dimeb > β -CD > α -CD > HP- β -CD \geq SBE- β -CD) et pour appréhender le mécanisme sous-jacent (Mosher and Thompson, 2000). Les résultats d'un test d'hémolyse ont permis de donner des indications complémentaires quant à la bonne tolérance biologique de la Crysmeb. Ce dérivé de la β -CD n'a pas induit d'hémolyse significative à l'instar du dérivé hydroxypropylé et contrairement à la Rameb qui provoque une hémolyse importante (Belhadj Salem, 2005). Concernant le mécanisme impliqué, les auteurs sont généralement d'accord avec l'hypothèse posée par Irie et al. qui attribue la lyse des érythrocytes à une complexation des composants membranaires induisant leur « relarguage » (Irie et al., 1982; Leroy-Lechat et al., 1994; Irie and Uekama, 1997; Mosher and Thompson, 2000). La lyse des globules rouges induite par les cyclodextrines a donc été utilisée pour expliquer certains aspects de leur toxicité parentérale et notamment pour prédire l'irritation au site d'injection intraveineuse (Medlicott et al., 1998). Vu son faible degré de méthylation, la Crysmeb pourrait s'avérer très intéressante dans les années à venir pour le développement de solutions injectables puisqu'elle induirait moins de toxicité par voie parentérale que les autres dérivés méthylés de la β -CD (Belhadj Salem, 2005).

De manière à évaluer leur éventuelle innocuité vis-à-vis de l'endothélium vasculaire, un large panel de cyclodextrines généralement utilisées dans le domaine pharmaceutique, a été testé dans des essais préliminaires de viabilité réalisés sur des cultures de cellules endothéliales immortalisées. Une mesure indirecte du nombre de cellules adhérentes par un dosage d'ADN, a été utilisée pour évaluer la viabilité de cellules en monocouches suite aux traitements par les cyclodextrines (Pitha et al., 1988; Griffiths, 1993). La β -CD qui précipite à des concentrations supérieures à 1 mM en présence de sérum, n'a pas pu être évaluée à des concentrations plus élevées. Dans les conditions testées, seule la Dimeb à la concentration de 10 mM semble conduire à une modification significative de l'intégrité membranaire. La Crysmeb, tout comme les cyclodextrines admises par voie parentérale à savoir l'HP- β -CD et la SBE- β -CD, s'est révélée plus sûre. Nos résultats sont en adéquation avec ceux de Medlicott et al. ayant également testé ces deux derniers dérivés et la Dimeb sur des cellules endothéliales (HUVEC) (Medlicott et al., 1998). Notons cependant que les concentrations et

le temps d'incubation choisis pour notre étude sont relativement peu importants et que dans d'autres conditions, une toxicité cellulaire plus importante aurait pu être évaluée. Un autre facteur à prendre en compte dans l'évaluation de la cytotoxicité est la densité cellulaire qui peut également influencer les résultats (Leroy-Lechat et al., 1994).

La suite de notre recherche s'est intéressée à la mise en relation des capacités d'extraction du cholestérol par les cyclodextrines avec leur effet cytotoxique. Il est en effet généralement admis que le comportement des cyclodextrines vis-à-vis des membranes biologiques, et particulièrement leur effets hémolytiques ou cytotoxiques, sont dûs à une extraction des composés lipidiques membranaires. Cependant, la majorité des auteurs suppose ce mécanisme sans pour autant avoir mesuré une diminution des taux de cholestérol, lipide présentant la meilleure affinité pour les cyclodextrines.

Nous nous sommes donc efforcés de quantifier les diminutions des taux de cholestérol en présence de cyclodextrines et nous avons déterminé les concentrations qui pourraient garantir la viabilité cellulaire. Pour ce faire, nous avons utilisé comme cellules modèles des cellules endothéliales de type HUVEC et nous avons choisi de solubiliser les cyclodextrines dans un milieu sans sérum. Une cytotoxicité moins importante pourrait en effet être évaluée en présence de sérum, suite à la compétition pour la complexation avec ses constituants (Leroy-Lechat et al., 1994). Les concentrations non toxiques ont été déterminées en compilant les résultats obtenus suite à l'utilisation de différentes méthodes (essais au MTT, taux de protéines totales, observations morphologiques et tests au bleu trypan). La conversion enzymatique du réactif MTT par les mitochondries des cellules vivantes est l'un des essais les plus utilisés pour évaluer la viabilité cellulaire. Nous avons pu mesurer une diminution de l'activité métabolique des cellules en présence de Dimeb et Trimeb à 10 mM. A partir des mesures des taux de protéines totales, nous avons déterminé les concentrations en cyclodextrine garantissant 100% de cellules adhérentes et permettant de garantir une viabilité de 100% par le test au bleu trypan. Nous pouvons dès lors classer les cyclodextrines selon leur effet cytotoxique : Dimeb \geq M β -CD \geq Rameb $>$ Trimeb \geq β -CD $>$ Crysmeb \geq HP- β -CD. Cette classification peut être comparée avec celles d'autres auteurs ayant travaillé sur d'autres types cellulaires mais n'ayant utilisé que quelques uns des dérivés de notre étude (Saarinen-Savolainen et al., 1998; Kiss et al., 2007; Matilainen et al., 2008; Belhadj Salem et al., 2009). Remarquons cependant que les travaux de Garay ayant évalué dans des tests d'hémolyse toutes les cyclodextrines de notre étude sauf la Crysmeb, obtiennent un classement un peu différent pour les dérivés méthylés (Trimeb \cong M β -CD $>$ Dimeb \cong Rameb) (Garay et al., 1994). Les différences pourraient être imputées au protocole expérimental puisque nos essais

DISCUSSION GENERALE

sont réalisés sur des cellules en monocouches et non en suspension comme en cas d'utilisation d'érythrocytes. Des cellules adhérentes, s'étalant sur un support, présentent notamment une courbure différente de celle des cellules en suspension. L'incubation des cyclodextrines avec des suspensions cellulaires permettrait par ailleurs un contact plus important par rapport à l'utilisation de cellules en monocouches.

Des concentrations croissantes de β -CD et de ses dérivés (≤ 10 mM) ont été utilisées pour déterminer les capacités d'extraction du cholestérol à partir de cellules endothéliales. Nous avons préféré établir un protocole permettant de mesurer les taux de cholestérol résiduel au niveau des monocouches cellulaires suite au traitement par les cyclodextrines plutôt que d'évaluer comme d'autres auteurs, le cholestérol libéré dans le surnageant contenant ces molécules. De telles évaluations ne permettent en effet pas de différencier les quantités de cholestérol extraites et celles contenues dans des cellules détachées du support et/ou lysées. Une diminution dose-dépendante des taux de cholestérol a généralement été mesurée pour chaque cyclodextrine testée. Si on compare la capacité d'extraction du cholestérol par les cyclodextrines à la concentration non toxique de 1 mM, nous pouvons les classer comme suit : Trimeb \leq HP- β -CD \leq Crismeb = β -CD < Dimeb = M β -CD \leq Rameb. Néanmoins, la quantité de cholestérol extraite peut varier selon le type cellulaire étudié et selon les conditions expérimentales (Zidovetzki and Levitan, 2007). Notre classification reste toutefois semblable à celles d'autres auteurs ayant testé en partie les mêmes dérivés (Kilsdonk et al., 1995; Visconti et al., 1999). Nous avons pu montrer que dans le cas des β -cyclodextrines méthylées, le D.S. avait une influence sur les capacités d'extraction du cholestérol d'où l'importance de spécifier cette caractéristique pour la cyclodextrine utilisée.

Les résultats d'extraction du cholestérol membranaire sont en bonne corrélation avec les résultats de solubilisation obtenus précédemment, hormis pour la Trimeb et la β -CD. Les cyclodextrines de D.S. proche de 2, solubilisant bien le cholestérol, permettent une bonne extraction du cholestérol cellulaire à l'inverse de dérivés faiblement substitués comme la Crismeb et l'HP- β -CD. L'effet inattendu obtenu avec la Trimeb pourrait s'expliquer par l'encombrement stérique de la molécule qui rendrait l'interaction avec les membranes cellulaires plus difficile. Les résultats obtenus avec la β -CD trouvent sans doute leur origine dans le fait que les diagrammes de solubilité n'ont pas permis de mettre en évidence la formation de complexes cholestérol- β -CD, ceux-ci étant insolubles ou très peu solubles. Rappelons néanmoins que vu sa faible solubilité aqueuse, cette cyclodextrine a été utilisée à des concentrations inférieures à celles de ses dérivés, que ce soit dans les essais de

solubilisation ou de mesures d'intégrité des liposomes. Comme le montrent les résultats d'extraction cellulaire, la complexation est pourtant bien réelle puisqu'on mesure une diminution relativement importante des taux de cholestérol cellulaire après incubation. Par ailleurs, la production de beurre pauvre en cholestérol commercialisé en Belgique sous le nom Balade[®], implique l'utilisation de β -CD dans le procédé de fabrication ce qui prouve l'interaction cholestérol- β -CD (Szente and Szejtli, 2004). De plus, l'administration intraveineuse de la β -CD chez le rat conduit à une diminution transitoire des niveaux plasmatiques de cholestérol et ce de manière dose-dépendante (Frijlink et al., 1991). Ceci serait dû à l'extraction du cholestérol endogène à partir des lipoprotéines LDL par les molécules de cyclodextrine présentes dans la circulation sanguine. En outre, le complexe cholestérol- β -CD présente une solubilité limitée dont la cristallisation dans les tissus rénaux pourrait expliquer sa néphrotoxicité lors de l'administration parentérale.

Les mécanismes d'extraction du cholestérol des membranes, qu'elles soient biologiques ou artificielles, par les cyclodextrines ne sont pas encore totalement élucidés (Beseničar et al., 2008). Comme le rappelle ce dernier auteur, les cyclodextrines ne semblent pas se lier ni s'insérer dans les membranes. La libération du cholestérol à partir des membranes serait due essentiellement à un mécanisme de diffusion aqueuse. Les molécules de cholestérol seraient libérées à partir des cellules ou vésicules lipidiques et incorporées dans les cyclodextrines après diffusion à travers la couche aqueuse (Kilsdonk et al., 1995).

Les résultats de viabilité cellulaire vont être à présent comparés avec ceux de l'étude précédente sur les liposomes, de manière à déterminer si l'utilisation de modèles membranaires est adéquate pour prédire les effets des cyclodextrines au niveau cellulaire. En règle générale, nous pouvons conclure que les cyclodextrines les moins cytotoxiques à savoir l'HP- β -CD et la Crismeb, maintiennent la fonction membranaire dans les deux types d'études contrairement aux dérivés méthylés présentant un D.S. élevé. A nouveau, la faible concentration utilisée dans le cas de la β -CD par rapport aux autres dérivés testés pourrait expliquer l'absence de corrélation entre les effets obtenus sur les cellules et sur les liposomes. Les liposomes utilisés dans notre étude préliminaire sont certainement des modèles très simplifiés par comparaison à la complexité des membranes biologiques (Zepik et al., 2008). Beseničar et al. ont récemment montré sur des modèles membranaires lipidiques, que les quantités de cholestérol extraites dépendaient fortement de leur composition et que la présence de sphingomyéline, constitutive des membranes cellulaires, ralentissait drastiquement l'extraction du cholestérol par la M β -CD. Outre la composition lipidique plus

complexe et l'existence d'hétérogénéités, les membranes cellulaires contiennent de nombreuses protéines (protéines de transport, récepteurs, canaux à ions, ...). Des publications récentes décrivent la possibilité de reconstituer des membranes artificielles contenant des protéines (Kaneda et al., 2009) ou des domaines ressemblant aux radeaux lipidiques (Dietrich et al., 2001). Ce type de membranes aurait sans doute été plus approprié pour notre étude. De même l'utilisation de « vésicules lipidiques géantes », les GUV, de taille et donc de courbure plus comparables à celles des cellules (Bacia et al., 2004) pourrait favoriser un angle de contact adéquat entre les cyclodextrines et les lipides (Hatzi et al., 2007). Il faut également souligner que les résultats sur membranes artificielles sont obtenus sur des liposomes en suspension ce qui favorise probablement les interactions par rapport aux essais sur des monocouches de cellules. On comprend dès lors pourquoi la transposition des résultats est parfois difficile.

Effets des cyclodextrines sur les microdomaines membranaires

La M β -CD, est l'outil le plus couramment utilisé en biologie cellulaire dans l'étude des microdomaines membranaires et des fonctions cellulaires qui y sont associées (Barnes et al., 2004; Danthi and Chow, 2004; Huang et al., 2007). Rares sont les auteurs qui choisissent d'autres dérivés de la β -CD comme la HP- β -CD (Nguyen and Taub, 2002; Liao et al., 2003) ou ceux qui comparent les deux types de dérivés (Wolf et al., 2002). La modification des taux de cholestérol membranaire est impliquée dans la modulation de la signalisation, c'est pourquoi à une même concentration, l'usage de dérivés de cyclodextrines ayant des capacités d'extraction du cholestérol différentes devrait avoir des effets différents. Afin de tester cette hypothèse, nous avons voulu étudier l'effet de la β -CD et de dérivés méthylés. Au début de ce travail, nous nous sommes d'ailleurs interrogés sur la substitution du dérivé méthylé utilisé car certains auteurs ont tendance à employer indifféremment le terme « methyl- β -cyclodextrin » voire de regrouper les cyclodextrines sous le terme β -cyclodextrines qu'elles soient ou non substituées et quel que soit le groupement, ce qui peut être à l'origine de confusions (Liao et al., 2003; Arima et al., 2004; Zidovetzki and Levitan, 2007).

Une étude préliminaire a été réalisée de manière à évaluer l'affinité éventuelle des cyclodextrines pour des composants lipidiques autres que le cholestérol à savoir, les phospholipides. Les diagrammes de solubilité réalisés dans la première étude ont évalué l'affinité des dérivés de β -CD soit pour le cholestérol soit pour la SPC alors que les

DISCUSSION GENERALE

membranes cellulaires sont beaucoup plus complexes et constituées des deux types de lipides à la fois. Aux concentrations testées, aucune des cyclodextrines n'a conduit à une diminution significative des mesures d'absorbance par rapport aux conditions contrôles sans cyclodextrine. Ceci tend à démontrer la spécificité des cyclodextrines vis-à-vis du cholestérol, du moins dans les conditions testées. La cavité interne de la β -CD et en conséquence de ses dérivés n'aurait pas une taille appropriée pour interagir avec les phospholipides contrairement à celle de l' α -CD qui est beaucoup plus petite (Bernat et al., 2007). Nous avons néanmoins pu mettre en évidence une solubilisation relativement importante de SPC en présence de la Dimeb à haute concentration lors de la réalisation des diagrammes de solubilité.

Dans le but d'évaluer l'impact de la substitution de la β -CD sur la déstructuration des microdomaines membranaires et en particulier des cavéoles, nous avons utilisé comme modèles des cellules endothéliales, connues pour contenir des cavéoles en abondance (Minshall et al., 2003; Frank et al., 2003; Sprenger and Horrevoets, 2007). Généralement, les auteurs mettent à profit la précipitation des domaines enrichis en cholestérol et en sphingolipides dans le Triton X-100[®] à 4 °C et isolent les microdomaines grâce à leur faible densité et donc à leur flottation sur gradient de densité discontinu. Des méthodes utilisant d'autres détergents ou sans détergent sont également décrites (Locke et al., 2005; Macdonald and Pike, 2005; Ostrom and Insel, 2006). Parmi ces dernières, nous avons choisi d'utiliser la méthode décrite notamment par Song qui préconise la lyse des cellules dans du carbonate sodique (pH 11) puis l'isolement sur un gradient de saccharose (Song et al., 1996; Ostrom and Insel, 2006). Cette méthode présente des avantages tels que le maintien de certaines protéines dans les fractions correspondant aux microdomaines et qui peuvent être perdues par solubilisation avec des détergents, de même que les problèmes d'extraction sélective de lipides associés à l'utilisation de ces derniers (Gaus et al., 2005; Ostrom and Insel, 2006). Un appareil permettant de réaliser des fractions de manière semi-automatique, le Gradient Station[®], a été utilisé et la détection d'un marqueur des cavéoles, la protéine cavéoline-1, a été réalisée dans les fractions résultantes. Par rapport aux résultats d'autres auteurs, nous avons observé des différences de localisation des cavéoles dans les gradients. Ceux-ci réalisent généralement les fractions manuellement et prélèvent des fractions de volumes précis. Dans notre cas, les fractions sont récupérées sur des distances précises, ce qui a nécessité la réalisation d'une « validation » préliminaire de la méthode de fractionnement. En mesurant les densités des solutions et des fractions de saccharose, nous avons pu déterminer la localisation théorique des cavéoles dans le gradient après ultracentrifugation pour des

conditions contrôles. En effet, si l'on se base sur les données de la littérature, les cavéoles devraient se localiser à l'interface des fractions légères et relativement lourdes de saccharose (5/35%) (Song et al., 1996; Thomas et al., 2004; Macdonald and Pike, 2005). Le traitement par les cyclodextrines devrait induire un déplacement des fractions légères (« cavéolaires ») vers les fractions plus lourdes (« non cavéolaires ») (Labrecque et al., 2003). Il a par ailleurs été confirmé dans notre étude que la cavéoline-1 avait une localisation membranaire mais qu'elle était également localisée au niveau intracellulaire dans différentes structures (Fielding and Fielding, 2003; Frank et al., 2003; Quest et al., 2004; Fielding, 2006).

Nous avons donc comparé les effets obtenus sur des lysats de cellules traitées ou non par des cyclodextrines. Les premiers essais ont été réalisés sur des cellules endothéliales humaines (HUVEC) avec le dérivé généralement utilisé dans la littérature, c'est-à-dire la M β -CD. Des concentrations relativement élevées de l'ordre de 10 mM se sont révélées nécessaires pour obtenir un effet significatif. La M β -CD est en effet généralement testée à 10 mM par les autres auteurs pour déstructurer les microdomaines (Costa et al., 2004; Balijepalli et al., 2006; Zhang et al., 2009). Dans l'expérience suivante nous avons pu montrer que l'effet de la Dimeb est beaucoup plus marqué sur des cellules aortiques bovines et que la sensibilité semblait dès lors dépendante du type cellulaire utilisé. Notons par exemple, que lors de l'utilisation de cellules cancéreuses coliques résistantes à la vinblastine (Caco-2R), aucune délocalisation de cavéoline n'a pu être mise en évidence suite au traitement par la Dimeb à 10 mM (Arima et al., 2004). Dans cette étude, le temps d'incubation était cependant moitié moindre. Une autre équipe ayant pu mettre en évidence la déstructuration des cavéoles de cellules aortiques bovines par l'utilisation de β -CD (Labrecque et al., 2003), nous avons donc décidé de continuer nos expériences avec celles-ci, dans le but de classer les cyclodextrines selon leur capacité à déstructurer les cavéoles. Quelle que soit la cyclodextrine testée, nous avons pu mettre en évidence un déplacement de la cavéoline-1, des fractions légères vers des fractions plus lourdes par rapport aux conditions contrôles. La Dimeb induit le déplacement de cavéoline-1 le plus important avec une accumulation de la protéine dans le fond du gradient et sa disparition totale de la fraction « cavéolaire ». La β -CD et les cyclodextrines méthylées aléatoirement, la M β -CD (D.S. 1.9) et la Rameb (D.S. 1.8), conduisent à une déstructuration moins marquée des cavéoles. La Crismeb et la Trimeb ayant montré une capacité d'extraction du cholestérol cellulaire faible, semblent avoir moins d'effet sur la déstructuration des microdomaines. Nous avons en effet pu mesurer dans le cas du traitement

par ces cyclodextrines, des quantités résiduelles de cavéoline-1 plus importantes dans la fraction légère.

Grâce aux données de la littérature et aux résultats de nos essais, nous pouvons donc affirmer qu'en réduisant les taux de cholestérol, les cyclodextrines peuvent induire la déstructuration des microdomaines membranaires (« rafts » ou cavéoles) et interférer dans les fonctions cellulaires qui les impliquent d'où leurs applications biologiques ou thérapeutiques potentielles (Barenholz, 2004). Remarquons ici que le mécanisme d'action de certaines cyclodextrines comme promoteurs de pénétration, par exemple au travers de l'épithélium respiratoire, pourrait être expliqué par leur capacité à ouvrir ou perturber les jonctions serrées, ce qui favorise la diffusion paracellulaire (Marttin et al., 1998; Belhadj Salem et al., 2009). La « déplétion » en cholestérol aurait des effets directs sur la structure des jonctions serrées (Francis et al., 1999; Wolf et al., 2002; Belhadj Salem et al., 2009). Il a été démontré, que l'utilisation de M β -CD augmente la perméabilité de cellules intestinales en déplaçant des protéines spécifiques depuis des domaines riches en cholestérol associés aux jonctions serrées (Lambert et al., 2005; Lambert et al., 2007; Lynch et al., 2007; Sugibayashi et al., 2009). Une étude récente a identifié la Crysmeb comme étant un adjuvant prometteur pour les préparations pour inhalation étant donné ses capacités de solubilisation d'actifs associées à l'avantage d'une faible toxicité et de propriétés de promotion d'absorption transitoire (Belhadj Salem et al., 2009).

Etude des interactions entre le cholestérol et les cyclodextrines par RMN et modélisation moléculaire

La dernière partie du travail s'est intéressée à l'étude plus spécifique des interactions entre les cyclodextrines, principalement les dérivés méthylés de la β -CD, et le lipide possédant l'affinité la meilleure pour celles-ci, le cholestérol.

Des spectres RMN ^1H et ROESY ont tout d'abord été réalisés sauf dans le cas de la β -CD puisque le complexe cholestérol- β -CD présente une solubilité dans l'eau deutérée limitée. Etant donné la faible solubilité aqueuse du complexe, d'autres auteurs ont enregistré les spectres proton de la β -CD seule ou en mélange avec le cholestérol dans le DMSO bien qu'on considère que ce dernier soit décomplexant (Ravichandran and Divakar, 1998). Leur étude mentionnait également la réalisation de spectres ^{13}C à l'état solide. Notons tout de même que les études précédentes que ce soit sur les liposomes, les cultures cellulaires ou les diagrammes

de solubilité ont été réalisées en milieu aqueux d'où l'intérêt dans un but comparatif de réaliser les spectres dans l'eau deutérée pour mieux simuler les conditions expérimentales. Dans le cas du cholestérol seul, le spectre a été réalisé dans le DMSO en raison de sa faible solubilité dans l'eau deutérée. L'attribution partielle des protons du cholestérol a été réalisée par comparaison à l'étude de Ravichandran (Ravichandran and Divakar, 1998).

Les spectres à une dimension (1D) de la Dimeb et de son complexe ont permis de calculer les variations des déplacements chimiques significatifs des protons internes de la cavité notamment, ce qui est caractéristique d'une inclusion (Dedjaïni and Perly, 1990; Piel et al., 2004). Les interactions ont été confirmées en deux dimensions (2D) principalement avec les protons de la chaîne aliphatique du cholestérol. Nos résultats sont en bonne corrélation avec ceux de Nishijo et al. (Nishijo et al., 2003). Selon ces derniers auteurs, des variations des déplacements chimiques en 1D des protons des groupements méthyles en position 2 et 6 seraient la preuve de la formation de complexes 1:2. Pour rappel, quel que soit le dérivé utilisé dans notre étude, les diagrammes de solubilité obtenus sont du type Ap. L'équipe de Nishijo, ayant étudié les complexes du cholestérol avec la Dimeb et la Trimeb avait conclu à la prédominance de complexes de ce type vu les valeurs élevées des $K_{1:2}$ qui avaient été calculées (Nishijo et al., 2003; Nishijo et al., 2004).

Dans le cas de la Trimeb, en présence de cholestérol, nous avons obtenu une déformation importante du spectre RMN ^1H par rapport à celui de la Trimeb seule, ce qui rend difficile l'attribution des protons. Ceci avait également été observé par l'équipe de Nishijo qui attribue ces signaux déformés à la présence simultanée d'espèces complexées et non complexées (Nishijo et al., 2004). Des taches de corrélation sont détectables sur le spectre ROESY mais du fait des déformations, les interactions avec les protons internes de la cavité sont également difficiles à déterminer.

Vu la présence de différentes β -CDs méthylées en mélange dans le cas de la Rameb (Hazekamp and Verpoorte, 2006), seule une attribution partielle des protons et des conclusions limitées quant à leur implication dans les interactions avec le cholestérol ont pu être établies. Néanmoins, nous pouvons supposer que les spots visualisés en 2D impliquent certainement les protons de la cavité interne.

Dans le cas de la Crysmeb qui est méthylée majoritairement en position 2, l'attribution des protons par comparaison avec d'autres travaux n'a pas posé de problème (Bakkour, 2005). Nous n'avons pas noté de déplacements chimiques significatifs lorsqu'on sature une solution de cette cyclodextrine à 50 mM avec du cholestérol. Les interactions bien que moins importantes, sont tout de même visualisables sur le spectre ROESY avec les protons H-3 et H-

5, ce qui rend compte d'une inclusion effective. Ces dernières observations confirment la plus faible solubilisation du cholestérol par cette cyclodextrine comme nous l'avons démontré lors de la réalisation des diagrammes de solubilité.

Ces études spectroscopiques ont montré les possibilités d'interactions entre les cyclodextrines testées et le cholestérol mais n'ont pas permis de déduire des modes d'inclusion préférentiels.

Les études de modélisation moléculaire sont des méthodes théoriques qui permettraient de déterminer quelles sont les stoechiométries et conformations énergétiquement les plus favorables. La méthode semi-empirique AM1 a été largement employée pour l'étude de complexes entre diverses cyclodextrines et substances actives (Piel et al., 2001; Henry de Hassonville et al., 2004; Bertholet et al., 2005; Ziémons et al., 2007). L'étude de complexes 1:1 et 1:2 entre le cholestérol et la β -CD et/ou ses dérivés a été réalisée en utilisant cette méthode de calcul. Les énergies d'interaction calculées dans le cas des complexes 1:1 au niveau AM1 sont relativement faibles par comparaison aux complexes étudiés précédemment. Des énergies beaucoup plus élevées ont été obtenues dans le cas des complexes miconazole- β -CD par exemple (Piel et al., 2001). Comme cela avait déjà été montré dans l'étude précitée, les cyclodextrines sont très déformables, la molécule de cholestérol étant quant à elle assez rigide. Les énergies de complexation calculées pour les complexes 1:1 au niveau AM1 ne sont favorables que dans le cas des complexes avec la cyclodextrine native ou faiblement méthylée. Dans le cas des complexes 1:2, ces énergies sont négatives pour toutes les conformations envisagées avec les dérivés méthylés étudiés sauf avec la Trimeb et bien plus élevées que pour les complexes 1:1. Ceci tend à prouver la formation préférentielle de complexes 1:2 avec les cyclodextrines méthylées et pourrait expliquer la difficulté pour la Trimeb d'extraire le cholestérol au niveau cellulaire. L'encombrement stérique important de cette cyclodextrine rendrait l'interaction avec les membranes cellulaires moins évidente.

Des méthodes *ab initio* (Dive et al., 1993; Becke, 1993) décrites dans la dernière publication et applicables uniquement à l'étude des complexes 1:1, ont également été envisagées. Par comparaison aux énergies d'interactions obtenues en MINI-1 par exemple, la question reste ouverte quant à la possibilité pour la méthode AM1 de décrire de manière efficace un réseau de liaisons H aussi dense que dans les complexes d'inclusion. Pour la première fois, notre étude soulignerait la nécessité d'utiliser des méthodes plus élaborées, mais malheureusement plus coûteuses, que la méthode semi-empirique pour obtenir une bonne description de la géométrie des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les effets de cyclodextrines naturelles et modifiées couramment utilisées dans le domaine pharmaceutique ont été évalués à l'aide de différents essais. Le tableau 3 compare les résultats obtenus pour 7 cyclodextrines. Les résultats sont exprimés sous la forme de scores qualitatifs.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des effets de différentes cyclodextrines utilisées

CD	Déstructuration liposomes	Solubilité cholestérol	Extraction cholestérol	Cytotoxicité	Déstructuration cavéoles	Interactions RMN
β-CD (D.S. 0)	0	0	++	++	++	ND
Crysmeb (D.S. 0,5)	0	+	++	+	+	+
HP-β-CD (D.S. 0,61)	0	+	++	+	ND	ND
Rameb (D.S. 1,8)	++(+)	+++	+++	+++	++	++
Mβ-CD (D.S. 1,9)	ND	ND	+++	+++	++	ND
Dimeb (D.S. 2)	+++	++(+)	+++	+++	+++	+++
Trimeb (D.S. 3)	++	+++	+	++(+)	+	++

+++ : importante(s) ; ++ : moyenne(s) ; + : faible(s) ; 0 : nulle(s) ; ND : non déterminée(s)

Il a été démontré que la β -CD et ses dérivés hydroxypropylés ou méthylés interagissaient de manière plus ou moins importante avec le cholestérol. Ceci est à l'origine de conséquences différentes au niveau cellulaire. Nous avons pu montrer que dans le cas des dérivés méthylés de la β -cyclodextrine, le D.S. avait une influence sur les capacités de solubilisation et d'extraction du cholestérol au niveau cellulaire, d'où l'importance de spécifier cette caractéristique pour la cyclodextrine utilisée. Des corrélations ont généralement pu être envisagées entre les essais réalisés sur les membranes artificielles et biologiques excepté pour la Trimeb et la β -CD. En effet, dans le cas de la β -CD, sa faible solubilité aqueuse n'a pas permis de l'utiliser aux mêmes concentrations que ses dérivés dans différents essais. Des corrélations sont donc difficiles à établir. Nous avons par contre pu mettre en parallèle les résultats obtenus avec les autres cyclodextrines (Tableau 3). Nous pouvons dès lors grouper les cyclodextrines méthylées de D.S. proche de 2 car elles donnent des résultats similaires. Les effets importants de la Dimeb pourraient en outre être expliqués par une interaction notoire également avec les phospholipides, interaction qui reste toutefois à démontrer au niveau cellulaire. Pour les cyclodextrines faiblement substituées, les observations sont également en accord. Quel que soit le groupement fixé (HP- ou méthyl-), une meilleure

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

tolérance biologique pour ces cyclodextrines est manifeste. L'intérêt d'utiliser l'HP- β -CD comme excipient (à usage parentéral notamment) est déjà bien connu. Le nouveau dérivé méthylé, la Crismeb, pourrait également présenter cet avantage par rapport aux composés hautement substitués.

Pour la Trimeb, les capacités de solubilisation et d'extraction du cholestérol sont difficiles à mettre en parallèle. Ceci va de pair avec l'absence de corrélation en ce qui concerne les déstructurations des liposomes et cavéoles. Comme nous l'avons déjà évoqué, cela pourrait être dû à l'encombrement stérique important de cette cyclodextrine qui défavoriserait les interactions avec les cellules.

Comme perspectives à ce travail, nous pourrions envisager la mise en œuvre de modèles membranaires se rapprochant des membranes biologiques par leur taille et leur composition. Des GUV contenant non seulement du cholestérol, de la sphingomyéline, d'autres phospholipides et dans la mesure du possible des protéines seraient plus appropriées que nos modèles. On pourrait alors simuler la présence de radeaux lipidiques.

Enfin, dans un but d'évaluation des applications thérapeutiques potentielles des cyclodextrines, il serait intéressant d'étudier grâce au protocole utilisé pour l'étude de déstructuration des cavéoles, le déplacement éventuel de protéines co-localisées avec la cavéoline-1 vers les fractions lourdes. Dans ce cadre, nous pourrions par exemple envisager leur effet sur la délocalisation du récepteur au VEGF de type 2 (VEGFR-2) impliqué dans l'angiogenèse (Labrecque et al., 2003) de même que l'évaluation de leurs éventuelles propriétés anti-angiogènes. Les cyclodextrines pourraient offrir de nouvelles perspectives dans l'inhibition de l'angiogenèse tumorale (Strauss et al., 2002). Remarquons que les conséquences des interactions pourraient également impliquer nombre d'autres voies de signalisation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Arima, H., Yunomae, K., Morikawa, T., Hirayama, F., Uekama, K., 2004. Contribution of cholesterol and phospholipids to inhibitory effect of dimethyl- β -cyclodextrin on efflux function of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 in vinblastine-resistant Caco-2 cell monolayers. *Pharmaceutical Research*, 21, 625-634.

Bacia, K., Scherfeld, D., Kahya, N., Schwille, P., 2004. Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. *Biophysical Journal*, 87, 1034-1043.

Bakkour, Y., 2005. Etude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines natives et polymérisées, Thèse de Doctorat en Chimie, Université des Sciences et Technologies de Lille 1.

Balijepalli, R.C., Foell, J.D., Hall, D.D., Hell, J.W., Kamp, T.J., 2006. Localization of cardiac L-type Ca^{2+} channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for β_2 -adrenergic regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 7500-7505.

Barenholz, Y., 2004. Sphingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and rafts to potential medical applications. *Subcellular Biochemistry*, 37, 167-215.

Barnes, K., Ingram, J.C., Bennett, M.D., Stewart, G.W., Baldwin, S.A., 2004. Methyl- β -cyclodextrin stimulates glucose uptake in Clone 9 cells: a possible role for lipid rafts. *Biochemical Journal*, 378, 343-351.

Becke, A.D., 1993. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *Journal of Chemical Physics*, 98, 5648-5652.

Belhadj Salem, L., 2005. Etude de l'inclusion de molécules à activité inhibitrice de metalloprotéases ou anti-angiogène dans les cyclodextrines, Mémoire de D.E.A. en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège.

Belhadj Salem, L., Bosquillon, C., Dailey, L.A., Delattre, L., Martin, G.P., Evrard, B., Forbes, B., 2009. Sparing methylation of β -cyclodextrin mitigates cytotoxicity and permeability induction in respiratory epithelial cell layers in vitro. *Journal of Controlled Release*, 136, 110-116.

Bernat, V., Ringard-Lefebvre, C., Le Bas, G., Lesieur, S., 2007. Action of α -cyclodextrin on phospholipid assemblies. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 113-119.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bertholet, P., Gueders, M., Dive, G., Albert, A., Barillaro, V., Perly, B., Cataldo, D., Piel, G., Delattre, L., Evrard, B., 2005. The effect of cyclodextrins on the aqueous solubility of a new MMP inhibitor: phase solubility, ¹H-NMR spectroscopy and molecular modeling studies, preparation and stability study of nebulizable solutions. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8, 164-175.

Beseničar, M.P., Bavdek, A., Kladnik, A., Macek, P., Anderluh, G., 2008. Kinetics of cholesterol extraction from lipid membranes by methyl- β -cyclodextrin - A surface plasmon resonance approach. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1778, 175-184.

Boulmedarat, L., Piel, G., Bochot, A., Lesieur, S., Delattre, L., Fattal, E., 2005. Cyclodextrin-mediated drug release from liposomes dispersed within a bioadhesive gel. *Pharmaceutical Research*, 22, 962-971.

Comini, S., Mentink, L., 1991. Refining mixtures containing complexes of cyclodextrins with lipophilic compounds such as fatty acids. *Eur Pat. Appl. EP 440539*.

Costa, M.J., Song, Y., Macours, P., Massart, C., Many, M.C., Costagliola, S., Dumont, J.E., Van Sande, J., Vanvooren, V., 2004. Sphingolipid-cholesterol domains (lipid rafts) in normal human and dog thyroid follicular cells are not involved in thyrotropin receptor signaling. *Endocrinology*, 145, 1464-1472.

Danthi, P., Chow, M., 2004. Cholesterol removal by methyl- β -cyclodextrin inhibits poliovirus entry. *Journal of Virology*, 78, 33-41.

Dedjaini, F., Perly, B., 1990. Nuclear magnetic resonance of cyclodextrins, derivatives and inclusion compounds. In: *New trends in cyclodextrins and derivatives*. Duchêne, D. (Ed.), Paris, Chapter 6.

Dietrich, C., Bagatolli, L.A., Volovyk, Z.N., Thompson, N.L., Levi, M., Jacobson, K., Gratton, E., 2001. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophysical Journal*, 80, 1417-1428.

Dive, G., Dehareng, D., Ghuysen, J.M., 1993. Energy Analysis on Small to Medium-Sized H-Bonded Complexes. *Theoretica Chimica Acta*, 85, 409-421.

Fielding, C.J., 2006. Lipid rafts and caveolae. *From Membrane Biophysics to Cell Biology*. Fielding, C.J. (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim, 294 p.

Fielding, C.J., Fielding, P.E., 2003. Relationship between cholesterol trafficking and signaling in rafts and caveolae. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1610, 219-228.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Francis, S.A., Kelly, J.M., McCormack, J., Rogers, R.A., Lai, J., Schneeberger, E.E., Lynch, R.D., 1999. Rapid reduction of MDCK cell cholesterol by methyl- β -cyclodextrin alters steady state transepithelial electrical resistance. *European Journal of Cell Biology*, 78, 473-484.

Frank, P.G., Woodman, S.E., Park, D.S., Lisanti, M.P., 2003. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 23, 1161-1168.

Frijlink, H.W., Eissens, A.C., Hefting, N.R., Poelstra, K., Lerk, C.F., Meijer, D.K.F., 1991. The Effect of Parenterally Administered Cyclodextrins on Cholesterol Levels in the Rat. *Pharmaceutical Research*, 8, 9-16.

Garay, R.P., Féray, J.C., Fanous, K., Nazaret, C., Villegas, M.J., Letavernier, J.F., 1994. A new approach for the in vitro evaluation of cyclodextrin effects on cellular membranes of human cells. In: *Proceedings of 7th International Cyclodextrins Symposium*, Osa,T. (Ed.), Komiyama Printing Co., Tokyo, 377-381.

Gaus, K., Rodriguez, M., Ruberu, K.R., Gelissen, I., Sloane, T.M., Kritharides, L., Jessup, W., 2005. Domain-specific lipid distribution in macrophage plasma membranes. *Journal of Lipid Research*, 46, 1526-1538.

Griffiths, J.B., 1993. Cell quantification-An overview. In: *Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures*. Doyle, A., Griffiths, J.B. and Newell, D.G. (Eds.), Wiley-VCH, Chichester, -Part 4B:0.

Hatzi, P., Mourtas, S., Klepetsanis, P.G., Antimisariis, S.G., 2007. Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: Effect of liposome type and lipid composition. *International Journal of Pharmaceutics*, 333, 167-176.

Hazekamp, A., Verpoorte, R., 2006. Structure elucidation of the tetrahydrocannabinol complex with randomly methylated β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, 340-347.

Henry de Hassonville, S., Dive, G., Evrard, B., Barillaro, V., Bertholet, P., Delattre, L., Piel, G., 2004. Application of molecular modeling to the study of cyproterone acetate stability in the presence of cyclodextrin derivatives. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 14, 357-362.

Huang, P., Xu, W., Yoon, S.I., Chen, C.G., Chong, P.L.G., Liu-Chen, L.Y., 2007. Cholesterol reduction by methyl- β -cyclodextrin attenuates the delta opioid receptor-mediated signaling in neuronal cells but enhances it in non-neuronal cells. *Biochemical Pharmacology*, 73, 534-549.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Irie, T., Otagiri, M., Sunada, M., Uekama, K., Ohtani, Y., Yamada, Y., Sugiyama, Y., 1982. Cyclodextrin-induced hemolysis and shape changes of human erythrocytes in vitro. *Journal of Pharmacobiodyn*, 5, 741-744.

Irie, T., Uekama, K., 1997. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 147-162.

Kaneda, M., Nomura, S.M., Ichinose, S., Kondo, S., Nakahama, K., Akiyoshi, K., Morita, I., 2009. Direct formation of proteo-liposomes by in vitro synthesis and cellular cytosolic delivery with connexin-expressing liposomes. *Biomaterials*, 30, 3971-3977.

Kilsdonk, E.P., Yancey, P.G., Stoudt, G.W., Bangerter, F.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., 1995. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 17250-17256.

Kiss, T., Fenyvesi, F., Pasztor, N., Feher, P., Varadi, J., Kocsan, R., Szente, L., Fenyvesi, E., Szabo, G., Vecsernyes, M., Bacskay, I., 2007. Cytotoxicity of different types of methylated β -cyclodextrins and ionic derivatives. *Pharmazie*, 62, 557-558.

Labrecque, L., Roy, I., Surprenant, D.S., Patterson, C., Gingras, D., Beliveau, R., 2003. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 334-347.

Lambert, D., O'Neill, C.A., Padfield, P.J., 2005. Depletion of Caco-2 cell cholesterol disrupts barrier function by altering the detergent solubility and distribution of specific tight-junction proteins. *Biochemical Journal*, 387, 553-560.

Lambert, D., O'Neill, C.A., Padfield, P.J., 2007. Methyl- β -cyclodextrin increases permeability of caco-2 cell monolayers by displacing specific claudins from cholesterol rich domains associated with tight junctions. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 20, 495-506.

Leroy-Lechat, F., Wouessidjewe, D., Andreux, J.-P., Puisieux, F., and Duchêne, D., 1994. Evaluation of the cytotoxicity of cyclodextrins and hydroxypropylated derivatives. *International Journal of Pharmaceutics*, 101, 97-103.

Liao, Z.H., Graham, D.R., Hildreth, J.E.K., 2003. Lipid rafts and HIV pathogenesis: Virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells. *Aids Research and Human Retroviruses*, 19, 675-687.

Locke, D., Liu, J., Harris, A.L., 2005. Lipid rafts prepared by different methods contain different connexin channels, but gap junctions are not lipid rafts. *Biochemistry*, 44, 13027-13042.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Lynch, R.D., Francis, S.A., McCarthy, K.M., Casas, E., Thiele, C., Schneeberger, E.E., 2007. Cholesterol depletion alters detergent-specific solubility profiles of selected tight junction proteins and the phosphorylation of occludin. *Experimental Cell Research*, 313, 2597-2610.

Macdonald, J.L., Pike, L.J., 2005. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *Journal of Lipid Research*, 46, 1061-1067.

Marttin, E., Verhoef, J.C., Merkus, F.W.H.M., 1998. Efficacy, safety and mechanism of cyclodextrins as absorption enhancers in nasal delivery of peptide and protein drugs. *Journal of Drug Targeting*, 6, 17-36.

Matilainen, L., Toropainen, T., Vihola, H., Hirvonen, J., Jarvinen, T., Jarho, P., Jarvinen, K., 2008. In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells. *Journal of Controlled Release*, 126, 10-16.

Medlicott, N.J., Foster, K.A., Audus, K.L., Gupta, S., Stella, V.J., 1998. Comparison of the effects of potential parenteral vehicles for poorly water soluble anticancer drugs (organic cosolvents and cyclodextrin solutions) on cultured endothelial cells (HUV-EC). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87, 1138-1143.

Minshall, R.D., Sessa, W.C., Stan, R.V., Anderson, R.G.W., Malik, A.B., 2003. Caveolin regulation of endothelial function. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285, L1179-L1183.

Mosher, G., Thompson, D.O., 2000. Safety of Cyclodextrins. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Volume 19, Swarbrick, J. and Boylan, J.C.E. (Eds.), Marcel Dekker, New York, 72-81.

Nguyen, D.H., Taub, D., 2002. Cholesterol is essential for macrophage inflammatory protein 1 β binding and conformational integrity of CC chemokine receptor 5. *Blood*, 99, 4298-4306.

Nishijo, J., Moriyama, S., Shiota, S., 2003. Interactions of cholesterol with cyclodextrins in aqueous solution. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 51, 1253-1257.

Nishijo, J., Moriyama, S., Shiota, S., Kamigauchi, M., Sugiura, M., 2004. Interaction of heptakis (2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin with cholesterol in aqueous solution. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 52, 1405-1410.

Ostrom, R.S., Insel, P.A., 2006. Methods for the study of signaling molecules in membrane lipid rafts and caveolae. *Methods in Molecular Biology*, 332, 181-191.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Piel, G., Dive, G., Evrard, B., Van Hees, T., Henry de Hassonville, S., Delattre, L., 2001. Molecular modeling study of β - and γ -cyclodextrin complexes with miconazole. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 271-279.

Piel, G., Moutard, S., Perly, B., Henry de Hassonville, S., Bertholet, P., Barillaro, V., Piette, M., Delattre, L., Evrard, B., 2004. Comparison of two methods currently used to determine the interaction between cyclodextrins and drugs: phase solubility diagrams and NMR spectroscopy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 14, 87-91.

Pitha, J., Irie, T., Sklar, P.B., Nye, J.S., 1988. Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sciences*, 43, 493-502.

Quest, A.F., Leyton, L., Parraga, M., 2004. Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochemistry and Cell Biology*, 82, 129-144.

Ravichandran, R., Divakar, S., 1998. Inclusion of ring a of cholesterol inside the β -cyclodextrin cavity: Evidence from oxidation reactions and structural studies. *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry*, 30, 253-270.

Saarinen-Savolainen, P., Jarvinen, T., Araki-Sasaki, K., Watanabe, H., Urtti, A., 1998. Evaluation of cytotoxicity of various ophthalmic drugs, eye drop excipients and cyclodextrins in an immortalized human corneal epithelial cell line. *Pharmaceutical Research*, 15, 1275-1280.

Song, K.S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L.A., Sargiacomo, M., Lisanti, M.P., 1996. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 9690-9697.

Sprenger, R.R., Horrevoets, A.J., 2007. Proteomic study of caveolae and rafts isolated from human endothelial cells. *Methods in Molecular Biology*, 357, 199-213.

Strauss, L., Fuenzalida, M., Illanes, J., Dabancens, A., Diaz, E., Lemus, D., Guerrero, A., 2002. Effect of sulfated β -cyclodextrin, a water soluble cycloamylose, on the promotion and/or inhibition of angiogenesis. *Pathology & Oncology Research*, 8, 47-53.

Sugibayashi, K., Onuki, Y., Takayama, K., 2009. Displacement of tight junction proteins from detergent-resistant membrane domains by treatment with sodium caprate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36, 246-253.

Szente, L., Szejtli, J., 2004. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 137-142.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Thomas, S., Suman, R.K., Brumeanu, T.D., 2004. Role of lipid rafts in T cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 52, 215-224.

Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Ning, X.P., Moore, G.D., Valenzuela, J.P., Jorgez, C.J., Alvarez, J.G., Kopf, G.S., 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm - β -cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 3235-3242.

Wolf, A.A., Fujinaga, Y., Lencer, W.I., 2002. Uncoupling of the cholera toxin-G(M1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 16249-16256.

Zepik, H.H., Walde, P., Kostoryz, E.L., Code, J., Yourtee, D.M., 2008. Lipid vesicles as membrane models for toxicological assessment of xenobiotics. *Critical Reviews in Toxicology*, 38, 1-11.

Zhang, S., Liu, T., Liang, H.F., Zhang, H.L., Yan, D., Wang, N.A., Jiang, X.D., Fang, W., Wang, J., Li, P.L., Li, Z.Y., 2009. Lipid rafts uncouple surface expression of transmembrane TNF-alpha from its cytotoxicity associated with ICAM-1 clustering in Raji cells. *Molecular Immunology*, 46, 1551-1560.

Zidovetzki, R., Levitan, I., 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1768, 1311-1324.

Ziémons, E., Dive, G., Debrus, B., Barillaro, V., Frédéricich, M., Lejeune, R., Angenot, L., Delattre, L., Thunus, L., Hubert, P., 2007. Study of the physicochemical properties in aqueous medium and molecular modeling of tagitinin C/cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 910-919.

Liste des publications personnelles

Piel, G., Piette, M., Barillaro, V., Castagne, D., Evrard, B., Delattre, L., 2006. Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: The effect of cyclodextrins on the encapsulation efficiency and the release kinetics. *International Journal of Pharmaceutics*, 312, 75-82. doi:[10.1016/j.ijpharm.2005.12.044](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.044)

Piette, M., Evrard, B., Frankenne, F., Chiap, P., Bertholet, P., Castagne, D., Foidart, J.-M., Delattre, L., Piel, G., 2006. Pharmacokinetic study of a new synthetic MMP inhibitor (Ro 28-2653) after IV and oral administration of cyclodextrin solutions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28, 189-195. doi:[10.1016/j.ejps.2006.01.011](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.01.011)

Piel, G., Piette, M., Barillaro, V., Castagne, D., Evrard, B., Delattre, L., 2007. Study of the interaction between cyclodextrins and liposome membranes: effect on the permeability of liposomes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 309-311. doi:[10.1007/s10847-006-9178-y](https://doi.org/10.1007/s10847-006-9178-y)

Castagne, D., Belhadj Salem, L., Delattre, L., Nusgens, B., Piel, G., 2007. Effect of cyclodextrins on the viability of endothelial cells, 2007. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 105-107. doi:[10.1007/s10847-006-9211-1](https://doi.org/10.1007/s10847-006-9211-1)

Piette, M., Castagne, D., Delattre, L., Piel, G., 2007. Preparation and evaluation of liposomes encapsulating synthetic MMP inhibitor (Ro 28-2653) – cyclodextrin complexes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 101-103. doi:[10.1007/s10847-006-9214-y](https://doi.org/10.1007/s10847-006-9214-y)

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. *International Journal of Pharmaceutics*, 338, 35-42. doi:[10.1016/j.ijpharm.2005.12.044](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.044)

Castagne, D., Fillet, M., Delattre, L., Evrard, B., Nusgens, B., Piel, G., 2007. Study of the cholesterol extraction capacity of β -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63, 225-231. doi:[10.1007/s10847-008-9510-9](https://doi.org/10.1007/s10847-008-9510-9)

Castagne, D., Evrard, B., Nusgens, B., Piel, G. Effect of β -cyclodextrin and its derivatives on caveolae disruption, relationships with their cholesterol extraction capacities. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* (soumis).

Castagne, D., Dive, G., Evrard, B., Frédéricich, M., Piel, G. Spectroscopic studies and molecular modeling for understanding the interactions between cholesterol and cyclodextrins. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (soumis).

Résumé

A ce jour, l'utilité des cyclodextrines comme adjuvant pharmaceutique n'est plus à démontrer. En biologie cellulaire, la méthyl- β -cyclodextrine est un outil couramment utilisé par les expérimentateurs. La déstructuration qu'elle induit au niveau des microdomaines membranaires que sont les radeaux lipidiques ou les cavéoles est mise à profit pour l'étude des fonctions cellulaires qui y sont associées.

Le but de notre recherche est d'étudier les interactions de différentes cyclodextrines couramment utilisées dans le domaine pharmaceutique avec les constituants des membranes liposomales ou biologiques afin de mieux comprendre les conséquences de ces interactions au niveau cellulaire.

L'hypothèse d'une interaction des cyclodextrines avec les constituants lipophiles des membranes cellulaires a souvent été énoncée pour expliquer la cytotoxicité de certains dérivés.

Nous avons pu montrer à l'aide de liposomes unilamellaires utilisés comme modèles membranaires, que l'interaction des cyclodextrines avec leurs constituants, en particulier le cholestérol, est en relation avec une perte de l'intégrité de la membrane. Ces premières études nous ont permis de prédire quels seraient les dérivés qui induiraient la cytotoxicité la plus importante.

La cytotoxicité importante de certains dérivés méthylés (D.S. proche de 2) a été corrélée avec une capacité d'extraction du cholestérol cellulaire relativement élevée. A l'inverse, nous avons montré que les dérivés faiblement substitués extraient peu le cholestérol, ce qui permet d'expliquer la meilleure tolérance observée au niveau biologique avec la Crysmeb et l'HP- β -CD.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de la β -CD et de ses dérivés méthylés sur la déstructuration des microdomaines membranaires. Nous avons étudié la relation entre leur capacité de déstructuration des cavéoles et d'extraction du cholestérol cellulaire. Une extraction relativement élevée du lipide induit un effet important au niveau des microdomaines voire très important dans le cas de la Dimeb, le dérivé ayant l'effet le plus délétère sur l'intégrité des membranes artificielles et biologiques. Un effet moins marqué a également pu être corrélé avec une extraction plus faible du cholestérol par certains dérivés (Crysmeb, Trimeb).

RESUMES

Les taux d'extraction du cholestérol cellulaire mesurés sont en bonne corrélation, mis à part pour la Trimeb et la β -CD, avec les résultats des diagrammes de solubilité. La capacité de solubilisation du cholestérol par les cyclodextrines est en accord avec les interactions plus ou moins importantes observées en RMN. Les résultats de mesure de l'intégrité des membranes artificielles correspondent à ceux obtenus avec les membranes biologiques excepté pour la β -CD, cette dernière n'ayant pu être testée dans les mêmes conditions que les autres cyclodextrines sur les liposomes.

Il est maintenant admis que les cyclodextrines pourraient avoir un intérêt thérapeutique potentiel. En effet, la modulation des taux de cholestérol par l'utilisation de cyclodextrines pourrait être mise à profit pour traiter des maladies ou infections impliquant ces microdomaines membranaires.

Summary

Nowadays, the usefulness of cyclodextrins as pharmaceutical adjuvants is obvious. In cell biology, methyl- β -CD is a tool commonly used by scientists. The disruption of membrane microdomains (such as lipid rafts and caveolae) caused by cyclodextrins is used to study cellular functions.

The aim of this research is to study the interactions of various cyclodextrins currently used in pharmaceutical development with the components of liposomal and biological membranes for a better understanding of the consequences of these interactions at the cell level.

The hypothesis of an interaction between cyclodextrins and lipophilic components of cell membranes has often been suggested to explain the cytotoxicity of some cyclodextrin derivatives.

Using unilamellar liposomes as model membranes, this research has shown that the interaction between cyclodextrins and their components, especially cholesterol, is linked with a loss of membrane integrity. This preliminary study has allowed predicting which derivatives will be the most cytotoxic.

The high cytotoxicity of some methylated derivatives (D.S. close to 2) has been correlated with a relatively strong extraction capacity of cell cholesterol. On the other hand, it has been shown that low substituted derivatives do not extract much cholesterol, which is in agreement with the better biological compatibility observed with Crysmeb and HP- β -CD.

The research has then focused on the effect of β -CD and its methylated derivatives on membrane microdomains disruption. The relation between caveolae disruption and cell cholesterol extraction capacities has been studied. A relatively strong extraction of the lipid highly disturbs the microdomains and this effect is even more important for Dimeb, the derivative showing the highest loss of integrity of artificial and biological membranes. A less marked effect has also been correlated with the lowest cholesterol extraction capacities of some derivatives (Crysmeb, Trimeb).

The measured cell cholesterol extraction rates are in good correlation, except for Trimeb and β -CD, with the results of the solubility diagrams. The cholesterol solubilisation capacity of cyclodextrins is in accordance with the intensity of the interactions observed by NMR. The effects on the integrity of artificial membranes correspond to those obtained with biological membranes except for β -CD, which was not tested on liposomes in the same conditions as those used for the other cyclodextrins.

RESUMES

It is now agreed that cyclodextrins could have a therapeutical potential. Indeed, the modulation of cholesterol levels could be applied for treating raft-related infections and diseases.

Samenvatting

Tegenwoordig is het nut van cyclodextrines als farmaceutisch adjuvant bewezen. Onderzoekers in de celbiologie gebruiken vaak het methyl- β -cyclodextrine. De verstoring die methyl- β -CD veroorzaakt ter hoogte van de microdomeinmembranen, zoals lipide-vlotten en caveolen, wordt gebruikt voor het bestuderen van celeigenschappen.

Het doel van ons onderzoek is het bestuderen van de interactie tussen de verschillende courant gebruikte cyclodextrines en de bouwstenen van de liposomale en biologische membranen. Zo willen we de gevolgen van deze interactie op celniveau beter begrijpen.

De hypothese van een interactie tussen cyclodextrines en lipofiele componenten van celmembranen heeft vaak gediend als verklaring voor de cytotoxiciteit van enkele derivaten.

We hebben unilamelaire liposomen gebruikt als membraanmodellen. Zo kunnen we aantonen dat de interactie tussen cyclodextrines en hun componenten, en in het bijzonder cholesterol, resulteren in het verlies van membraanintegriteit. Deze eerste onderzoeken laten ons toe te voorspellen welke derivaten een grotere cytotoxiciteit zouden teweegbrengen.

De belangrijke cytotoxiciteit van enkele gemethyleerde derivaten (D.S. dicht bij 2) is gecorreleerd aan een relatief hoge extractiecapaciteit van de celcholesterol. Anderzijds hebben we aangetoond dat zwak gesubstitueerde derivaten weinig cholesterol extraheren, waardoor er op biologisch niveau een grotere tolerantie met Crysmeb en HP- β -CD wordt waargenomen.

Nadien hebben we ons verdiept in het effect van β -CD en zijn gemethyleerde derivaten op de vernietiging van membraanmicrodomeinen. We hebben ook de verhouding tussen hun destructiecapaciteit (van de caveolen) en de extractie van celcholesterol bestudeerd. Een vrij hoge extractie van het lipide heeft een groot effect op niveau van de microdomeinen. Bij de derivaten met hoog integriteitsverlies voor kunstmatige en biologische membranen, met name Dimeb, is het effect nog groter. Bij sommige derivaten die weinig cholesterol extraheren, zoals Crysmeb en Dimeb, is het effect kleiner.

De gemeten extractiegehalten van celcholesterol tonen een goede correlatie, met Trimeb en β -CD niet meegerekend, met de resultaten van de solubiliteitsdiagrammen. De solubilisatiecapaciteit van cholesterol door de cyclodextrines hangt samen met de min of meer effectieve interacties, geobserveerd tijdens RMN. De resultaten van de metingen van de integriteit van de kunstmatige membranen komt overeen van die met de biologische, met uitzondering van β -CD. Deze kon immers niet worden getest in dezelfde omstandigheden als de andere cyclodextrines op liposomen.

RESUMES

We kunnen er nu van uitgaan dat cyclodextrines potentieel therapeutisch interessant zijn. Inderdaad, de modulatie van cholesterolwaarden door het gebruik van cyclodextrines zou zelfs kunnen gebruikt worden om ziektes en infecties waarbij microdomeinen betrokken zijn, tegen te gaan.