

Université de Montréal

**Nano-encapsulation : Distribution d'un médicament dans une population de micelles polymères et
mécanisme de perméabilisation de liposomes photosensibles**

Par Benjamin Busseniers

Département de chimie

Faculté des Arts et Sciences

Mémoire déposé à la Faculté des études supérieures et postdoctorales en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M. Sc.) en chimie

Juillet 2017

© Benjamin Busseniers

Résumé

L'encapsulation de médicaments est un domaine en plein essor, car les améliorations thérapeutiques envisageables sont significatives. Dans ce cadre, nous avons étudié, par spectroscopie infrarouge à l'échelle nanométrique, la distribution d'un médicament, le SN-38, dans une population de micelles polymères qui en ont été chargées. La proportion médicament/polymère a été mesurée en comparant les intensités de longueurs d'onde propres au médicament et au polymère. Nous n'avons pas pu obtenir un signal satisfaisant pour une micelle isolée. En étudiant un film laissé par l'évaporation d'une suspension de micelles chargées, nous n'avons pas décelé de différence de teneur en médicament dans la population, dans un intervalle de 5 % autour de la composition théorique (10 (p/p) % de médicament), à part quelques rares amas, possiblement des artefacts dus à la préparation de l'échantillon.

Dans un second temps, nous avons investigué les paramètres influençant la libération d'une sonde fluorescente (la sulforhodamine B, SRB) encapsulée dans des liposomes photosensibles. Cette libération est provoquée par l'isomérisation photoactivée d'un dérivé monoalkylé d'azobenzène (azo) dans la bicouche. L'azobenzène, lorsqu'il est illuminé avec des UV, passe d'une conformation trans, plane, à une conformation cis plus volumineuse, qui perturbe la bicouche et la rend plus perméable. Les liposomes sont composés de cet azo et de sulfate de cholestérol (SC) en proportion SC/azo 3/1 (mol/mol). Ces lipides sont en phase *lo*. Nous avons observé une libération très rapide pendant l'isomérisation même, puis une fuite passive en présence d'azo-cis plus importante qu'en présence d'azo-trans. Il a été démontré que la présence d'azo-trans diminue l'ordre d'une bicouche formée de SC et d'un monoalkyle, diminution accentuée lorsque l'azo est en conformation cis. En remplaçant le SC par d'autres lipides, nous avons testé le comportement de l'azo dans d'autres phases. L'isomérisation est plus lente en phase *gel*, et plus rapide en phase *fluide lamellaire désordonnée (ld)*, par comparaison avec la phase liquide ordonnée (*lo*). En phase *ld*, il semble que la mobilité des lipides permette d'accommoder l'isomère cis sans changement de la perméabilité de la bicouche. Notre système en phase *gel* ne nous a pas permis de faire des mesures reproductibles de libération de SRB.

Mots clés : *Perméabilité, sulfate de cholestérol, azobenzène, stérosomes, isomérisation, photolibération, micelles polymères.*

Abstract

Drug encapsulation is a thriving field, as potential therapeutic improvements are significant. In this framework, we have studied the distribution of a drug, SN-38, by infrared spectroscopy at the nanometric scale, in a population of drug-loaded polymeric micelles. The drug/polymer ratio was measured by comparing the wavelength intensities of the drug and the polymer. We were unable to obtain a satisfactory signal from an isolated micelle. By studying a film left by the evaporation of a suspension of charged micelles, we found no difference in the drug to polymer ratio of the population in a 5% interval around the theoretical composition (10% drug w/w), apart from a few clusters, possibly artefacts from the sample preparation.

In a second step, we investigated the parameters influencing the release of a fluorescent probe (sulforhodamine B, SRB) encapsulated in photosensitive liposomes. This release is caused by the photoactivated isomerization of a monoalkylated azobenzene derivative (azo) in the bilayer. azobenzene, when illuminated with UV radiation, passes from a trans-plane conformation to a more voluminous cis conformation, which disrupts the bilayer and makes it more permeable. The liposomes are composed of this azo and cholesterol sulfate (SC) in SC/azo 3/1 (mol/mol) proportions. These lipids are in the liquid-ordered phase (*lo*). We observed a very rapid release during the isomerization itself, and then a passive leak in the presence of azo-cis, greater than in the presence of azo-trans. It has been demonstrated that the presence of azo-trans decreases the order of a bilayer formed of SC and a monoalkyle, sharper in presence of azo-cis. By replacing the SC with other lipids, we tested the behaviour of azo in other phases. The isomerization is slower in the gel phase and more rapid in the disordered lamellar fluid phase (*ld*), compared to the *lo* phase. In the *ld* phase, it seems that the mobility of the lipids makes it possible to accommodate the cis isomer without changing the permeability of the bilayer. Our *gel* phase system did not allow us to make reproducible SRB release measurements.

Key words: Permeability, cholesterol sulfate, azobenzene, sterosomes, isomerization, photorelease, polymeric micelles.

Table des matières

Résumé.....	II
Abstract	III
Table des matières.....	IV
Liste des figures	VI
Liste des acronymes.....	VII
1. Introduction.....	1
1.1. Encapsulation et nanovecteurs	1
1.1.1. Biodistribution et système immunitaire	3
1.1.2. Biodisponibilité et amélioration de la solubilité.....	3
1.1.3. Délivrance contrôlée.....	4
1.1.4. Propriétés physicochimiques et affinité	4
1.1.5. Taille et élimination	4
1.2. Description des micelles polymères et liposomes	5
1.2.1. Propriétés des micelles polymères.....	5
1.2.2. Micelles de copolymères bloc chargées de SN-38.....	7
1.2.3. Propriétés des liposomes.....	9
1.2.4. Stérosomes photosensibles	11
1.3. Techniques d'analyses.....	14
1.3.1. Réflectance totale atténuée (ATR-IR)	14
1.3.2. Spectroscopie infrarouge à force atomique (AFM-IR).....	15
1.3.3. Résonance magnétique nucléaire du deutérium (^2H RMN).....	18
1.4. Description des travaux	22
2. Matériel et Méthodes	23
2.1. Matériel	23
2.2. Méthodes utilisées pour les études de micelles polymères.....	24

2.2.1.	Expérience en ATR-IR.....	24
2.2.2.	Expérience en AFM.....	24
2.2.3.	Expérience en Spectroscopie nanoIR.....	25
2.3.	Méthodes utilisées pour les études de stérosomes photosensibles	25
2.3.1.	Préparation des LUV	25
2.2.1.	Expérience en spectrofluorométrie.....	25
2.2.2.	Préparation des échantillons pour la ^2H RMN.....	27
2.2.3.	Expérience en ^2H RMN.....	27
3.	Résultats et discussions.....	29
3.1.	Distribution d'un médicament dans des micelles polymères individuelles.....	29
3.1.1.	ATR-IR.....	29
3.1.2.	Lyophilisation	30
3.1.3.	Moulage par goutte	31
3.1.4.	Spectroscopie nanoIR	32
3.1.5.	Conclusion partielle	40
3.2.	Stérosomes : Photolibération	41
3.2.1.	Isomérisation : cinétique et photolibération	41
3.2.2.	Effet de la variation de la phase de la bicouche.....	46
3.2.3.	Conclusion partielle	50
3.3.	Stérosomes : ^2H RMN	51
3.3.1.	Étude des spectres.....	51
3.3.2.	Isomérisation : étude de la cinétique	57
3.3.3.	Conclusion partielle	59
4.	Conclusion et perspectives.....	60
	Remerciements.....	63
	Bibliographie.....	64

Liste des figures

Figure 1 : Structure de l'Irinotécane.....	8
Figure 2 : Structure du dérivé d'azobenzène monoalkylé utilisé dans nos expériences.....	13
Figure 3 : Représentation schématique du principe de réflexion totale atténuée (ATR).....	15
Figure 3 : Schéma du fonctionnement d'un AFM-IR	17
Figure 5 : Éclatement quadripolaire.....	19
Figure 6 : Orientation du lien C-D et éclatement	20
Figure 7 : Spectres de poudre et phases lipidiques	22
Figure 8 : Composition du polymère tribloc PEG – méthacrylate	23
Figure 9 : Spectres ATR-IR de poudres de micelles et SN-38.....	30
Figure 10 : Spectres ATR-IR de poudres de micelles chargées	31
Figure 11 : Image AFM de micelles lyophilisées sur du mica.....	31
Figure 12 : Image AFM d'un échantillon obtenu par moulage par goutte	32
Figure 13 : Spectres obtenus par nanoIR et interférence de l'eau	33
Figure 14 : Comparaison spectres ATR et nano-IR.....	34
Figure 15 : Images chimiques 1510 et 1724 cm^{-1}	35
Figure 16 : Spectres nanoIR des points extrêmes de la carte des rapports d'intensités.....	36
Figure 17 : Image AFM contenant des amas de matière dont un à la concentration en SN-38 élevée.....	37
Figure 18 : Zoom AFM sur l'amas de la Figure 17.....	37
Figure 19 : Spectres obtenus par nanoIR, dont l'un d'un amas à concentration élevée en SN-38	38
Figure 20 : Amas d'un film examiné par AFM, où le signal SN-38 est dominant	39
Figure 21 : Spectres d'absorption UV d'une dispersion de liposomes SC/azo illuminés à 450 et 350 nm.....	41
Figure 22 : Proportion d'azo-cis en fonction de la durée d'illumination à 350 nm. et libération de SRB.....	43
Figure 23 : Libération de SRB de stérosomes SC/azo	44
Figure 24 : Spectres d'absorption des liposomes de SC/azo, DPPC/azo, et POPC/azo	47
Figure 25 : Évolution de la proportion d'azo-cis dans des liposomes de SC/azo, DPPC/azo et POPC/azo....	48
Figure 26 : Libération de SRB de liposomes de POPC/azo	49
Figure 27 : Libération de SRB en fonction de la durée de l'illumination pour deux populations de stérosomes : SC/azo en proportion 3/1 (mol/mol) et SC/azo/PA en proportion 6/1/1 (mol/mol).....	52
Figure 28 : Spectres RMN de PA ₃₁ dans la bicouche de stérosomes et spectres depakés correspondants ..	54
Figure 29 : Spectres RMN depakés de PA ₃₁ dans la bicouche de stérosomes.	56
Figure 30 : Profils d'ordre du système SC/PA ₃₁ /azo-trans, SC/PA ₃₁ /azo-cis et SC/PA ₃₁	56
Figure 31 : Proportion d'azo sous forme cis dans le système SC/azo/PA, : spectrométrie UV-Vis et RMN... 58	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Rayon hydrodynamique et indice de polydispersité des liposomes.....46

Tableau 2 : Temps caractéristique de la régression exponentielle de la cinétique d'isomérisation trans-cis dans la bicouche de liposomes illuminés à 350 nm.....48

Liste des acronymes

AFM : Microscopie à force atomique

AFM-IR : Spectroscopie infrarouge par microscopie à force atomique

ATR-IR : Spectroscopie infrarouge par réflectance totale atténuée

azo : dérivé monoalkylé d'azobenzène

DLS : *Dynamic Light Scattering*, diffusion dynamique de la lumière

EPR : *Enhanced Permeability and Retention effect*, effet d'amélioration de rétention et perméabilité

IR : Infrarouge

nBMA : n-Butyl méthylacrylate

PA₃₁ : Acide palmitique perdeutééré

PEG : Polyéthylèneglycol

PMMA : Poly méthyle méthacrylate

PnBMA : Poly n-butyl méthacrylate

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SC : Sulfate de Cholestérol

SN-38 : 7-Éthyl -10-hydroxy-camptothécine

²H : Deutérium

$\Delta\nu_Q$: Éclatement quadripolaire

1. Introduction

Les nanovecteurs sont un important champ de recherche, un nouveau mode d'administration de médicaments. Nous nous préoccupons dans ce travail de deux questions, la répartition de la charge médicamenteuse dans des nanovecteurs individuels, et le contrôle de la libération de la charge médicamenteuse.

Pour étudier la première question, nous utiliserons des micelles constituées de copolymères bloc. Pour la seconde question, nous utiliserons des liposomes photosensibles composés de sulfate de cholestérol (SC) et d'un dérivé monoalkylé d'azobenzène (azo).

Nous discuterons ici de l'état de l'art des problématiques sous-tendant le projet de recherche, comme l'encapsulation de médicament, ses avantages et les obstacles à son application, les stratégies qui en découlent, ainsi que les types de vecteurs développés à cet égard. Nous développerons plus en détail ceux qui ont fait l'objet de notre étude, c'est-à-dire les micelles polymères, les liposomes et les stérosomes. Enfin, les différentes techniques d'analyse et de caractérisation employées seront développées au besoin selon leur importance dans nos recherches.

1.1. Encapsulation et nanovecteurs

Parmi les obstacles au traitement de maladies graves, les facteurs principaux sont la faible proportion de médicament administré réellement présent et efficace sur site, due à la non-spécificité de la biodistribution, et le temps de rétention à l'échelle cellulaire, faible également, qui empêche une action de longue durée sans administration régulière de nouvelles doses.

En effet, après l'administration du médicament, la molécule, généralement créée avec comme seul but une activité thérapeutique, se répand passivement dans le corps au gré des systèmes circulatoires. Seul un faible pourcentage des molécules, celles effectivement présentes au site d'intérêt, ont l'effet désiré. De plus, de nombreux médicaments présentent des effets secondaires non désirés, causés par leur présence et action dans d'autres parties du corps. La « dose nécessaire » est donc souvent plusieurs fois supérieure à la « dose efficace ».

Depuis plus d'une vingtaine d'années se développe un champ de recherche répondant à cette problématique : la nanomédecine. Ce champ inclut l'encapsulation de médicaments dans

des assemblages supramoléculaires appelés nanovecteurs.^{1,2} Ces nanovecteurs peuvent être composés de polymères, de lipides, de peptides, de glucides, de composés organométalliques, ou d'une combinaison de ces matériaux, et mesurent en général entre une dizaine et plusieurs centaines de nanomètres.

On attend du nanovecteur idéal qu'il protège le médicament d'une dégradation ou interaction prématurée, qu'il améliore l'absorption du médicament par les tissus visés, qu'il permette de contrôler la pharmacocinétique et la distribution tissulaire (biodistribution) du médicament, et qu'il améliore la pénétration cellulaire. Il faut également que ses constituants soient biocompatibles et facilement fonctionnalisables, qu'ils soient solubles ou en suspension colloïdale en conditions aqueuses, qu'ils aient un temps de circulation et de conservation raisonnables, et un faible taux d'agrégation.³

Le terme « nanovecteur » recouvre une gamme incroyablement large d'assemblages supramoléculaires utilisés pour véhiculer d'autres molécules et les isoler du milieu extérieur.

Les premiers exemples sont les liposomes, connus depuis les années 60¹² et étudiés pour ce type d'applications depuis les années 90.¹³ D'autres nanovecteurs reposent sur l'utilisation de capsules virales vidées de leur contenu, de nanotubes de carbone ou de nanoparticules de silice mésoporeuse. La liste est longue et extrêmement variée, car l'imagination et l'ingéniosité des chercheurs sont les seules limites à l'élaboration d'un prototype de nanovecteur.

On peut diviser grossièrement les nanovecteurs en trois catégories.

1. Les nanocapsules et les liposomes, coquilles creuses pouvant contenir une solution ou suspension isolée du milieu extérieur. Il s'agit souvent d'une suspension aqueuse pour un médicament hydrophile.^{14,15}
2. Les nanosphères, les nanoparticules et les micelles, sans compartiment intérieur, de forme plus ou moins sphérique. Les interstices de la matrice peuvent accueillir des molécules, souvent hydrophobes, car le cœur de la nanosphère est souvent plus hydrophobe que sa coquille.¹⁶⁻¹⁸
3. Les dendrimères : des molécules sphériques branchées répétitives à structure arborescente. L'intérêt des dendrimères vient de leur rigoureuse monodispersité, de leur symétrie extrêmement prévisible, et des propriétés des

coquilles externes (la surface) et internes (entre le cœur du dendrimère et la coquille externe) : comme chaque « niveau » peut théoriquement être constitué de monomères différents, la personnalisation est infinie.¹⁹

Cette liste n'est bien entendu pas exhaustive, et on y a seulement survolé quelques applications relativement proches de nos systèmes - micelles polymères et liposomes (stérosomes).

Avec l'encapsulation des médicaments, un éventail de possibilités exceptionnellement vaste s'ouvre pour les médecins et chercheurs, leur offrant des outils pour tailler sur mesure un médicament et un mécanisme de délivrance adaptés au patient. Ciblage passif ou actif, délivrance contrôlée, protection et solubilisation du médicament, évitement du système immunitaire, temps de circulation prolongé, voilà résumée une bonne partie des avantages que l'encapsulation peut apporter par rapport au médicament nu.

1.1.1. Biodistribution et système immunitaire

Contrôler la biodistribution du médicament est la clé pour améliorer le rapport quantité efficace/quantité administrée, et donc minimiser les effets secondaires puisqu'on peut diminuer la dose. Pour cela, le nanovecteur est fonctionnalisé afin de répondre au mieux à l'application étudiée. Pour une activité anti-tumorale, par exemple, on vise une longue circulation dans le sang, afin que les nanovecteurs puissent s'accumuler dans les tissus tumoraux, en passant à travers les parois défectueuses des capillaires autour et dans ces tissus. Le système lymphatique y est aussi souvent défectueux et le drainage inefficace. Ce phénomène est appelé « l'effet de rétention et perméabilité augmentée »⁴ (EPR) et est un élément clé dans les applications de ciblage « passif ».

1.1.2. Biodisponibilité et amélioration de la solubilité

Certains médicaments dont l'activité thérapeutique est avérée et intéressante, ne sont cependant pas utilisables, parce qu'ils sont accompagnés de lourds effets secondaires, en raison de leur sensibilité à des enzymes et protéines présentes dans le système circulatoire, ou encore de leur faible solubilité dans les milieux aqueux dont le sang.⁵

Il est possible d'augmenter la solubilité des médicaments, en utilisant un nanovecteur dont le caractère amphiphile est suffisamment marqué pour favoriser la solubilisation du médicament au sein du nanovecteur, et la solubilité du nanovecteur dans le sang. Ces deux

solubilités (médicament dans le nanovecteur, nanovecteur dans le sang) peuvent être sensibles à divers paramètres comme la température ou le pH. On peut également ouvrir de nouvelles voies d'administration qui ne sont pas envisageables pour le médicament nu, comme la distribution transcutanée.⁵

1.1.3. Délivrance contrôlée

Avec le ciblage actif, la délivrance contrôlée est le second plus grand objectif en nanomédecine : pouvoir dicter le lieu, la durée, et le taux de libération permet de limiter les effets secondaires en limitant la dose circulante, mais aussi de diminuer le nombre d'injections ou de comprimés, donc d'augmenter le confort du patient.

On peut même penser à une libération modulable à distance, qu'on puisse activer et désactiver de manière non invasive. L'utilisation de lumière ou de champ magnétique sont deux exemples en développement.^{6,7}

1.1.4. Propriétés physicochimiques et affinité

On choisit le matériau sur la base des structures qu'on peut lui faire prendre et de ses propriétés physicochimiques comme l'hydrophobicité, la sensibilité aux variations de pH, etc. Un matériau se dégradant à bas pH peut être par exemple utilisé pour des formulations visant à libérer un médicament tôt dans le tractus intestinal.

L'encapsulation s'appuie sur différentes interactions, dont l'interaction hydrophobe, les interactions électrostatiques, les ponts hydrogène, les liaisons covalentes, labiles ou non, réversibles ou non.⁸ On peut cependant rassembler les différents cas en trois types : l'encapsulation interne, où le médicament est chargé au cœur du nanovecteur, comme un médicament hydrophobe dans un polymère amphiphile ; l'encapsulation en surface, souvent avec un médicament amphiphile, où une partie du médicament peut être en contact avec le milieu extérieur ; et le cas où le médicament est lié à la surface du nanovecteur, exposé au milieu extérieur.

1.1.5. Taille et élimination

La taille du nanovecteur a une grande influence sur son élimination dans le corps. Les particules ayant un diamètre de l'ordre de 100-150 nm ont généralement le temps de circulation le plus long. Les particules de l'ordre du micron peuvent s'accumuler dans les capillaires des poumons. Il y a rétention de nanoparticules dont le diamètre est supérieur à 200-

250 nm dans les reins, à cause des fentes interendothéliales mesurant entre 200 et 500 nm.⁹ Un endothélium discontinu est présent dans le foie, présentant des fenêtres capables de laisser passer des nanoparticules de 50-100 nm.¹⁰ Enfin, les nanoparticules dont le diamètre est inférieur à 10 nm sont rapidement éliminées par les glomérules rénaux¹¹ après administration intraveineuse. Par contre, ces accumulations non spécifiques à des endroits précis peuvent être mises à profit pour des applications dédiées.^{1,8}

1.2. Description des micelles polymères et liposomes

Dans cette section, nous étudierons plus en détail la fabrication et les propriétés des micelles polymères et des liposomes.

1.2.1. Propriétés des micelles polymères

1.2.1.1. Propriétés des polymères et cohésion des micelles

Celles-ci sont composées d'un cœur plutôt hydrophobe et d'une coquille plutôt hydrophile. Elles doivent donc être composées d'un matériau combinant ces propriétés, le plus souvent un polymère di- (ou tri -) bloc. En milieu aqueux, il est connu que les copolymères amphiphiles à blocs ayant une grande différence de solubilité entre les blocs hydrophiles et hydrophobes s'assemblent en micelles de taille plutôt uniforme, dont l'architecture marque une différence claire entre le cœur et la coquille isolante de la micelle.^{20,21}

Le polyéthylène glycol (PEG) est le polymère hydrophile le plus utilisé, puisqu'il répond à plusieurs critères capitaux : biocompatibilité, protection contre le système immunitaire et fonctionnalisable au besoin. Le choix de polymères hydrophobes est plus varié, mais limité par les mêmes impératifs de non-toxicité. Bien qu'il ne soit pas en contact direct avec l'environnement, lorsque la micelle est dégradée, il faut que les produits de dégradation puissent être métabolisés ou excrétés. Dans cette optique, le poly (acide lactique) (PLA), le poly (acide glycolique) (PG), et le poly (méthyle méthacrylate) (PMMA) ont été approuvés par la Food and Drug Administration et sont couramment utilisés.

La micelle tient sa cohésion de différentes interactions :

Interactions hydrophobes : au cœur de la micelle, les composants hydrophobes cherchent à minimiser les interactions avec l'eau. La présence de médicament conjugué sur le bloc hydrophobe peut également participer à ces interactions stabilisantes.²² De manière

générale, plus la partie hydrophobe du polymère est grande, plus la micelle est résistante à la dissociation et fuit moins.²³

Interactions électrostatiques : il est possible de créer des micelles d'une taille très précise avec des polymères chargés, polycation et polyanion, si l'un d'eux comporte également un bloc de PEG. Ces blocs PEG fixent le diamètre de la micelle par leur encombrement stérique, quel que soit le degré de polymérisation des polyions et leur ratio dans la suspension.²⁴ L'intérêt de ces micelles vient de la nature ionique de leur cœur, à la différence des micelles classiques.²⁴ On peut aussi former une micelle avec un polycation et un oligonucléotide.²⁵

Complexation métallique : tout comme le médicament hydrophobe peut participer à la cohésion du cœur de la micelle, la complexation d'ions métalliques du médicament avec les polymères peut avoir un effet identique. Le cisplatine, un complexe de platine, chlore atomique et ammoniac, en est un exemple.²⁶

Ponts hydrogène : les polymères bloc PEG-Poly (acide aminé) sont de bons candidats pour l'encapsulation et le ciblage de médicaments, grâce à leur biocompatibilité, la facilité de (co -) polymérisation et la capacité de choisir la géométrie des copolymères. Cette capacité est due aux nombreux ponts H possibles avec des acides aminés, et à la fonctionnalisation des chaînes latérales.²⁷

1.2.1.2. Préparation des micelles polymères

En fonction des propriétés physicochimiques des copolymères bloc, il y a deux grandes catégories de méthodes d'encapsulation du principe actif :

Pour les polymères amphiphiles et médicaments non solubles dans l'eau, un solvant adéquat ou une émulsion de plusieurs solvants est nécessaire. Le mécanisme de formation dépend de la méthode de retrait du solvant. La dialyse provoque l'augmentation de la concentration des polymères et la micellisation. Si le solvant est évaporé, un film de polymère et médicament est formé, dans lequel les interactions entre ceux-ci sont favorisées. La réhydratation avec une solution aqueuse chaude produit les micelles chargées. Une étape supplémentaire de réticulation peut fixer et stabiliser les micelles.²⁸

Pour des polymères amphiphiles hydrosolubles, le polymère et le médicament sont dissous dans une solution aqueuse. Cela fonctionne surtout pour des copolymères modérément

hydrophobes, et il faut parfois chauffer la solution pour déshydrater les segments qui forment le cœur et provoquer la micellisation. Cette méthode fonctionne aussi pour les micelles basées sur des polyions.^{28, 29}

1.2.1.3. Stabilité des micelles

La stabilité de la micelle est un facteur clé : elle doit résister à la dissociation et ne pas se vider de sa charge prématurément. Il est connu que les protéines sanguines s'adsorbent sur les corps étrangers chargés ou hydrophobes, accélèrent leur élimination, et peuvent provoquer une diminution de la cohésion de la micelle et la libération de la charge utile. Il faut donc étudier soigneusement les interactions micelles-protéines. La présence de PEG ne suffit pas toujours à empêcher toute libération prématurée du médicament par les protéines, même lorsqu'il empêche leur adsorption.³⁰ La distribution du médicament dans la micelle a également son importance : à quel point le médicament est-il cantonné au cœur de la micelle ? C'est une des questions qui a mené au projet de recherche de ce mémoire, en partenariat avec Altus Formulation.

La stabilité dépend de facteurs intrinsèques comme la cohésion, la composition et l'état du cœur de la micelle : les cœurs cristallins ou dont la température de transition vitreuse est supérieure à 37 °C montrent une meilleure stabilité cinétique et une fuite passive moindre.³¹ Des segments hydrophobes plus longs et en plus grande proportion dans un polymère amphiphile mènent à une meilleure stabilité thermodynamique et à une fuite passive moindre.³² La réticulation du cœur et/ou de la coque, la conjugaison du médicament aux segments du cœur sont également des moyens envisageables.³³

1.2.2. Micelles de copolymères bloc chargées de SN-38

Nous avons eu l'opportunité de travailler avec un système venant de l'industrie pharmaceutique, des micelles polymères d'une taille de l'ordre de la centaine de nanomètres, dans lesquels un agent anticancéreux hydrophobe est encapsulé. L'objectif était d'étudier la distribution du médicament dans la population des micelles.

1.2.2.1. Propriétés du SN-38

Le SN-38 (7 -éthyl -10-hydroxy-camptothécine) est le dérivé métabolique et principe actif de l'irinotécane, un médicament anticancéreux développé dans les années 90.³⁴ Celui-ci est lui-même dérivé de la camptothécine, extraite de l'écorce du *Camptotheca acuminata*, un arbre

chinois. L'irinotécane est composé de la molécule de SN-38 auquel un groupement bis-piperidine a été greffé sur le phénol pour la rendre soluble (voir Figure 1). L'irinotécane est un inhibiteur de la topoisomérase I, une enzyme clé dans le fonctionnement et la multiplication cellulaire.^{35,36} Le SN-3 est quelques ordres de grandeur plus actif que l'irinotécane dans son action inhibitrice, mais sa solubilité dans le sang est 100x plus faible que l'irinotécane.³⁷

Il a été démontré que seuls quelques pourcents de la dose d'irinotécane délivrée sans vectorisation, étaient convertis en SN-38.³⁸ De plus, 95 % du SN-38 en circulation était lié à des protéines circulantes, diminuant encore sa biodisponibilité.³⁹ Enfin, l'irinotécane est relativement toxique, et provoque diarrhées et affaiblissement du système immunitaire chez le patient.⁴⁰ Utiliser du SN-38 plutôt que de l'irinotécane présente donc deux effets positifs : plus de cytotoxicité pour les cellules cancéreuses, et moins d'effets secondaires. Cependant, le SN-38 est hydrophobe, donc inutilisable comme médicament libre ou avec un excipient simple.

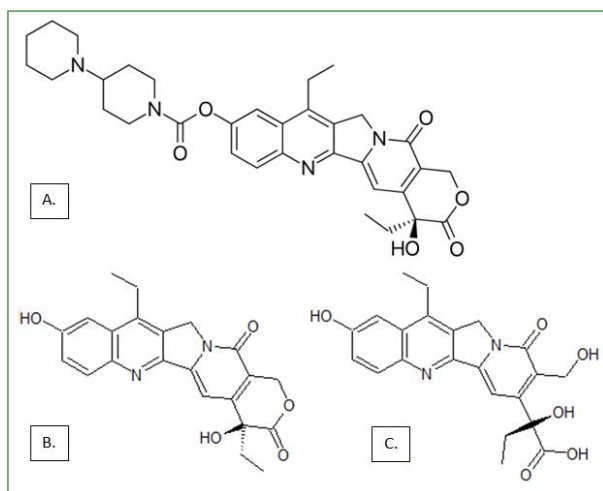


Figure 1 : Structure de l'Irinotécane (A), du SN-38 (B), et du SN-38 inactivé, dont la fonction lactone a été hydrolysée (C).

1.2.2.2. Encapsulation du SN-38

On trouve dans la littérature plusieurs tentatives visant à augmenter la solubilité du SN-38 en milieu aqueux, son temps de circulation et sa biodisponibilité. Le SN-38 a été greffé sur du PEG et des polymères bloc incorporant du PEG, sur des acides aminés, et sur d'autres polymères.⁴¹⁻⁴⁴ Il a aussi été incorporé à des nanoparticules polymères qui ont aidé à passer outre la résistance à l'irinotécane de certaines souches tumorales. Cette résistance repose

notamment sur l'hydrolyse de la fonction lactone (voir Figure 1 C).⁴⁵ Alternativement, le SN-38 a été greffé sur un court peptide cationique, inspiré par des anticorps anti-ADN, capable de pénétrer la cellule et le noyau.⁴⁶ La solubilité du SN-38 dans le sang avec ce conjugué et la durée de circulation sanguine sont grandement améliorées, ce qui mène à une quantité élevée de SN-38 libre dans le plasma.⁴⁷

Ces applications montrent la diversité des possibilités d'encapsulation du SN-38 : greffé ou non, chargé dans une micelle, véhiculé par un ou des polymères, un peptide, ou un croisement des deux. Chacune de ces applications a amélioré la solubilité et la pharmacocinétique du SN-38 par rapport à la forme libre et a conduit à une efficacité d'action supérieure à l'irinotécane.

1.2.3. Propriétés des liposomes

Les liposomes sont des globules composés de lipides formant une (ou des) bicouche(s) entre un (ou des) compartiment(s) aqueux, et le milieu extérieur. De plusieurs microns à quelques dizaines de nanomètres de diamètre, plusieurs dénominations sont utilisées : petites vésicules unilamellaires (SUV pour *small unilamellar vesicle*), grandes vésicules unilamellaires (LUV pour *large unilamellar vesicle*) et grandes vésicules multilamellaires (MLV pour *multilamellar vesicle*).

1.2.3.1. Stabilité des liposomes

La stabilité des liposomes est assurée par plusieurs interactions. D'abord l'interaction hydrophobe impliquant les lipides est associée à leur tendance à minimiser l'aire de contact de leurs chaînes acyles avec le milieu hydrophile. Ensuite, suivant la composition de la bicouche lipidique, il peut y avoir des interactions pont hydrogène ou électrostatiques stabilisantes entre les fonctions des têtes hydrophiles. Les forces de van der Waals interviennent également dans la bicouche.⁴⁸

Les lipides porteurs de charges ont des avantages et désavantages. Le système immunitaire est plus sensible aux particules chargées, mais, une charge de surface peut faciliter les interactions avec les cellules et la pénétration de la peau du principe actif⁴⁹, puisque la membrane cellulaire est chargée négativement.⁵⁰ Avoir des liposomes chargés permet également de limiter efficacement l'agrégation des liposomes.⁵¹

1.2.3.2. Préparation des liposomes

La fabrication de liposomes repose sur les affinités des éléments constitutifs (lipides, additifs et charge éventuelle) pour les milieux aqueux ou hydrophobes.⁵² Par exemple, la plus ancienne méthode, dite de Bangham, repose sur la formation d'un film lipidique par évaporation d'un solvant relativement volatil dans lequel les lipides ont été solubilisés. Le film est ensuite hydraté par une solution aqueuse sous agitation pour former des liposomes. Si on désire réduire la taille des liposomes et l'uniformiser, on extrude la suspension lipidique. La taille finale dépend du rayon des pores et du nombre de passages au travers des filtres.⁵³ Des méthodes basées sur la microfluidique ont été plus récemment développées, grâce à l'avancement de la nanotechnologie. Un exemple en particulier repose sur la micro -(et nano-) lithographie, permettant de créer des microcanaux (diamètre jusqu'à 500 μm) grâce auxquels un contrôle très poussé sur la distribution de taille est possible.⁵⁴

Pour charger passivement un principe actif dans les liposomes, on peut simplement mettre les lipides en présence du principe actif lors de la fabrication ; l'encapsulation a lieu sans étape supplémentaire. L'efficacité d'encapsulation dépend des propriétés physicochimiques des solvants, lipides et médicament. Le chargement actif peut être causé par un gradient (pH, salin,...) entre le cœur du liposome et le milieu extérieur. Par exemple, on peut créer un gradient de pH en hydratant les lipides avec un tampon à un certain pH, puis en dialysant pour remplacer le tampon par un autre de pH différent. Les pH sont choisis pour que le médicament soit neutre dans le tampon extérieur, afin qu'il traverse la membrane, et devienne chargé dans le liposome, pour l'empêcher de retraverser la membrane.⁵⁵

1.2.3.3. Délivrance d'un principe actif

La délivrance d'un médicament encapsulé peut être déclenchée par un stimulus à l'intérieur du corps, ou externe.

La plupart des applications reposant sur un stimulus interne dépendent de la différence de pH entre le pH physiologique normal du sang, 7.4, et le $\text{pH} \leq 6$ qu'on retrouve dans les tumeurs et les sites d'inflammation. La perturbation de la bicouche liposomale nécessaire à la libération du médicament a lieu grâce à un changement de conformation de différentes molécules sensibles au pH incluses dans la bicouche.⁵⁶

Plusieurs types de stimuli externes sont envisageables. Les liposomes peuvent par exemple être thermosensibles. Pour les applications chez l'humain, il faut une déstructuration suffisamment marquée dans un intervalle de température assez faible, entre 37 et 43 °C environ. Provoquer un changement de phase d'une bicouche lipidiques⁵⁷ et un changement d'hydrophilicité d'un polymère incorporé dans la bicouche d'un liposome⁵⁸ sont deux exemples. La chaleur requise pour l'augmentation de température peut être apportée entre autres par un bain thermostaté, des impulsions électromagnétiques, ou des ultrasons focalisés.⁵⁹ Des liposomes peuvent aussi être « photo-activés » directement via des lipides sensibles à la lumière, ou via une autre molécule photosensible qui perturberait la bicouche pendant et/ou après l'illumination.⁶⁰ C'est le mécanisme de la perturbation de perméabilité membranaire associée à un dérivé alkyle d'azobenzène (azo) qui est étudié aux points 3.2 et 3.3 de ce mémoire.

1.2.4. Stérosomes photosensibles

L'ajout de cholestérol dans une phase lipidique améliore sa stabilité, diminue sa perméabilité, change la tension et la densité de charge de surface.⁶¹⁻⁶³ La possibilité de créer des liposomes avec une fraction de stérols très élevée a été investiguée par Guillaume Bastiat et collaborateurs, qui ont créé des « stérosomes », des LUV composées d'un stérol, comme le cholestérol (Chol) ou le sulfate de cholestérol (SC), et d'une amphiphile monoalkylé comme l'acide palmitique. Ces stérosomes présentent une fuite passive très faible, et un ordre de chaîne très élevé.^{64,65} Modifier la composition lipidique a permis de changer la sensibilité au pH des stérosomes : la fuite passive augmente considérablement lorsque le pH devient acide s'il y a beaucoup de SC, tandis qu'il faut qu'il soit basique s'il y a surtout du Chol.

Zhong-Kai Cui et collaborateurs ont élargi le champ des stérols et acides gras monoalkylés utilisés dans la formulation : longueur de chaîne alkyle, nature de la tête polaire du monoalkylé et du stérol et substitution du stérol ont été étudiées.⁶⁶ Ils ont également mené des tests sur des formulations PEGylées de ces stérosomes.⁶⁷ Enfin, ils ont mis au point des stérosomes avec du sulfate de cholestérol, et un dérivé d'azobenzène porteur d'une chaîne alkyle et d'une tête polaire ammonium (azo), dans des proportions SC/azo 3/1 (mol/mol). La perméabilité de ces stérosomes est photosensible, permettant une libération contrôlée de la charge. Il est possible, en illuminant ces stérosomes avec de la lumière UV de provoquer une importante fuite, puis de faire cesser cette fuite en illuminant avec de la lumière bleue.⁶⁸

On désire identifier les paramètres qui contrôlent la photolibération due à la présence de l'azo et à son isomérisation. Pour cela, nous avons examiné l'impact de la phase de la matrice lipidique sur la photolibération. De plus nous avons caractérisé l'effet de l'isomérisation trans-cis du groupement azo sur l'ordre du cœur hydrophobe d'une bicouche SC/azo, par résonance magnétique nucléaire (RMN) du deutérium à l'état solide

1.2.4.1. Dérivé d'azobenzène utilisé dans nos travaux

La Figure 2 présente notre dérivé d'azobenzène. Il est composé d'une tête choline, d'une chaîne de dix méthyles et d'un groupement azobenzène. L'azobenzène est composé de deux benzènes liés par une double liaison entre deux N. Cet assemblage possède deux isomères structuraux, trans et cis. Le groupement est plan sous forme trans et non sous forme cis.⁶⁹ La forme trans est la forme thermodynamiquement stable.^{70,71} Elle présente un pic d'absorption autour de 350 nm⁶⁸, associé à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ de l'azobenzène. La forme cis possède un pic plus petit autour de 450 nm. Celui-ci correspond à la transition $n \rightarrow \pi^*$ de l'azobenzène.^{70,72} La photoisomérisation trans-cis de ce composé est possible et extrêmement vite (de l'ordre de la picoseconde) lorsqu'il absorbe un photon UV. Le mécanisme d'isomérisation n'a pas encore été totalement élucidé, et deux chemins sont proposés actuellement : via un état de transition semi-linéaire et hybridé, ou par rotation autour du lien N=N, qui est alors brisé et reformé.⁷³

La stabilité de l'isomère cis et la cinétique de retour vers la forme trans dépendent des substituants, mais aussi du milieu⁷⁴⁻⁷⁶; la forme trans est, par exemple, favorisée par l'empilement serré des chaînes de la bicouche.⁷⁶ Il est possible de choisir la longueur d'onde causant la photoisomérisation en plaçant des substituants appropriés sur les benzènes. Aujourd'hui, entre 40 et 60 % des colorants industriels sont des dérivés d'azobenzène.⁷⁷ La photoisomérisation a donné lieu à nombre de ces applications.⁷⁸ On peut citer comme exemples bloquer ou libérer l'ouverture d'un canal membranaire⁷⁹ ou un pore de nanoparticule de silice⁸⁰, ou encore agir comme actuateur moléculaire⁸¹ où le mouvement moléculaire collectif joue un rôle d'interrupteur pour un système électrique.⁸²

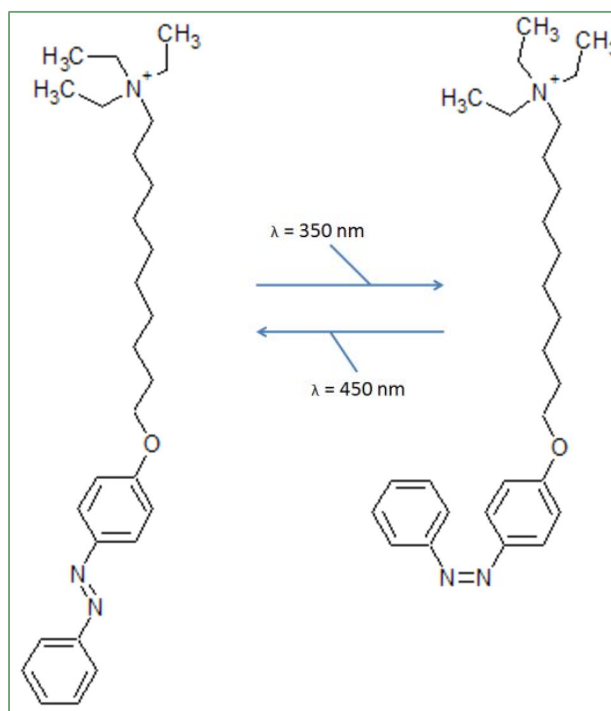


Figure 2 : Structure du dérivé d'azobenzène monoalkylé utilisé dans nos expériences. À gauche, la forme trans, à droite la forme cis.

1.2.4.2. Phases lipidiques

Afin d'étudier le comportement de l'azo dans une bicouche lipidique dans différentes phases, et l'effet de l'isomérisation de celui-là sur la perméabilité de ces bicouches, nous avons préparé trois systèmes, tous trois en proportion (mol/mol) 75 % Lipide/25 % azo. Les lipides utilisés sont :

- La 1,2 -Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), un phospholipide dont les chaînes de seize atomes de carbone sont saturées, formant des bicouches lipidiques en phase *gel* à température ambiante puisque sa température de transition gel-fluide (T_m) est de 41 °C.⁸³
- La 1 -palmitoyl -2-oléoylphosphatidylcholine (POPC) ($T_m = -2$ °C), un phospholipide portant une insaturation cis sur la chaîne oléyl entre les carbones C₉ et C₁₀. L'insaturation empêche la POPC de créer des bicouches aussi compactes que celle de la DPPC, et forme donc des bicouches lipidiques en phase *fluide lamellaire désordonnée (ld)* à température de la pièce.⁸⁴

- Le sulfate de cholestérol forme, dans un mélange aux proportions 3/1 avec un lipide monoalkylé comme l'acide palmitique ou l'azo, des bicouches en phase *liquide ordonnée* (*lo*).⁶⁴

La phase d'une bicouche lipidique est dictée principalement par les interactions hydrophobes, les forces de van der Waals et les interactions entre les têtes polaires. La densité des chaînes et les mobilités transversales et latérales sont fonction de la température et de la structure (nature de la tête polaire, longueur de chaîne, insaturations) des lipides présents. En phase *gel*, la mobilité des lipides est quasi nulle. Les chaînes des lipides sont majoritairement étirées, en conformation *trans* quasi complète. La phase *ld* comporte des conformères *gauche*, et une plus grande mobilité autant latérale (diffusion latérale de l'ordre du $\mu\text{m}^2/\text{s}$) que transversale.⁸⁵⁻⁸⁷ Par exemple, la diffusion dans une phase *ld* est plus rapide d'un ordre de grandeur que dans une phase *lo*, plus dense, à des températures de 40 °C et plus, pour des systèmes de cholestérol, sphingomyéline et 1,2 -dioléyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DOPC).⁸⁸⁻⁹⁰ La phase *lo* présente un degré d'organisation plus élevé des chaînes alkyles que la phase *ld*.^{91,92} L'éclatement quadripolaire maximal est de l'ordre de 50-60 kHz contre 30 kHz en phase *ld*.^{93,94} Mais la phase *lo* montre quand même une rotation rapide du lipide autour de son axe long, qui conduit à un spectre à symétrie axiale, et une diffusion latérale rapide, d'où le nom de liquide ordonné. La variation de S_{CD} le long de la chaîne acyle d'un lipide en phase *lo* présente un profil typique de la phase lamellaire, diminuant de la tête polaire jusqu'au méthyle.

1.3. Techniques d'analyse

1.3.1. Réflectance totale atténuée (ATR-IR)

La réflectance totale atténuée (ATR pour *attenuated total reflectance*) est une technique d'échantillonnage en spectroscopie infrarouge, où un rayon de lumière infrarouge, envoyé dans un cristal possédant un indice de réfraction (n) élevé, interagit avec les molécules à la surface du cristal. Les cristaux les plus utilisés sont constitués de diamant, de germanium (Ge) ou de séléniure de zinc (ZnSe). Le rayon est réfléchi une ou plusieurs fois dans le cristal, avant d'en ressortir du côté opposé et d'être capté par le détecteur. L'angle incident doit pour cela être supérieur à l'angle critique, qui est égal à l'arcsinus du rapport de l'indice de réfraction du cristal et de celui du milieu à la surface du cristal : l'échantillon, ou l'air si l'échantillon est considéré comme très mince. La Figure 3 illustre le principe de fonctionnement de cette technique. À

chaque réflexion, une onde évanescente est créée hors du cristal. Elle se propage sur une faible distance, entre 0,5 et 5 μm , selon la longueur d'onde : pour un composé organique ayant un indice de réfraction de 1,50 et pour un angle de 45° , la pénétration est de $\pm 0.5 \mu\text{m}$ à 4000 cm^{-1} et $\pm 5 \mu\text{m}$ à 400 cm^{-1} .⁹⁵ L'échantillon placé sur le cristal absorbe des radiations de certaines longueurs d'onde ; il y a donc atténuation de l'intensité du rayon infrarouge. Cette diminution de l'intensité de certaines longueurs d'onde mène au spectre d'absorption IR.

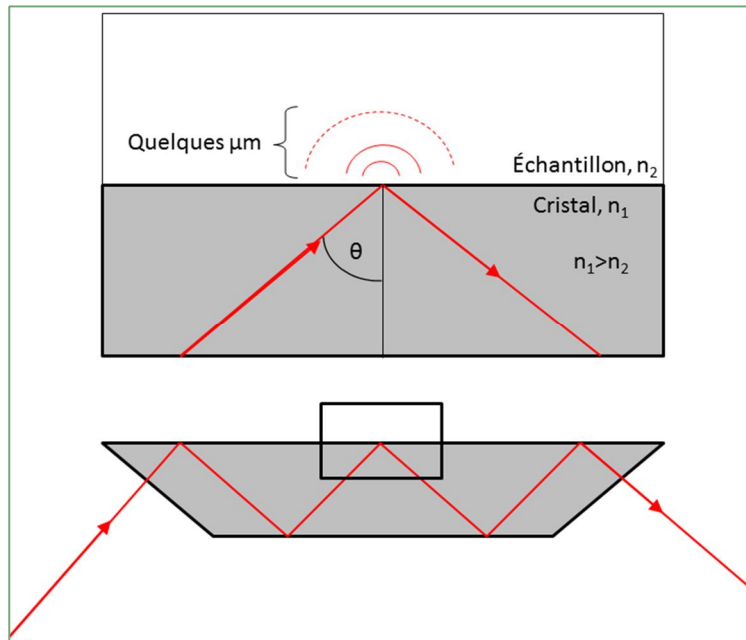


Figure 3 : Représentation schématique du principe de réflexion totale atténuée (ATR).

1.3.2. Spectroscopie infrarouge à force atomique (AFM-IR)

Comme discuté au point 1.2.1.3, un aspect important de la formulation micellaire de SN-38 est la distribution uniforme de SN-38 dans la population de micelles. Idéalement, chaque micelle devrait avoir la même charge médicamenteuse. Il est donc important de déterminer la charge médicamenteuse des micelles individuelles, et ce, à l'échelle spatiale la plus petite possible. C'est dans cette optique que nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge à l'échelle nanométrique. Cette technique allie le discernement chimique de la spectroscopie infrarouge à la résolution spatiale d'un AFM.

1.3.2.1. Principe

Cette technique date du début des années 2000 : les premières mesures de spectroscopie infrarouge à l'échelle nanométrique, rapportées par Anderson et al.⁹⁶ et Hammiche et al.^{97,98}, ont été réalisées en mesurant les fluctuations locales de température de l'échantillon lorsque celui-ci est illuminé par une source de rayonnement infrarouge.

L'appareil que nous avons utilisé, le Nano-IR2 de la compagnie Anasys Instruments fonctionne comme suit (Figure 4, image du haut) : on mesure la dilatation thermique verticale de l'échantillon lors de l'absorption de rayonnement infrarouge à une longueur d'onde spécifique via une pointe d'AFM en contact avec l'échantillon. Cette pointe oscille à une fréquence qui lui est propre. La dilatation thermique repousse la pointe AFM, perturbant cette oscillation. Dans la Figure 4, le graphique de gauche illustre le retour à l'oscillation normale de la pointe après la dilatation thermique, déclenchée par une pulsation du laser. Le graphique de droite de la Figure 4 est la transformée de Fourier de celui de gauche, où la fréquence d'oscillation de la pointe est représentée par le pic le plus important ; les suivants sont des harmoniques de cette fréquence. Il permet d'identifier la fenêtre de fréquences dans laquelle on enregistrera l'intensité du signal (celle du pic le plus important, la plupart du temps). L'absorption est donc mesurée par l'intensité de l'oscillation de la pointe AFM. Un spectre est directement tracé en suivant l'intensité de l'oscillation de la pointe en fonction de la longueur d'onde du laser.

Le diamètre du point illuminé est généralement bien plus grand (de l'ordre de la dizaine ou centaine de μm) que le sommet de la pointe d'AFM (20-30 nm). L'étendue de la diffusion thermique horizontale dépend de l'inverse de la racine carrée de la modulation de fréquence des pulsations du rayonnement IR, de l'épaisseur de l'échantillon et de sa diffusivité thermique ; c'est ce paramètre qui dicte la résolution latérale réelle. En conditions optimales, elle peut atteindre la dizaine de nm.⁹⁹ Plus la fréquence d'illumination du laser est grande, plus la dilatation mesurée par la pointe est due à l'absorption locale, et moins à la diffusion de chaleur, plus lente.⁹⁶⁻⁹⁸

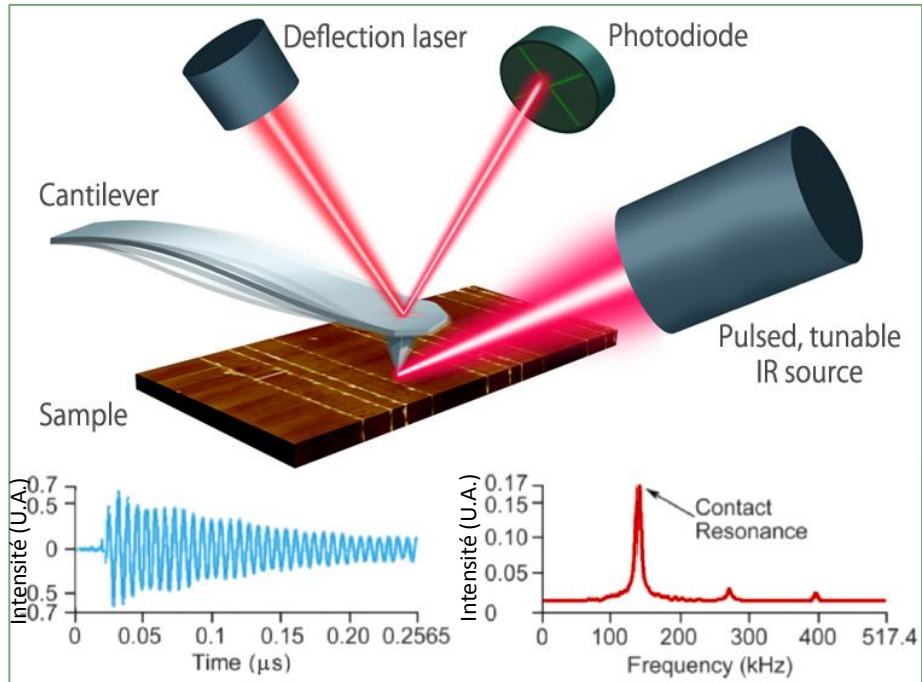


Figure 4 : Au-dessus, le schéma du fonctionnement d'un AFM-IR. À gauche, le retour à l'oscillation au repos de la pointe. À droite, la fréquence de résonance de la pointe. Téléchargé du site d'Anasys Instruments, « AFM-IR technology for nanoscale FTIR spectroscopy and imaging », <http://www.anasysinstruments.com/technology/afm-ir-technology/> (2016).

1.3.2.2. Limitations de l'AFM-IR

Comme pour un AFM standard, chaque image nécessite entre quelques dizaines de secondes et plusieurs minutes d'acquisition, sur une surface ne dépassant pas une taille de 10-20 μm . Plus la résolution spatiale voulue est grande, plus l'acquisition sera lente, et la dérive importante (petites imprécisions qui s'additionnent dans les mouvements du cristal piézoélectrique portant la pointe). L'échantillon idéal doit être stable pour une période suffisante pour prendre de multiples spectres, c'est-à-dire près d'une heure au moins.

Créer une image chimique à une seule longueur d'onde prend le même temps que pour une image topographique. Créer une image où chaque pixel contient un spectre requiert un temps atteignant facilement une heure ou (beaucoup) plus.

L'AFM-IR utilise le mode contact, la pointe se déplaçant sur l'échantillon au plus près de la surface. L'échantillon idéal doit être relativement lisse, afin d'éviter toute collision entre la pointe et l'échantillon lorsque la pointe se déplace. Il doit également avoir une épaisseur

supérieure à 50 nm, idéalement plus de 100 nm, mais moins d' 1 μm , afin, d'une part, d'avoir un signal suffisamment fort, mais aussi, d'autre part, pour que la dilatation thermique ait lieu majoritairement vers la pointe et le moins possible vers les profondeurs de l'échantillon.

La gamme infrarouge exploitable par cette technique est globalement limitée à l'IR moyen, entre 1000 et 4000 cm^{-1} , une gamme correspondant principalement aux vibrations des liaisons organiques. Vu que l'eau absorbe fortement dans cette gamme¹⁰⁰, autour de 1600 et 3400 cm^{-1} , et plus faiblement autour de 2100 cm^{-1} , l'échantillon doit être sec, donc pas d'AFM-IR en solution.

1.3.3. Résonance magnétique nucléaire du deutérium (^2H RMN)

La RMN du deutérium est un outil intéressant pour étudier des systèmes membranaires, car on peut distinguer le signal des différentes phases. Dans un solide, la RMN est sensible aux interactions dipolaires, quadripolaires et à l'anisotropie du déplacement chimique. Le noyau du deutérium ayant un spin de 1 ($I=1$), il y a des interactions quadripolaires. Celles-ci existent à cause de la distribution non uniforme des charges dans le noyau, et de l'interaction de ces charges avec un gradient de champ électrique extérieur.

Avec $I=1$, il y a trois orientations possibles du moment magnétique par rapport au champ magnétique externe, caractérisées par les nombres quantiques $m_r = -1, 0$ et 1 . Ces orientations correspondent à trois niveaux d'énergie caractéristiques de l'effet Zeeman. Selon la règle de sélection, les deux transitions d'un seul quantum permises correspondent à $\Delta m_r = -1$, donc entre niveaux d'énergie adjacents (voir Figure 5). À cause du couplage quadripolaire du deutérium, la différence d'énergie entre ces niveaux n'est pas identique, et donc les transitions entre eux non plus. On observe donc dans le spectre un doublet associé à ce couplage quadripolaire. $\Delta\nu_Q$ est l'éclatement quadripolaire entre les deux pics d'un doublet.

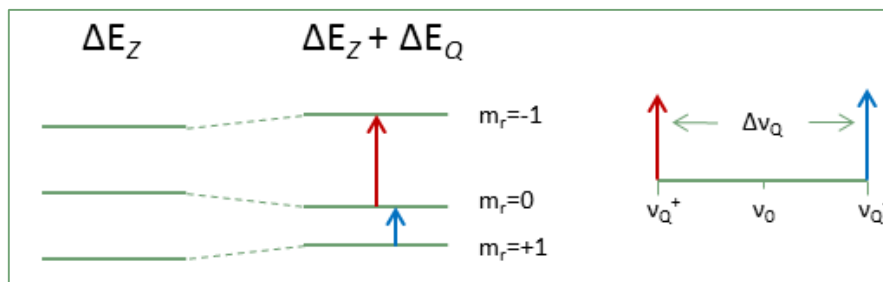


Figure 5 : ΔE_Z est la différence d'énergie Zeeman, et ΔE_Q la variation d'énergie des niveaux due à l'interaction quadripolaire. $\Delta \nu_Q$ est l'éclatement quadripolaire observée entre les pics.

L'équation (1) décrit la dépendance, pour un système à symétrie axiale, de $\Delta \nu_Q$ à l'angle ϕ , l'angle entre le gradient de champs électrique et le champ magnétique externe. A_Q est la constante quadripolaire statique ; elle a une valeur de 170 kHz pour les liaisons C-D aliphatiques¹⁰¹.

$$\Delta \nu = \frac{3}{2} A_Q \left(\frac{3 \cos^2 \phi - 1}{2} \right) \quad (1)$$

Dans un lien C-D, le gradient de champ électrique se trouve le long du lien, à cause de la différence d'électronégativité des atomes. Il est axialement symétrique. $\Delta \nu_Q$ dépend donc de l'orientation de ce lien par rapport au champ magnétique externe (voir Figure 6).

Dans une poudre, il y a orientation aléatoire des molécules et celle-ci définit alors le profil du spectre, qu'on appelle « spectre de poudre ». Dans une poudre, la proportion de liaisons orientées parallèlement au champ magnétique externe est faible, et augmente au fur et à mesure que ϕ avance vers 90° . La valeur de $\Delta \nu_Q$ est nulle pour une orientation de $54,7^\circ$ et maximale à 0° comme l'indique la Figure 6. Les différentes orientations donnent une série de doublets avec des $\Delta \nu_Q$ différents, et la superposition de ces signaux forme le « spectre de poudre ».

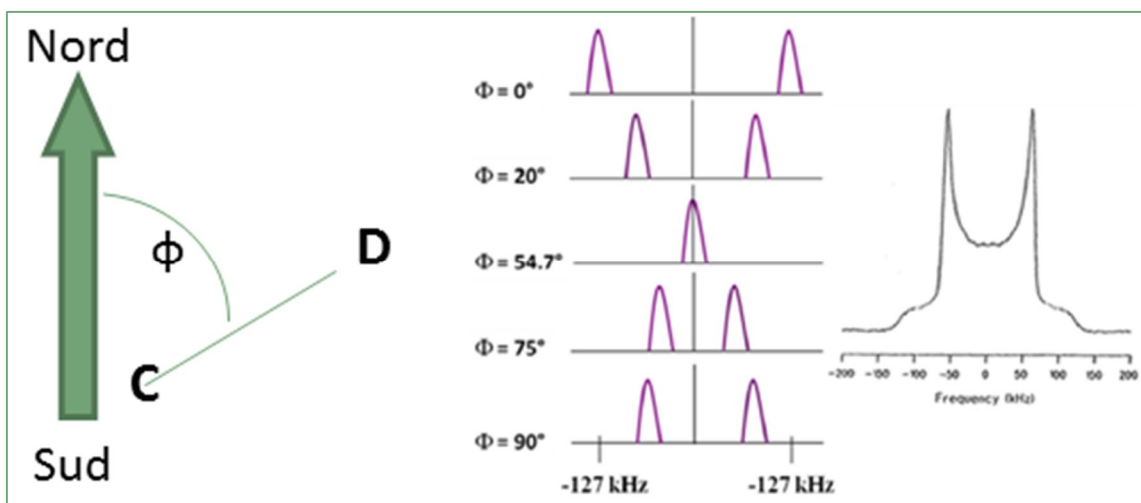


Figure 6 : Influence de l'orientation de la liaison C-D par rapport au champ magnétique sur les interactions quadripolaire et le spectre de poudre résultant de la superposition de différents doublets associés à différentes orientations.

Les interactions quadripolaires sont puissantes et mènent à des éclatements pouvant dépasser les 100 kHz.¹⁰² Le temps caractéristique associé à ces interactions est donc d'environ 10^{-5} s (1/100 kHz). Les mouvements rapides par rapport à ce temps réduisent les valeurs de $\Delta\nu_Q$, en moyennant les interactions quadripolaires. Dans une bicouche fluide, les molécules sont mobiles, et trois mouvements axialement symétriques entrent en jeu dans le laps de temps de l'expérience RMN. Ces trois mouvements sont : (1) la rotation autour de l'axe long de la molécule, (2) les fluctuations de l'axe long de la molécule entière par rapport à la normale de la bicouche et (3) l'isomérisation *trans-gauche* dans la chaîne alkyle.

$\Delta\nu_Q$ est alors exprimé par l'équation (2) :

$$\Delta\nu = \frac{3}{2} A_Q \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right) \left(\frac{3\cos^2\gamma - 1}{2} \right) \left(\frac{3\cos^2\alpha - 1}{2} \right) = \frac{3}{2} A_Q \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right) S_{mol} S_{C-D} \quad (2)$$

Ici, θ est l'angle entre la normale de la bicouche et le champ magnétique externe, γ l'angle entre l'axe long de la molécule et la normale de la bouche, et α l'angle entre C-D et l'axe long de la molécule. Les mouvements (1) et (2) sont des mouvements moléculaires et sont représentés par S_{mol} , le paramètre d'ordre moléculaire, tandis que (3) est un mouvement intramoléculaire et est représenté par S_{C-D} , le paramètre d'ordre orientationnel.

La Figure 7 présente les profils de spectres de bicouches lipidiques, pour plusieurs phases. En a, la phase solide présente un très large spectre, parce que les chaînes sont

immobiles. Plus les chaînes alkyles gagnent en liberté de mouvement, plus le $\Delta\nu_Q$ maximal diminue. Le signal central correspond aux méthyles terminaux (sauf pour d), pour lesquels la rotation rapide autour du lien (CH₂)-(CH₃) permet, même à l'état solide, de moyenniser les interactions quadripolaires. En phase lamellaire gel, les chaînes ont plus de liberté de rotation autour de l'axe long de la molécule qu'en phase solide, le spectre est donc plus étroit.

Les différents éclatements quadripolaires observés sur les spectres de bicouches en phase fluide sont représentatifs du gradient d'ordre existant le long de la chaîne. L'ordre des méthylènes près des têtes polaires est plus important, et l'éclatement qui leur est associé est donc plus grand. Vers les bouts de chaîne, les méthylènes sont plus mobiles, et leur éclatement est plus faible. Le gradient d'ordre, depuis la tête polaire jusqu'au cœur de la bicouche, peut être étudié via le spectre RMN du deutérium pour une chaîne perdeutérée.

La mesure des éclatements quadripolaires est difficile ; comme chaque méthylène mène à un spectre de poudre, l'information quant à l'orientation de la molécule (à l'origine du spectre de poudre) et celle quant à sa dynamique (décrivant le gradient d'ordre) se superposent. Le « depakeing » est une procédure de déconvolution permettant d'extraire un spectre RMN d'un système orienté depuis le spectre de poudre. Ceci est possible puisque la forme du spectre de poudre est connue, elle s'exprime par $\frac{3}{2}(\cos^2\theta - 1)$, où θ est l'angle entre le champ magnétique externe et l'axe de symétrie (voir Figure 6).^{103,104} Il est possible à partir de ce spectre déconvolué de déterminer la distribution des éclatements et donc le gradient d'ordre de la bicouche.

Les éclatements quadripolaires d'une chaîne alkyle perdeutérée représentent la structure et la dynamique de cette chaîne et, par extension, peuvent nous renseigner sur les contraintes exercées par le milieu sur cette chaîne. Dans nos travaux, l'acide palmitique perdeuté (PA₃₁), est utilisé de cette manière, pour étudier la phase et l'ordre des bicouches de notre système SC/azo.

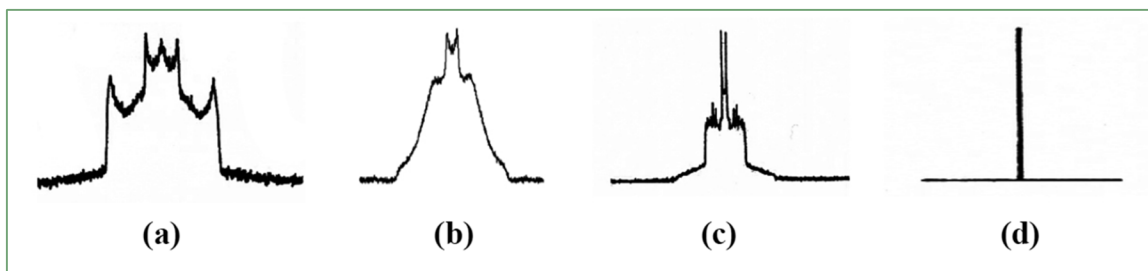


Figure 7 : Spectre RMN du ^2H de molécules amphiphiles avec une chaîne deutérée en phase solide (a), en bicouche en phase *gel* (b), *fluide* (c) et en phase isotrope (d).

1.4. Description des travaux

Dans ce travail, nous nous intéressons dans un premier temps à l'homogénéité de la distribution d'un médicament dans une population de micelles composées de copolymères bloc. Pour ce faire, nous tentons d'isoler une micelle, d'abord, puis d'étudier un tapis de micelles. Au moyen d'analyses ATR-IR et AFM-IR, nous tentons d'identifier des nombres d'onde caractéristiques du médicament et du copolymère. Ces nombres d'onde nous permettent d'évaluer la teneur en médicament à un endroit précis par AFM-IR, et par là, d'étudier la distribution du médicament dans le matériel.

Dans un second temps, nous nous penchons sur la libération d'une charge fluorescente par un liposome photosensible composé de sulfate de cholestérol et d'un dérivé d'azobenzène monoalkylé – c'est le composé photosensible. Dans cette étude, nous tentons d'identifier le mécanisme par lequel l'isomérisation du dérivé d'azobenzène influe sur la perméabilité de la bicouche lipidique. Pour ce faire, nous plaçons ce dérivé d'azobenzène dans des bicouches de rigidité différente, et étudions la cinétique d'isomérisation et de libération d'une sonde fluorescente. Puis des analyses de RMN du solide du deutérium sont discutées, où du palmitate perdeutééré vient remplacer une partie du dérivé d'azobenzène dans la bicouche. L'effet de l'isomérisation de la fonction azobenzène sur l'ordre de la bicouche y est étudié.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel

Le copolymère utilisé pour la section 3.1 est composé de trois blocs : PEG (45 unités), PMMA (53 unités) et PnBMA (24 unités) ; voir Figure 8. Les blocs PnBMA forment le cœur intérieur des micelles, les blocs PMMA le cœur extérieur et les blocs PEG la couronne des micelles. Le copolymère et sa formulation avec SN-38 - 10 (p/p) % nous ont été fournis, sous forme de poudres lyophilisées, par Altus. La compagnie nous a aussi donné du SN-38 pur.

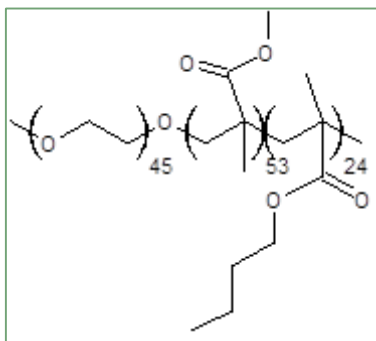


Figure 8 : Composition du polymère tribloc PEG – méthacrylate.
De gauche à droite : EG, MMA, nBMA.

Pour les sections 3.2 et 3.3, le SC, la DPPC, la 1,2 -dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphosérine (DPPS) et la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (POPC) ont été obtenus d'Avanti Polar Lipids (AL, USA). L'acide palmitique (PA, > 99 %), l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA, 99%), l'eau appauvrie en deutérium (> 99 %), et le Triton X-100 (99 %) ont été obtenus de Sigma Chemical Co. (MO, USA). L'acide palmitique perdeutééré (PA31, 99.3 %) a été obtenu de CDN Isotopes (QC, Canada). Le chlorure de sodium (> 99 %) a été obtenu d'Amresco (OH, USA). Le méthanol (spectrograde) et le benzène (haute pureté) ont été obtenus d'American Chemicals Ltd. (QC, Canada) et BDH Inc. (ON, Canada). Le tris-hydroxyméthylaminométhane a été obtenu d'Anachemia (QC, Canada). La sulforhodamine B (SRB) a été obtenue d'Invitrogen (MA, USA). La poudre de Sephadex G50 Fine a été obtenue de Pharmacia Biotech (Suède). L'azo a été synthétisé par Qian Zhang (étudiant au doctorat à l'Université de Montréal), selon le protocole publié auparavant.⁷²

2.2.Méthodes utilisées pour les études de micelles polymères

2.2.1. Expérience en ATR-IR

Un spectromètre FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific) muni d'un module ATR avec un cristal de diamant a été utilisé. Afin d'identifier les bandes IR qui nous permettraient de distinguer la présence du SN-38 dans l'échantillon, les poudres de micelles vides, de micelles chargées de SN-38 (10 (p/p)%) et de SN-38 pur ont été analysées sans autre préparation. De plus, un mélange micelles copolymères - SN-38 à 20 (p/p) % a été préparé par mélange au mortier à partir de poudre de micelles vides et de SN-38 pur. Les spectres des Figure 9 et Figure 10 sont les résultats de 64 balayages, avec une résolution de 1 cm^{-1} pour les spectres de micelles vides et celles de SN-38 10 (p/p) %, et 4 cm^{-1} pour celui du SN-38 pur et celui du mélange contenant 20 % de SN-38.

2.2.2. Expérience en AFM

Afin d'explorer différentes méthodes de préparation d'échantillons pour l'analyse par nanospectroscopie IR, l'AFM a été utilisée. L'appareil utilisé est un AFM FastScan de Bruker. Les balayages ont été faits en mode contact, avec une vitesse autour de 1 Hz. Les pointes NIR2 (Modèle : PR-EX-NIR2, Anasys Instruments, Inc., Santa Barbara, CA) ont été utilisées pour recueillir des images topographiques. Les différents échantillons ont été préparés sur des surfaces de verre, de mica et de CaF_2 .

Lors de la préparation d'échantillons, la poudre de micelles chargées en SN-38 a été suspendue dans une solution d'eau milliQ mise à pH 6.5 avec des solutions concentrées de NaOH et HCl. Les résultats des analyses DLS (Zetasizer Nanoseries, de Malvern Instruments) ont indiqué un diamètre hydrodynamique d'environ 150 nm. Ensuite, deux méthodes ont été utilisées pour préparer les échantillons AFM. Le moulage par goutte, ou drop casting (DC), est réalisé par le dépôt d'une goutte de la suspension de micelles sur la surface désirée, et le tout est couvert par un verre de montre pendant que l'eau s'évapore. Cette méthode est très simple et écologique. L'autre méthode utilisée, plus longue, est la lyophilisation d'une goutte de suspension, déposée sur une surface. Pour ce faire, la goutte est déposée sur la surface et le tout est plongé dans l'azote liquide. Le montage avec l'échantillon gelé est rapidement placé sous vide pour lyophiliser l'eau.

2.2.3. Expérience en Spectroscopie nanoIR

L'appareil utilisé est le NanoIR2 d'Anasys Instruments. Le moulage par goutte sur un cristal de CaF₂ a été utilisé pour la totalité des images de nanoIR et d'AFM présentées ici. Ces images AFM ont été prises en mode contact. Les spectres IR ont été mesurés avec 20 % de la puissance du laser, sans filtre. Le nombre de balayages a été fixé à 512 et la résolution spectrale à 2 cm⁻¹. La résolution latérale est estimée à quelques dizaines de nm.

2.3. Méthodes utilisées pour les études de stérosomes photosensibles

2.3.1. Préparation des LUV

Dans un mélange 3/1 (v/v) de benzène et méthanol, les lipides et l'azo ont été dissous, et la solution homogénéisée. La solution a été plongée dans de l'azote liquide et immédiatement placée sous vide pendant 16 à 24 heures pour éliminer les solvants. Pour les expériences d'absorption UV-vis et de DLS, une dispersion de liposomes a été préparée en hydratant le mélange de lipides dans un tampon Tris (50 mM) contenant NaCl (140 mM) et EDTA (0.5 mM), ajusté à pH 7.4 avec quelques gouttes d'une solution d'HCl concentré. La dispersion a ensuite été plongée dans de l'azote liquide pendant 20 secondes puis dans un bain à 25 °C (ou 58 °C pour la DPPC) pendant 10 minutes. Cette étape a été répétée cinq fois. Puis, elle a été extrudée dix fois à travers deux filtres de polycarbonate dont le diamètre des pores est de 100 nm, en utilisant un extrudeur manuel Lipofast (Avestin Corp. ON, Canada) à la température de la pièce, ou un extrudeur utilisant de l'air comprimé (Lipex Biomembranes Inc., BC, Canada) thermostaté à 58 °C pour la DPPC. La concentration en lipides a été ajustée à ~ 50 µM pour les systèmes DPPC/azo, POPC/azo et SC/azo, et ~20 µM pour le système SC/PA/azo. La taille des LUV a été mesurée par DLS (Malvern Zetasizer, Royaume Uni).

2.2.1. Expérience en spectrofluorométrie

L'isomérisation de l'azo dans les différentes formulations a été induite par illumination de l'échantillon par une lampe au xénon (75 W) d'un spectrofluorimètre (QuantaMaster, Photon Technology International Inc., Canada), avec une largeur de fente de 10 mm. Les échantillons ont été maintenus sous agitation constante à 20 °C pendant l'illumination. Les mesures d'absorption UV-Vis ont été effectuées avec un spectromètre UV-Vis-NIR (Cary Series, Agilent Technologies, États-Unis). La conversion trans-cis a été induite par une lumière de longueur d'onde 350 nm, une longueur d'onde pour laquelle l'isomère trans a un grand coefficient d'absorptivité molaire, contrairement à l'isomère cis. Pour la conversion cis-trans, une longueur

d'onde de 450 nm est utilisée, car l'isomère cis présente un coefficient d'absorptivité molaire plus élevé que l'isomère trans.

Le taux d'isomère trans a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{-trans (t)} = 100 * \frac{[Abs_f - Abs(t)]}{[Abs_f - Abs_i]} \quad (3)$$

Abs_i est l'absorbance à $t=0$, que l'on considère comme l'absorbance de la forme trans pure (la suspension est illuminée à 450 nm pendant 5 minutes auparavant). $Abs(t)$ est l'absorbance au temps t . Abs_f est la valeur de l'absorbance à la fin de la conversion, lorsque l'absorbance est stable et que l'on considère comme l'absorbance de la forme cis pure. Toutes ces valeurs d'absorbance se rapportent à 350 nm. Les 100 % d'isomères cis sont obtenus à partir des spectres d'absorption de stérosomes illuminés 5 minutes à 350 nm, c'est-à-dire jusqu'à ce que l'absorbance à 350 nm soit stable. La cinétique d'isomérisation est approximée par une exponentielle, présentée à l'équation suivante :

$$\% \text{-trans (t)} = 100 * e^{-t/\tau} \quad (4)$$

t est la durée d'illumination à 350 nm, et τ est la constante de temps de décroissance.

Pour les expériences de perméation, la SRB, une sonde fluorescente, a été ajoutée au tampon d'hydratation dont les composés et concentrations sont : Tris (50 mM), EDTA (0.5 mM), NaCl (70 mM) et SRB (50 mM); ce tampon est appelé « tampon interne ». Celui-ci est isoosmotique avec le « tampon externe » qui lui contient Tris (50 mM), NaCl (140 mM) et EDTA (0.5 mM). L'ajustement du pH 7.4 se fit avec quelques gouttes d'HCl. À 50 mM, la fluorescence de la SRB est en très grande partie auto-désactivée.¹⁰⁵ Les liposomes ont été préparés dans le tampon interne. Après l'extrusion des liposomes, la SRB non encapsulée a été séparée des liposomes chargés en SRB par chromatographie d'exclusion de taille dans une colonne (25 x 1.5 cm, température de la pièce) de Sephadex G50 Fine. La phase mobile est le tampon externe.

Les mesures de fluorescence ont été effectuées sur un spectrofluorimètre (QuantaMaster, Photon Technology International Inc.). La concentration en lipides a été ajustée à $\sim 70 \mu\text{M}$. Le monochromateur d'excitation est réglé à 567 nm, avec une bande passante de 1.5 nm, et le monochromateur d'émission a été réglé à 583 nm, avec une bande passante de 2 nm. Le pourcentage de SRB libérée est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ libéré} = 100 * \left(1 - \left[\frac{(I_T - I_F)/I_T}{(I_{T0} - I_{b0})/I_{T0}} \right] \right) \quad (5)$$

Dans cette équation, I_{b0} est l'intensité de fluorescence des liposomes chargés de SRB mesurée immédiatement après la dilution qui a suivi l'étape de chromatographie (on pose l'hypothèse que la fluorescence venant de SRB libre est nulle), et I_{T0} est l'intensité cet aliquot après avoir ajouté du Triton X-100 (~0.05 vol % dans la cuvette). L'ajout du Triton libère toute la SRB, et l'intensité résultante est utilisée pour normaliser les courbes de libérations. I_F et I_T sont les intensités de fluorescence après un temps d'illumination t , respectivement, avant et après l'ajout de Triton. La fluorescence de la SRB libre n'est pas différenciable de la SRB encapsulée par cette méthode, d'où l'importance de l'étape de chromatographie. Tous les échantillons ont été conservés à température du laboratoire et à l'abri de la lumière en dehors des périodes d'illumination.

2.2.2. Préparation des échantillons pour la ^2H RMN

Deux séries de stérosomes ont été préparées, avec des proportions molaires de SC, azo et PA de 6/1/1. Du PA hydrogéné a été utilisé pour les tests de photolibération et du PA₃₁ pour les analyses de RMN. La quantité de PA₃₁ nécessaire pour avoir un bon rapport signal/bruit (entre 2.5 et 5 mg) a déterminé les quantités de SC et d'azo utilisées. Ces composés ont été dissous dans un mélange de benzène et méthanol 3/1 (vol/vol), puis lyophilisés pendant 16 à 24 heures. La poudre résultante a été hydratée dans du tampon interne à une concentration de lipides d'environ 50 μM , pour les expériences de photolibération, et dans du tampon externe préparé avec de l'eau appauvrie en deutérium pour les analyses de RMN, à une concentration d'environ 75 mM. Ce tampon appauvri en deutérium a été préparé en lyophilisant une aliquote du tampon préparé dans l'eau Milli-Q pendant 16 à 24 heures, puis en réhydratant la poudre résultante avec un volume équivalent d'eau légère.

2.2.3. Expérience en ^2H RMN

Pour les mesures RMN, la formation complète de l'isomère cis (trans) a été effectuée par illumination à 350 (450) nm, et contrôlée par spectroscopie électronique : un aliquote a été prélevé de la suspension à intervalles réguliers, dilué dans du tampon externe, et l'absorbance à 350 nm de cette aliquote a été mesurée. L'illumination s'est faite jusqu'à atteindre une valeur d'absorbance constante : minimale pour l'isomère cis, maximale pour l'isomère trans.

La suspension lipidique a été transférée dans un porte-échantillon en téflon fabriqué par l'atelier de mécanique du département de chimie de l'Université de Montréal. Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre AV-400 de Bruker. Nous avons utilisé une sonde statique équipée d'une bobine de 10 mm de diamètre. Les spectres ont été enregistrés avec une séquence d'impulsions conduisant à un écho quadripolaire, avec l'impulsion à 90 ° de 6 μ s et un délai entre les impulsions de 40 μ s. Le délai de relaxation était de 0.5 s. La température était contrôlée à 25 °C en utilisant le contrôleur Bruker VT-3000. La raie fine correspondant à la phase isotrope a été choisie comme référence à 0 Hz. Pour les spectres de dispersions de stérosomes dont l'azo était sous forme trans - dont on s'assure en mesurant l'absorbance à 350 nm, et en vérifiant qu'une illumination à 450 nm d'une aliquote de la dispersion n'a pas changé pas cette valeur -, 160 000 acquisitions ont été moyennées ; pour le suivi de la relaxation cis-trans, les spectres correspondent à 40 000 acquisitions, soit une durée d'acquisition de 5.6 heures. Pour les spectres de dispersions de stérosomes dont l'azo est sous forme cis, l'échantillon a été illuminé à 350 nm pendant 90 minutes, puis un spectre de 160 000 acquisitions a été mesuré. Pour la cinétique d'isomérisation par la RMN, la proportion d'azo-cis a été calculée selon l'équation (3), avec les différences suivantes : c'est la proportion d'azo-cis qui est calculée, et l'absorbance y est remplacée par l'éclatement quadripolaire : ΔQ_f est la valeur de l'éclatement quadripolaire (Δv_Q) du méthyle du PA₃₁ en présence d'azo-trans seulement. ΔQ_i est la valeur de Δv_Q à $t=0$ (spectre mesuré pendant les 3 premières heures de relaxation), que l'on considère comme le Δv_Q de la forme cis pure. $\Delta Q(t)$ est la valeur de Δv_Q au temps t . La cinétique de relaxation peut ensuite être traitée par régression exponentielle de la même manière que pour l'équation (4) avec les différences suivantes : c'est la proportion d'azo-cis qui est calculée, et t est le temps de relaxation.

Les profils d'ordre sont obtenus à partir des spectres depakés. Les spectres de poudre sont lissés au préalable (Savitsky Golay, 10 points, 3^e ordre). Les profils sont obtenus selon la méthode décrite par Lafleur et al. (1989), assumant une décroissance monotone de l'ordre le long de la chaîne, de la tête polaire vers les méthyles terminal.¹⁰⁴ Le paramètre d'ordre du méthyle est mesuré directement sur le spectre depaké car il est toujours bien résolu.

3. Résultats et discussions

3.1. Distribution d'un médicament dans des micelles polymères individuelles

Dans cette section, nous présentons les résultats des analyses d'ATR-IR et AFM-IR, où nous tentons d'identifier des nombres d'onde caractéristiques du médicament et du copolymère. Ces nombres d'onde nous permettent d'évaluer la teneur en médicament à un endroit précis, et par là, d'étudier la distribution du médicament dans le matériel.

3.1.1. ATR-IR

La première étape est d'identifier les longueurs d'onde qui nous permettront de détecter la présence du polymère et du médicament, et de mesurer les proportions de chacun. Le spectre du polymère est dominé par un pic à 1724 cm^{-1} , attribué à l'élongation C=O des groupements méthacryliques.^{106,107} Parmi les éléments du spectre du SN-38 minimisant les interférences avec les bandes du polymère, on retrouve une bande double autour de $1640\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ (bande Amide I/élongation C=N) et l'épaule à $\sim 1510\text{ cm}^{-1}$ (élongation C=C aromatique).¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Ces deux bandes sont d'intensité égale dans le spectre du SN-38, et la différence d'intensité de ces deux bandes entre les spectres de micelles pleines (10 % de SN-38) et le spectre du mélange 20 % de SN-38 (Figure 10) est similaire.

Il est alors proposé que la variation du rapport d'intensités $I(1510\text{ cm}^{-1})/I(1724\text{ cm}^{-1})$ soit un descriptif du contenu en SN-38 de polymère. À partir des spectres ATR, nous évaluons que le spectre IR permet d'identifier une variation d'environ 5 % du contenu en drogue.

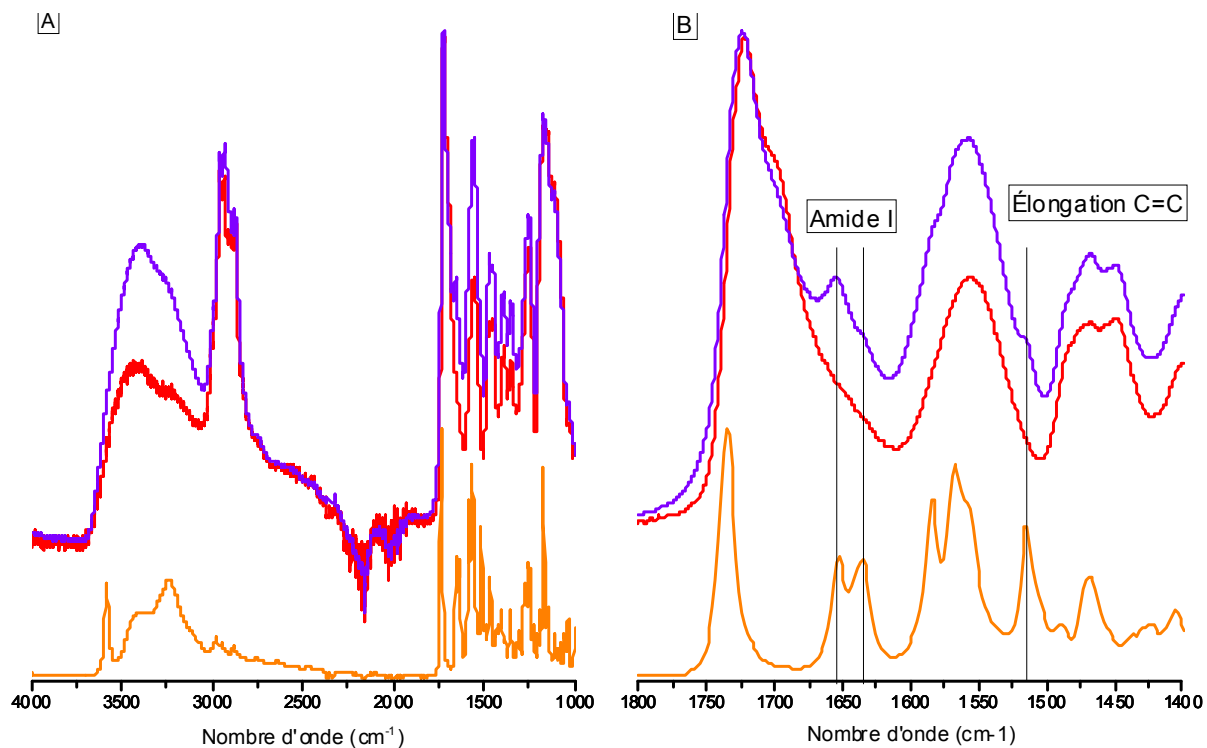


Figure 9 : A : Spectres ATR-IR de poudres de micelles polymères (rouge), de micelles chargées en SN-38 (10 (p/p)%) (violet) et de SN-38 pur (orange). B : Zoom sur la région d'intérêt. Les spectres sont décalés en y pour rendre la comparaison plus aisée.

3.1.2. Lyophilisation

La lyophilisation d'une goutte de suspension de micelles polymères dans de l'eau milliQ (0.01-0.1 (p/p)%) déposée sur du verre ou du mica permet l'observation, par AFM, de plusieurs micelles qui semblent isolées et dont l'épaisseur est autour de la trentaine de nm (Figure 11). Malheureusement, la quantité de matière correspondant à une micelle isolée est insuffisante pour obtenir par nanospectroscopie un spectre IR avec un rapport signal sur bruit raisonnable.

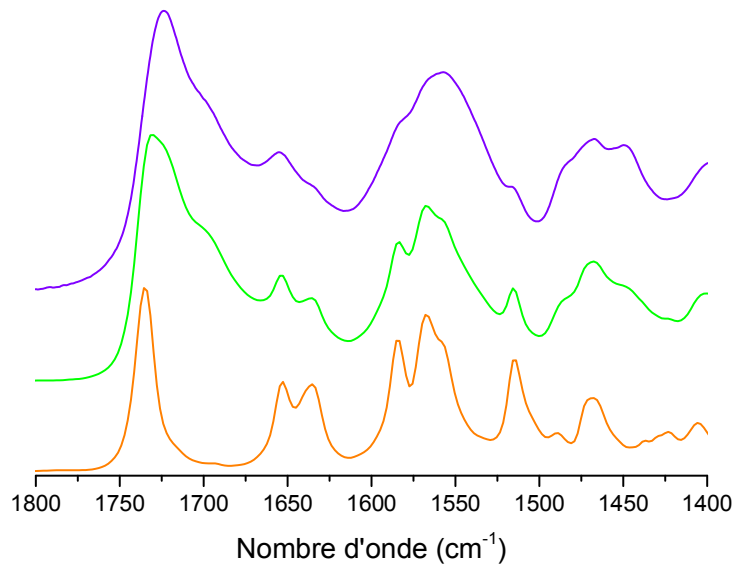


Figure 10 : Spectres ATR-IR (de haut en bas) de micelles chargées en SN-38 (10 (p/p)%), d'un mélange mécanique de micelles vides et SN-38 (20 (p/p)% et du SN-38.

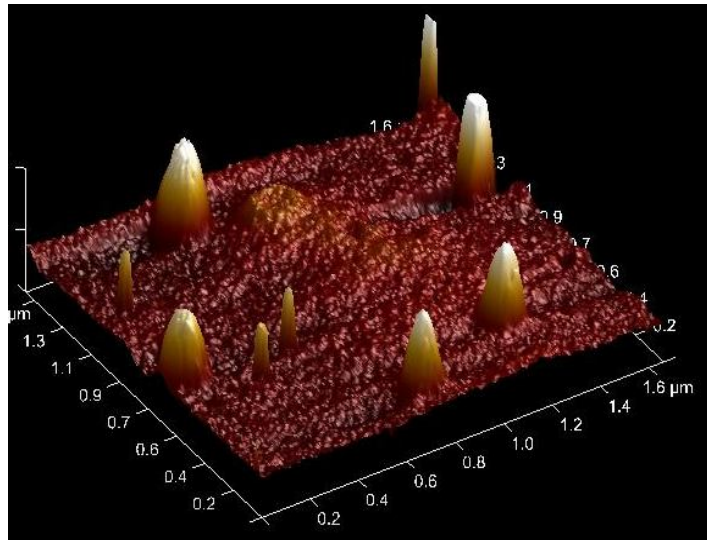


Figure 11 : Image AFM de micelles lyophilisées sur du mica. 1,6 μm x 1,6 μm . Échelle verticale : 40 nm.

3.1.3. Moulage par goutte

La préparation d'échantillons par moulage par goutte a été examinée à partir d'une suspension de micelles de SN-38 (0.5 (p/p)% de micelles dans l'eau) sur du verre. Cette approche donne un tapis de matière sur lequel on retrouve de petits amas souvent sphériques de 200 à 700 nm de diamètre (Figure 12). Il existe des amas de forme irrégulière plus gros, de

taille d'environ 1 à 3 μm . Mais ils sont rares : douze amas sur 6000 μm^2 balayés. Cette méthode de préparation d'échantillon ne conduit pas à l'observation de micelles isolées. Cependant, elle permet d'obtenir des spectres en nanoIR.

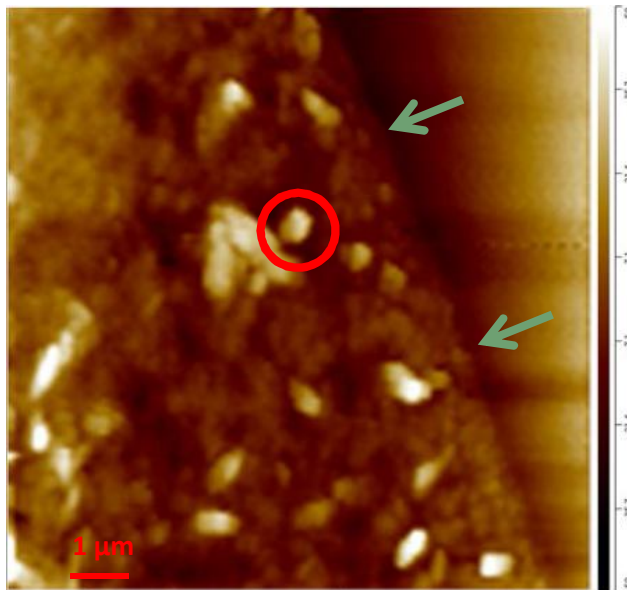


Figure 12 : Image AFM (10 μm x 10 μm , échelle en z : 100 nm, en mode contact) d'un échantillon obtenu par moulage par goutte d'une suspension de micelles polymères avec SN-38 (0.5 (p/p)% de micelles dans l'eau) sur du verre. Les flèches indiquent le bord de la goutte. Le cercle indique un amas de \pm 500 nm.

3.1.4. Spectroscopie nanoIR

Le premier obstacle rencontré fut la contribution de l'eau résiduelle du tapis de matière dans le spectre : la Figure 13 présente une région d'un spectre obtenu à partir d'un petit amas par nanospectroscopie IR. Les traces d'eau dans l'échantillon conduisent à des pics fins dans le spectre. Ce signal de fond gênant est éliminé sans altérer significativement l'allure du spectre par un lissage du spectre (filtre par transformée de Fourier sur deux points).

Ensuite, nous avons comparé les spectres des poudres de micelles obtenus par ATR et les spectres obtenus par nanoIR sur les tapis de micelles du moulage par goutte (Figure 14). On retrouve une bonne correspondance entre les spectres. La présence de SN-38 est principalement notable par l'intensité plus élevée du massif autour de 1550 cm^{-1} et par les épaulements à $1640\text{-}1650$ et 1510 cm^{-1} . L'intensité de ces bandes semble toutefois plus faible dans les spectres nanoIR que dans celui obtenu par ATR.

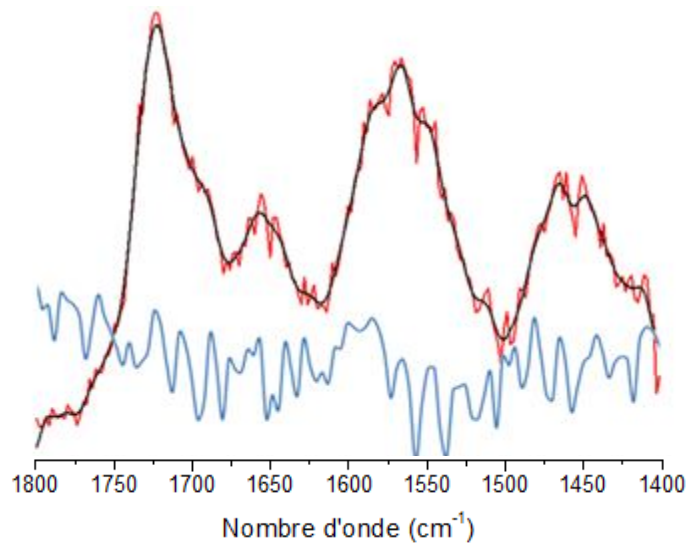


Figure 13 : Spectre obtenu par nanoIR sur un des amas produits par le moulage par goutte : brut (rouge) et lissé (noir). Le patron de la contribution de l'eau, fourni par le fabricant du Nano-IR, est reproduit (bleu).

Afin de vérifier l'homogénéité de la distribution du SN-38 dans l'échantillon, nous avons effectué la cartographie chimique d'une région du film à 1724 cm^{-1} , qui marque principalement la présence du polymère, et 1510 cm^{-1} , un épaulement associé au médicament. Le rapport de ces intensités a été utilisé pour identifier les endroits du film susceptibles de présenter les plus grandes variations de contenu en SN-38 dans la matrice polymère.

La Figure 15 présente les images chimiques acquises au même endroit, sur une surface mesurant $5\text{ }\mu\text{m} \times 5\text{ }\mu\text{m}$, correspondant à $128\text{ pixels} \times 128\text{ pixels}$ pour les images chimiques. Les cartes obtenues à 1510 cm^{-1} et à 1724 cm^{-1} et celle des ratios d'intensités $1510/1724$ sont comparées à l'image AFM topographique (mode contact). Nous avons identifié les deux points des rapports d'intensités extrêmes sur la carte, ceux qui devraient correspondre à l'endroit le plus riche et celui le plus pauvre en SN-38.

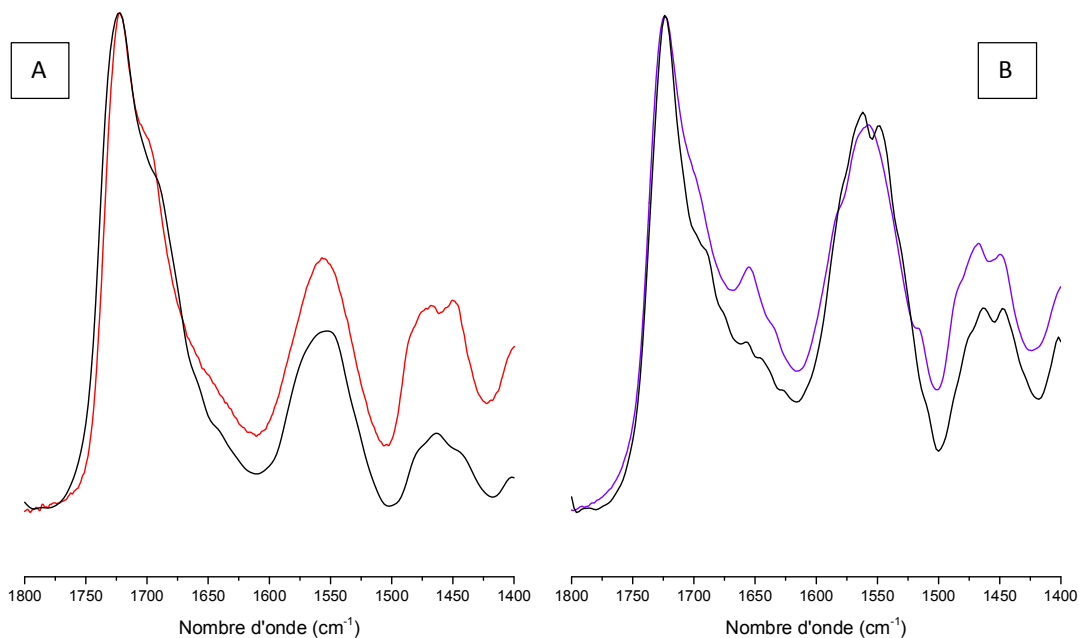


Figure 14 : A : Spectres de micelles polymères, obtenus par nanoIR (en noir) et par ATR (en rouge). B : Spectres de micelles polymères chargées en SN-38, obtenus par nanoIR (en noir) et par ATR (en violet). Le spectre obtenu par nanoIR est la moyenne de 24 spectres mesurés sur un même échantillon à différents endroits. Les spectres ont été normalisés à partir de la bande à 1724 cm^{-1} pour rendre la comparaison aisée.

Pour cela, les pixels ayant les valeurs les plus basses et les plus hautes – les 5 % les plus élevés et les plus bas de l'intervalle de valeurs existantes - ont été identifiés. Les régions avec au moins 6 pixels adjacents ayant les valeurs extrêmes de rapport 1510/1724 ont été choisies. Nous nous sommes assurés qu'il y avait suffisamment de signal pour au moins un des deux nombres d'onde, pour éviter de sélectionner un trou dans le film, un endroit où le rapport peut prendre des valeurs extrêmes. De plus, ces deux sites correspondaient à des endroits où une quantité appréciable de matériel était présente sur la base des images AFM. Les deux points sont identifiés sur les différentes cartes.

Les spectres nanoIR enregistrés à ces endroits, sur le pixel central des deux zones, sont présentés à la Figure 16. Les deux spectres sont très semblables avec le massif autour de 1550 cm^{-1} très intense, et les épaulements à 1640-1650 et 1510 cm^{-1} . Cette approche nous amène à conclure que cette partie de l'échantillon est homogène. Il n'a pas été possible de comparer directement les ratios des images et ceux des spectres, car les valeurs rendues par le

logiciel du spectromètre nanoIR pour une image chimique sont des valeurs normalisées par rapport aux valeurs extrêmes des pixels de l'image.

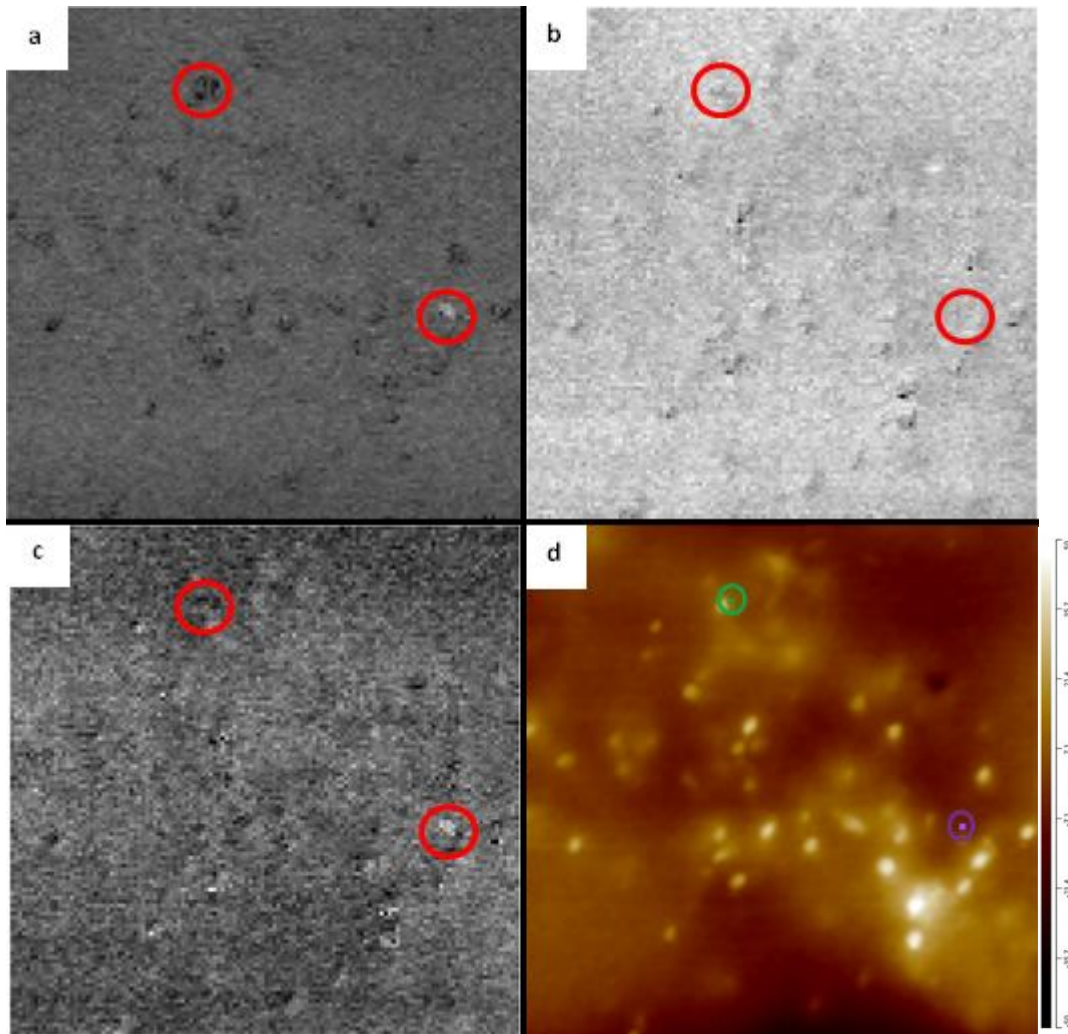


Figure 15 : a) Image chimique à partir de l'intensité à 1510 cm^{-1} ; b) Image chimique à partir de l'intensité à 1724 cm^{-1} ; c) Image obtenue à partir des rapports d'intensités $I(1510)/I(1724)$; d) Image AFM topologique (512 pixels x 512 pixels, échelle verticale : 50 nm). Chaque image mesure $5\text{ }\mu\text{m}$ de côté, et un pixel des images chimiques = $39 \times 39\text{ nm}^2$. Les zones d'intérêt sont difficiles à observer, car l'échantillon est très homogène.

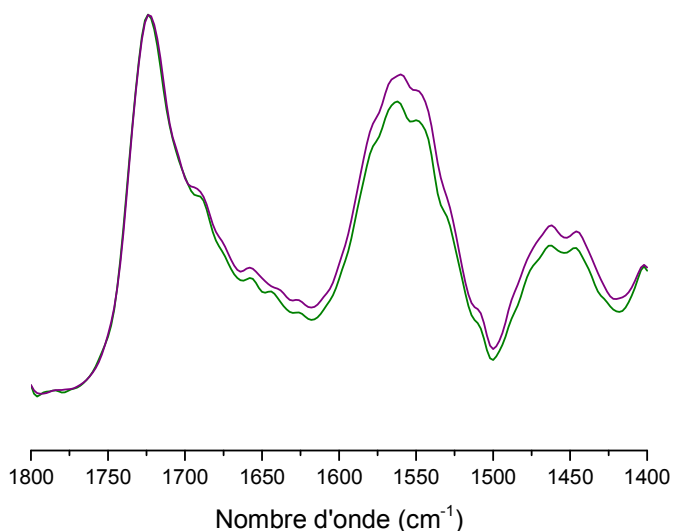


Figure 16 : Spectres nanoIR des points extrêmes identifiés à partir de la carte des rapports d'intensités $I(1510\text{ cm}^{-1})/I(1724\text{ cm}^{-1})$.

Ensuite, nous avons exploré une série d'échantillons, en obtenant d'abord la morphologie de l'échantillon par AFM pour pouvoir identifier et enregistrer les spectres nanoIR sur des amas et sur le tapis des films. Une surface d'environ $6000\text{ }\mu\text{m}^2$ a été balayée sur quatre échantillons distincts. Dix spectres nanoIR ont été enregistrés sur des amas de taille de 1 à 3 μm et vingt-et-un spectres sur le tapis. Tous les spectres enregistrés à partir du tapis montrent un profil similaire à ceux présentés précédemment (ex. Figure 14B et Figure 16) et correspondent alors au copolymère avec environ 10 % de SN-38.

Il y a par contre une certaine variabilité quant aux spectres enregistrés sur les amas. Cinq spectres présentent un profil identique à celui obtenu sur le tapis. Cependant, cinq spectres (pris sur trois amas de trois échantillons différents) semblent montrer des quantités plus importantes de SN-38. Par exemple, la Figure 17 présente l'image AFM d'une zone différente de celle étudiée à la Figure 15, mais venant du même échantillon. On y voit le tapis de matière comme toile de fond et des petits amas. Les spectres nanoIR ont été enregistrés sur cinq amas parmi les plus hauts ; la couleur du spectre indique l'endroit de l'enregistrement à partir de l'image AFM. La Figure 18 présente l'image AFM d'un des amas de la Figure 17, ainsi que quatre spectres mesurés sur et autour de l'amas. Sur la Figure 17, quatre spectres présentent le profil généralement obtenu pour le tapis, mais le spectre rouge présente un signal un peu plus intense vers 1650 cm^{-1} , une région où le SN-38 contribue.

La Figure 18 confirme l'enrichissement local en SN-38, car tous les spectres de l'amas présentent un signal plus important vers 1650 cm^{-1} par rapport à ceux du tapis à proximité.

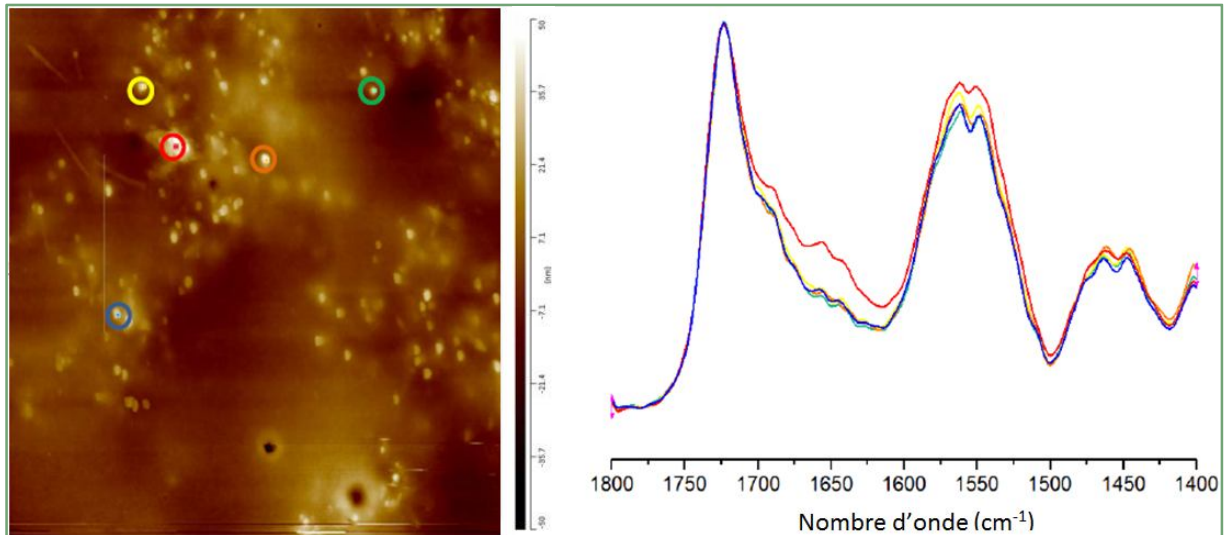


Figure 17 : L'image AFM mesure $10\text{ }\mu\text{m}$ de côté, à une résolution de 512 pixels x 512 pixels, et l'échelle verticale est de 100 nm. Les cercles colorés indiquent l'endroit où a été mesuré le spectre de la couleur correspondante. Les spectres ont été normalisés à partir de la bande à 1724 cm^{-1} pour rendre la comparaison aisée.

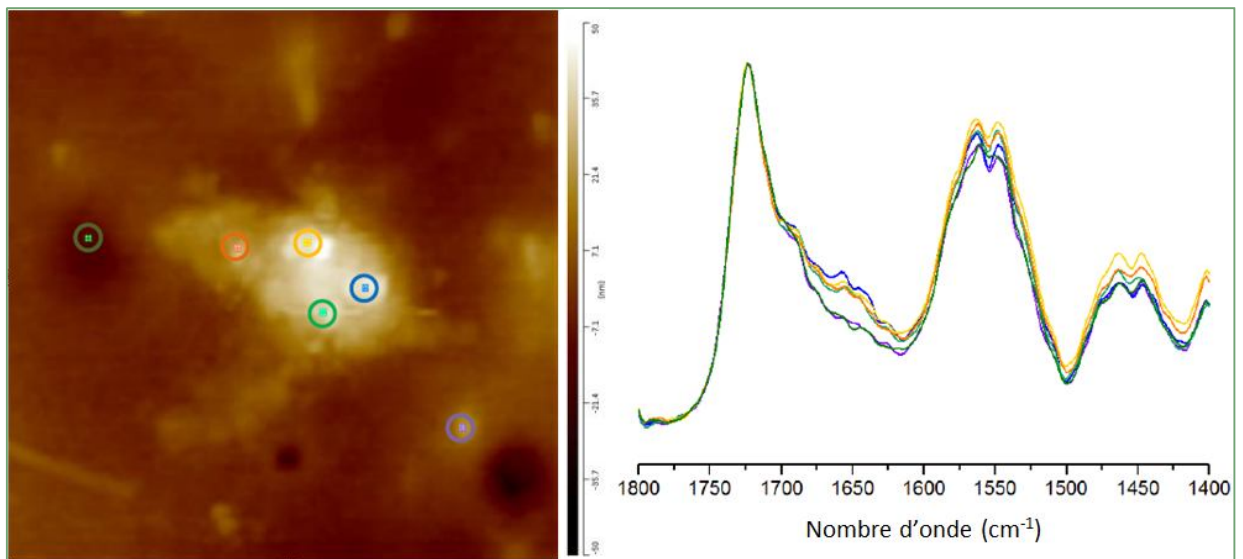


Figure 18 : L'image AFM mesure $2\text{ }\mu\text{m}$ de côté, résolution 256 pixels x 256 pixels, et l'échelle verticale est de 100 nm. Les cercles colorés indiquent l'endroit où ont été mesurés les spectres de la couleur correspondante. Les spectres ont été normalisés à partir de la bande à 1724 cm^{-1} pour rendre la comparaison aisée.

Parmi les cinq spectres (pris sur trois amas de trois échantillons différents) qui semblent montrer des quantités plus importantes de SN-38, on retrouve des spectres où la quantité de SN-38 semble encore plus grande si on se base sur les signaux à 1650 cm^{-1} et 1510 cm^{-1} , comme sur La Figure 19 présente deux spectres déjà montrés à la Figure 14, et celui d'un des amas mentionnés. On y voit les bandes à 1650 et 1510 cm^{-1} plus intenses et le massif autour de 1550 cm^{-1} est mieux défini. Il est difficile d'évaluer la quantité exacte de SN-38, mais on peut souligner la similitude du spectre avec celui obtenu par ATR pour un échantillon avec 20 % de SN-38 (Figure 10).

Un des amas a donné un spectre nanoIR qui révèle une grande proportion de SN-38 ; l'image AFM ($5\text{ }\mu\text{m} \times 5\text{ }\mu\text{m}$, 256×256 pixels) et deux spectres nanoIR obtenus de l'amas sont présentés à la Figure 20. La hauteur de l'amas est d'environ 75 nm. L'amas mesure plus d' $1\text{ }\mu\text{m}$ le long de son grand axe. Sur les spectres, on distingue clairement les principales bandes de la drogue, et une présence très minoritaire des contributions du polymère.

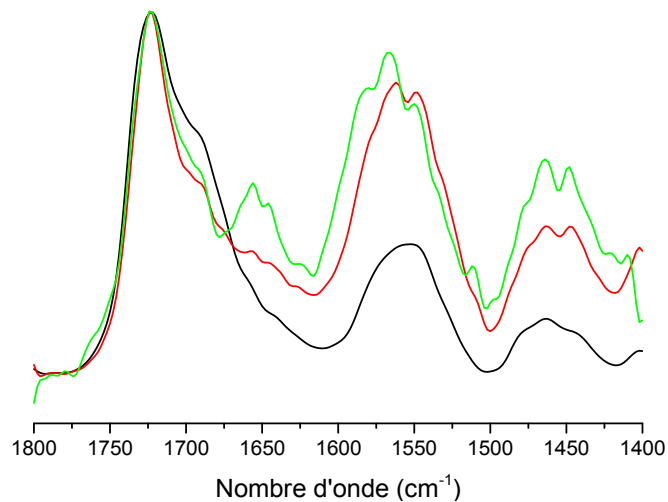


Figure 19 : Spectres obtenus par nanoIR. Le spectre noir est le celui du film de micelles vides. Le spectre vert est obtenu à partir d'un amas de l'échantillon de micelles avec SN-38 tandis que le spectre rouge est le spectre typique du tapis enregistré sur le même échantillon (le même que celui des Figure 17 et Figure 18). Les spectres ont été normalisés à partir de la bande à 1724 cm^{-1} pour rendre la comparaison aisée.

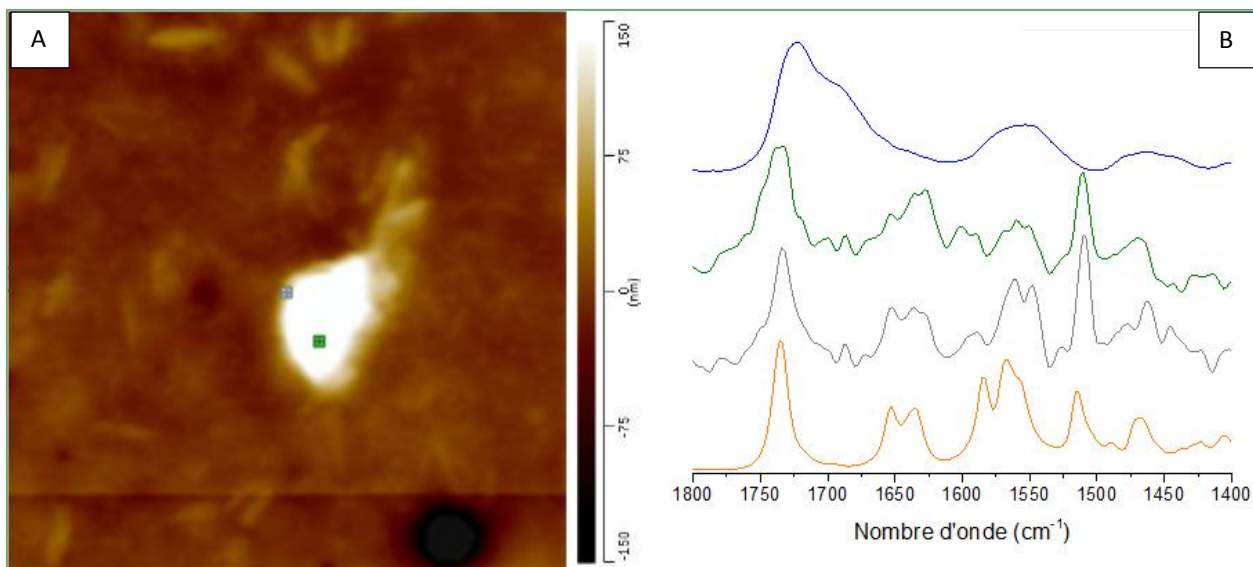


Figure 20 : A : Amas d'un film examiné par AFM, 5 μm x 5 μm , 256 pixels x 256 pixels, image topographique (échelle verticale 150 nm). B : Spectres nanoIR obtenus à partir de l'amas présenté en B ; les points de couleur représentent l'endroit de l'enregistrement des spectres aux couleurs correspondantes. Le spectre ATR du SN-38 pur (orange) et le spectre nanoIR du copolymère pur (bleu) sont reproduits pour fins de comparaison.

3.1.5. Conclusion partielle

L'analyse d'échantillons de copolymères contenant le SN-38 (10 %) a été effectuée sur des films obtenus par moulage de goutte de manière à obtenir une quantité de matériel suffisante pour la spectroscopie nanoIR. Avec cette approche, les échantillons étaient constitués d'un tapis sur lequel quelques amas pouvaient être observés. Les échantillons apparaissent majoritairement homogènes en ce qui concerne la distribution du SN-38 dans le tapis de micelles puisque tous les spectres enregistrés à partir du tapis et de la plupart des amas présentaient un profil très similaire. Seuls quelques spectres présentant des bandes de SN-38 plus intenses ont été observés ; ceux-ci étaient enregistrés sur quelques amas dont la taille était de quelques microns de longueur. Dans ces amas enrichis en drogue, la quantité de SN-38 est variable, entre 20 et presque 100 %. Il n'a pas été possible de déterminer si ces amas enrichis étaient présents dans la poudre de micelles ou s'ils sont des artéfacts associés à la préparation de l'échantillon par moulage à partir de goutte. Après avoir obtenu plus de spectres nanoIR, la bande à 1510 cm^{-1} nous est apparue comme moins intense et résolue qu'en ATR. Rétrospectivement, la bande de 1650 cm^{-1} aurait été un meilleur choix pour sonder la distribution du SN-38. Cependant la similarité de la grande majorité des spectres obtenus par nanoIR tend à confirmer notre conclusion quant à l'homogénéité de l'échantillon.

3.2. Stérosomes : Photolibération

Dans cette section, nous présentons les résultats d'analyses de spectrofluorométrie et spectroscopie d'absorption UV-Vis. Nous y étudions la libération d'une charge fluorescente par un liposome photosensible composé de sulfate de cholestérol et d'un dérivé d'azobenzène monoalkylé – c'est le composé photosensible. Nous y étudions aussi l'influence de la phase de la bicouche sur la cinétique d'isomérisation de l'azo et la libération de la sonde fluorescente encapsulée dans ces liposomes en remplaçant le sulfate de cholestérol par du DPPC puis du POPC, des lipides dont la T_m est de 41 °C et -2 °C respectivement.

3.2.1. Isomérisation : cinétique et photolibération

La Figure 21 présente les spectres d'absorption de l'azo sous forme trans et cis dans la bicouche de liposomes SC/azo en proportions 3/1 (mol/mol). La forme trans présente un pic d'absorption autour de 350 nm⁶⁸, associé à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ de l'azobenzène. La forme cis possède un pic plus petit autour de 450 nm. Celui-ci correspond à la transition $n \rightarrow \pi^*$ de l'azobenzène,^{70,72} Illuminer les stérosomes dont l'azo est sous forme cis à 450 nm provoque le retour à la forme trans en 3 minutes.

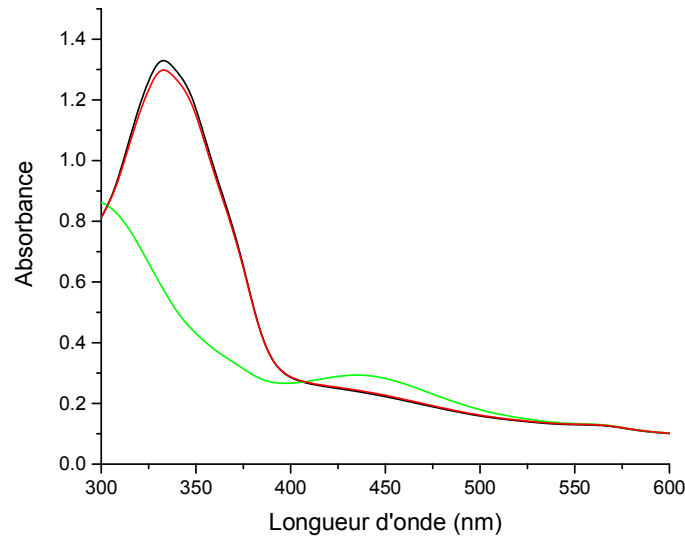


Figure 21 : Spectres d'absorption UV-vis d'une dispersion de liposomes SC/azo illuminés à 450 nm pendant 5 minutes (ligne noire), illuminés à 350 nm pendant 7 minutes (verte), et illuminés à 350 nm pendant 7 minutes puis 450 nm pendant 3 minutes (rouge).

La Figure 22A présente l'augmentation de la proportion d'azo sous forme cis, obtenue avec l'équation (3), en fonction de la durée de l'illumination à 350 nm d'une dispersion de

stérosomes SC/azo. L'isomérisation atteint un plateau après 4 minutes d'illumination. Le τ calculé est de 73 ± 4 s. La Figure 22B, présente la libération de SRB, également en fonction de la durée de l'illumination à 350 nm d'une dispersion de stérosomes SC/azo chargés de SRB. La libération de SRB n'est significative qu'après 10 secondes d'illumination. Puis la quantité de SRB libérée en fonction du temps suit une exponentielle décroissante (lorsque la période de 0 et 5 s est omise); le temps caractéristique (τ) de cette exponentielle est de 38 ± 3 s. La libération ralentit et plafonne autour de 75-80 %. La diffusion au travers de la membrane pendant l'illumination est donc plus rapide que l'isomérisation, et la phase de libération se termine après 60 s alors que l'isomérisation continue jusqu'à 120 s.

Deux hypothèses sont proposées pour expliquer que la libération plafonne à 80 %. Premièrement, certains stérosomes pourraient posséder une quantité d'azo insuffisante pour assurer une libération de toute la SRB. Il resterait alors de la SRB encapsulée dans ces stérosomes relativement pauvres en azo. Deuxièmement, des groupes de recherche¹¹¹⁻¹¹⁵ ont montré qu'une interaction entre la SRB et le Triton X-100 pourrait mener à une augmentation de l'intensité de fluorescence de la sonde par rapport à la sonde libre en milieu aqueux. Un tel phénomène diminuerait de manière artificielle la proportion de sonde libérée.

La détérioration de l'imperméabilité de la bicouche lipidique semble donc se produire à partir de 10 % d'azo-cis, obtenus après 10 s d'illumination. Cette proportion induirait une perturbation suffisante de la bicouche pour la diffusion de la SRB hors des stérosomes.

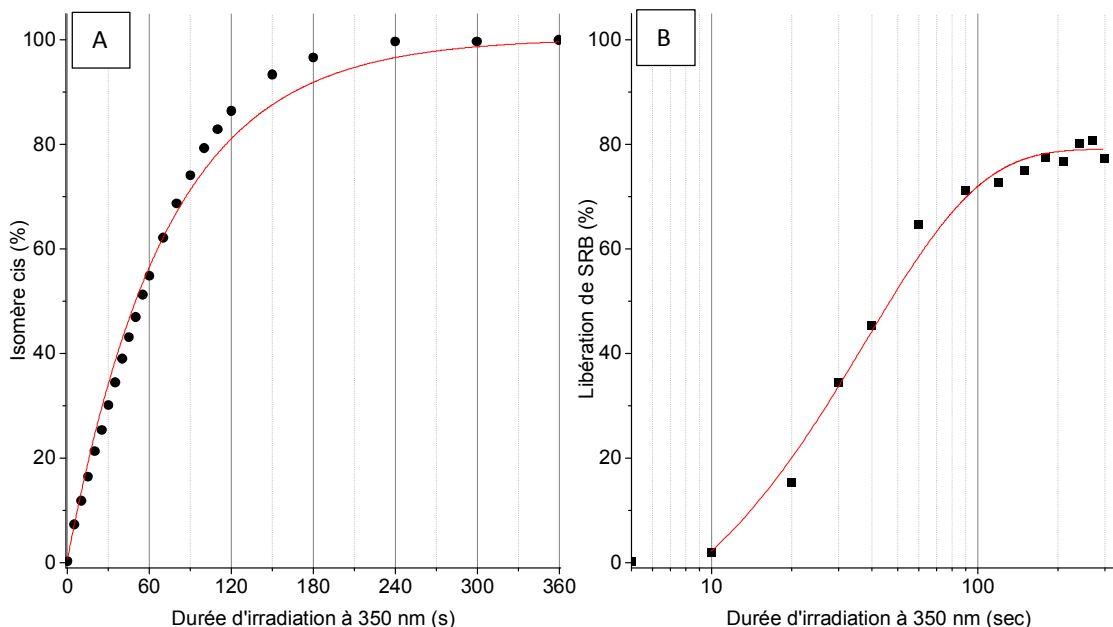


Figure 22 : A : Proportion d'azo sous forme cis (•) en fonction de la durée d'illumination à 350 nm. B : Libération de SRB par illumination à 350 nm de stérosomes de SC/azo et (en rouge) régression exponentielle décroissante pour la libération de t = 10 à t = 300 s.

Les résultats obtenus précédemment pour le système SC/azo indiquent un τ d'isomérisation de 126 ± 6 s.⁶⁸ La libération sous illumination continue commençait entre 60 et 90 s après le début de l'illumination. Ces valeurs montrent une cinétique significativement plus lente que celle observée dans le présent travail. Il faut noter que le flux de lumière à 350 nm n'est pas quantifié et on peut supposer que l'illumination lors du présent travail était plus puissante, provoquant une isomérisation trans-cis et une libération plus rapides. Pour preuve de cette hypothèse, la durée d'illumination nécessaire pour atteindre 30 % d'azo-cis : 120 s pour les travaux précédents⁶⁸, contre 30 s pour ce travail.

La Figure 23A présente la quantité de SRB libérée de liposomes de SC/azo dans 3 cas : la fuite passive (i.e. sans illumination), après 30 s d'illumination à 350 nm et après un photocycle. Un photocycle consiste à illuminer la dispersion de stérosomes pendant 30 s à 350 nm, puis immédiatement à 450 nm pendant 180 s, donc amener la proportion d'azo-cis à 30 % puis à la ramener au minimum (voir Figure 22).

La SRB sort des stérosomes suivant le gradient de concentration qui existe de part et d'autre de la bicouche, mais la libération passive est quasi nulle, moins de 0.1 % en 10 minutes ($6 \pm 4 \cdot 10^{-5} \text{ %/s}$, Figure 23 A, courbe en pointillés).

Illuminer 30 s à 350 nm provoque la libération de 30 % de SRB pendant l'illumination, puis une libération continue sans illumination, présentée sur la Figure 23 A, courbe en trait plein. Le taux de libération mesuré entre 240 et 500 s après l'illumination est de $7 \pm 2 \cdot 10^{-3} \text{ %/s}$. Ainsi, illuminer les stérosomes à 350 nm provoque, d'une part, l'isomérisation de l'azo et la libération rapide de SRB pendant la réorganisation de la bicouche autour des azo-cis, et, d'autre part, une augmentation de la perméabilité de la bicouche après l'illumination, due à la présence d'azo-cis.

Un photocycle (30 s à 350 nm, puis immédiatement 180 s à 450 nm) libère 30 % de SRB durant l'illumination, puis montre un taux de libération de $2 \pm 1 \cdot 10^{-3} \text{ %/s}$ après cette double illumination, mesuré entre 240 et 800 s (voir Figure 23 A, courbe en tirets).

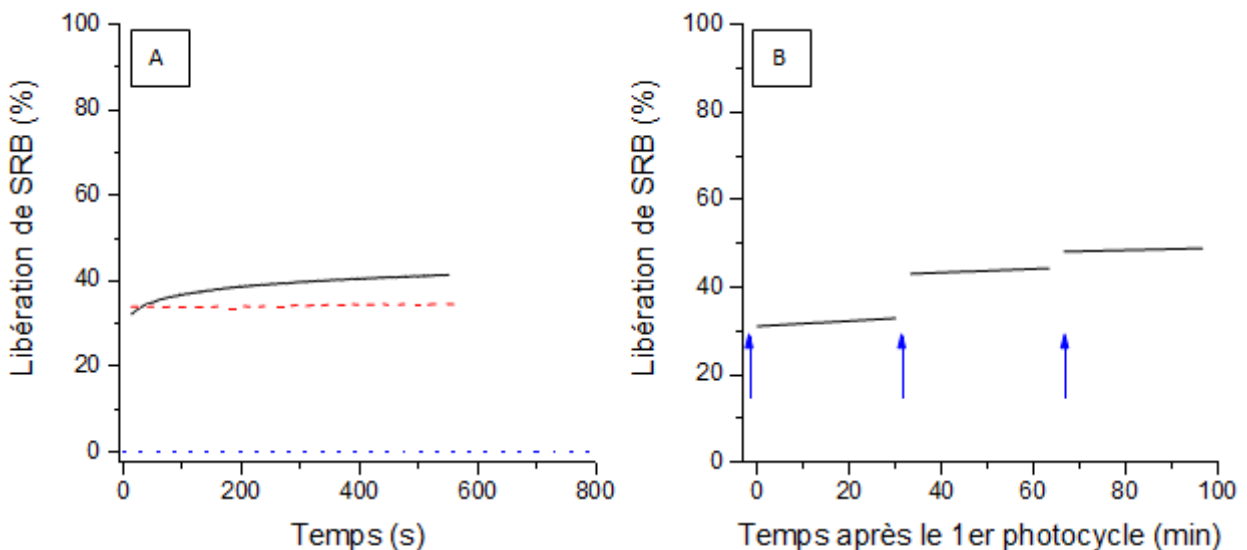


Figure 23 : A : Libération de SRB de stérosomes SC/Azo dans 3 cas ; ligne solide: après 30 s d'illumination à 350 nm; tirets : après 30 s à 350 nm et 180 s à 450 nm; en pointillés : la fuite passive. B : libération de SRB après 1, 2, puis 3 photocycles successifs. Les flèches bleues indiquent les photocycles.

La libération passive est faible ; il faut 10 jours pour que plus de la moitié de la SRB encapsulée soit libérée passivement. Pour les stérosomes illuminés 30 s à 350 nm, la libération continue est significativement plus rapide que la fuite passive : il faut deux heures pour que la moitié de la SRB soit libérée. La libération continue après un photocycle est trois fois et demie plus faible qu'après une simple illumination à 350 nm. Elle nous indique qu'il est possible de modifier la perméabilité dans les deux sens : augmenter la perméabilité en illuminant à 350 nm pour générer l'azo-cis, et diminuer la perméabilité en illuminant à 450 nm pour générer l'azo-trans. Illuminer à 450 nm mène à la formation de l'isomère trans, ce qui restaure l'intégrité de la bicouche et diminue la fuite de SRB.

À la Figure 23B, la libération de SRB après un, deux, puis trois photocycles successifs est présentée. On y retrouve 30 % de SRB libérée après un photocycle, 10 % pour le deuxième photocycle et 5 % après le troisième. On note, en fonction du nombre de photocycles, que chacun des photocycles mène à une libération plus faible pendant le photocycle, et à une perméabilité plus diminuée entre les photocycles. À la fin des trois cycles, il reste toujours ~50 % de la SRB encapsulée. Comme le rapport volume externe/volume interne des stérosomes est très grand, le facteur de dilution de la SRB libérée est important, et le gradient de concentration de SRB de part et d'autre la paroi des stérosomes varie seulement d'environ un facteur 2 pour une libération de 50 %, en supposant que la concentration extérieure est nulle. La diminution de gradient de SRB n'est donc pas à l'origine de la diminution de transport au travers la paroi des liposomes. Les résultats des travaux précédents indiquent une libération de $\pm 30\%$ par photocycle⁶⁸ ; cependant la comparaison est difficile, car ces photocycles-là impliquaient 120 s d'illumination à 350 nm, et non 30 s comme pour le présent travail. Une hypothèse pour expliquer la diminution marquée de la libération en fonction du nombre de photocycles serait qu'il y ait des variations dans la réponse des stérosomes à la photoisomérisation du groupement azo. Par exemple, il pourrait y avoir une variation du rapport SC/azo pour les différents stérosomes, 3/1 SC/azo étant une moyenne. Comme mentionné pour la libération limitée à 80 % (Figure 22), une proportion d'azo critique minimale pourrait faire en sorte que certains stérosomes soient moins sensibles à la photoisomérisation. De manière similaire, les stérosomes avec un rayon de courbure plus grand pourraient mieux supporter la tension apportée par l'azo en conformation cis. Ces deux paramètres pourraient faire en sorte que les stérosomes plus fragiles libèrent leur contenu lors du premier photocycle, laissant les stérosomes plus robustes encore relativement pleins. Néanmoins, nos résultats montrent qu'il est possible d'obtenir une

libération ponctuelle et répétée de doses de SRB, à partir d'une même population de stérosomes.

3.2.2. Effet de la variation de la phase de la bicouche

L'objectif était d'étudier le comportement d'isomérisation de l'azo dans des bicouches lipidiques de différentes phases, et l'effet de cette isomérisation sur la perméabilité et l'ordre de ces bicouches. À cette fin, des stérosomes de différentes compositions ont été préparés : DPPC-azo, en phase *gel*; SC-azo, en phase *lo*; et POPC-azo, en phase *ld*. Toutes les préparations étaient un mélange 3/1 (mol/mol) de lipide et d'azo.

D'abord, les résultats de DLS présentés au Tableau 1 indiquent que toutes les formulations préparées en absence de SRB présentent des particules ayant un diamètre hydrodynamique de l'ordre de 110 à 150 nm après l'extrusion, et confirment donc la fabrication de liposomes.

Tableau 1 : Rayon hydrodynamique et indice de polydispersité des liposomes préparés sans SRB par DLS.

Composition du liposome	Rayon hydrodynamique (nm)	Indice de polydispersité
POPC/azo	158	0.20
SC/azo	143	0.14
DPPC/azo	112	0.08

La Figure 24 présente les spectres d'absorption UV-Vis des trois formulations de stérosomes, avant et après illumination à 350 nm pendant 7 minutes. Dans les trois cas, l'illumination à 350 nm provoque un changement dans l'allure du spectre : le pic à 350 nm disparaît, et un plus petit pic apparaît à 450 nm. On observe que le maximum du pic à 350 nm n'est pas exactement à la même position dans les différentes bicouches : la formulation POPC/azo, en phase *ld*, présente un maximum à 348 nm, et les SC/azo (*lo*) et DPPC/azo (*gel*) autour de 335 nm.

D'après Kuiper et Engberts⁷⁶, qui ont étudié des lipides dérivés d'azobenzène, le maximum d'absorption autour de 300 nm indique un maximum d'agrégation des dérivés

azobenzène dans la membrane tandis qu'un maximum autour de 350 nm est indicatif de dérivés d'azo sous forme monomérique ou dimérique. Le décalage vers le bleu lors de l'agrégation des fluorophores est associé aux fonctions azobenzène de molécules voisines, qui sont parallèles et très proches, entraînant de fortes interactions interchaînes entre les fonctions azobenzène. Dans notre cas, les azo ne forment probablement pas d'agrégats, vu que nos maxima d'absorption sont autour de 350 nm. Cependant, il est possible qu'il y ait plus de dimères (parce que plus décalé vers le bleu) dans les bicouches plus rigides faites de DPPC/azo et SC/azo, que dans les bicouches POPC/azo.

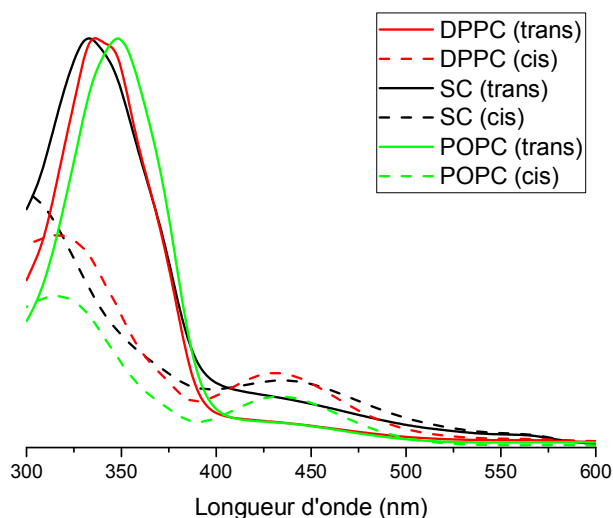


Figure 24 : Spectres d'absorption UV-Vis des stérosomes de SC/azo (noir), DPPC/azo (rouge), et POPC/azo (vert) avant (lignes pleines) et après (lignes hachées) 7 minutes d'illumination à 350 nm. Les spectres ont été normalisés pour faciliter la comparaison.

L'illumination à 350 nm conduit, pour les trois types de liposomes, à la diminution de l'intensité du pic d'absorption à 350 nm, et à l'émergence d'un pic plus modeste, autour de 450 nm. Ces résultats nous indiquent que l'isomérisation est possible dans les trois bicouches, ce qui est cohérent avec l'absence d'agrégation importante proposée à partir des maxima d'absorption.¹¹⁶⁻¹¹⁸

La Figure 25 présente l'évolution de la population d'azo sous forme trans lorsqu'une dispersion de stérosomes est illuminée à 350 nm. La proportion d'azo est fixée à 100 % à $t=0$ s,

puisque la suspension est illuminée à 450 nm pendant 5 minutes auparavant, comme indiqué plus haut. Les trois systèmes présentent une cinétique exponentielle : le Tableau 2 présente la constante de temps obtenue lorsqu'on applique une régression exponentielle (équation 3) à ces cinétiques. On constate que l'isomérisation est plus lente lorsque la phase de la bicouche est plus ordonnée ($gel > lo > ld$), ce qui est cohérent avec la littérature, qui décrit une isomérisation trans-cis plus lente dans un milieu plus ordonné ou plus rigide.^{75,76}

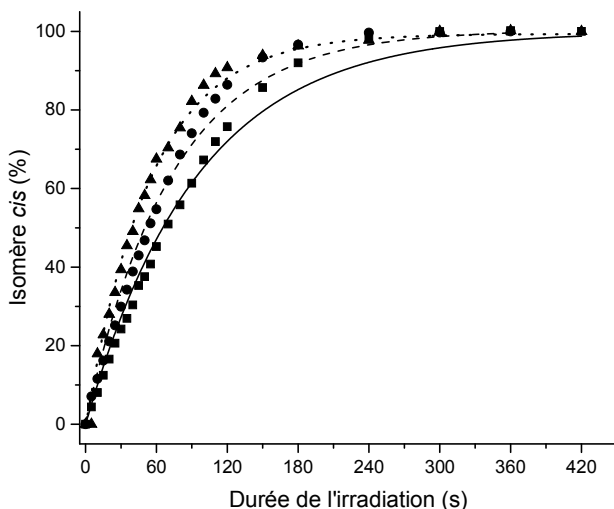


Figure 25 : Évolution de la proportion d'isomère cis dans des liposomes de SC/azo (●, tiret), DPPC/azo (■, trait plein) et POPC/azo (▲, pointillés) en fonction de la durée d'illumination à 350 nm. Les courbes représentent les régressions exponentielles.

Tableau 2 : Temps caractéristique de la régression exponentielle de la cinétique d'isomérisation trans-cis dans la bicouche de liposomes illuminés à 350 nm, et l'erreur associée à la régression.

Composition	τ (s)
DPPC/azo	94 ± 6
SC/azo	73 ± 4
POPC/azo	55 ± 2

La Figure 26 présente la libération de SRB en fonction du temps pour une population de liposomes de POPC/azo, avant et après 5 minutes d'illumination à 350 nm, puis lors de l'ajout de Triton X-100 dans la suspension. Le taux de libération passive du système POPC/azo est de 10^{-2} %/s, soit trois ordres de grandeur plus élevé que celui du système SC/azo (10^{-5} %/s). Près de 20 % de la SRB ont quitté les liposomes pendant les 10 premières minutes. Le taux de libération

de la SRB ne semble pratiquement pas influencé par l'illumination à 350 nm. La courbe de libération peut être complétée durant l'illumination par une droite hypothétique dont la pente est très proche de celles des portions qui précèdent et suivent l'illumination. L'importance de la fuite passive, l'insensibilité à l'isomérisation de l'azo, et à la présence d'azo-cis peuvent être expliquées par la fluidité de la bicouche.^{119,120}

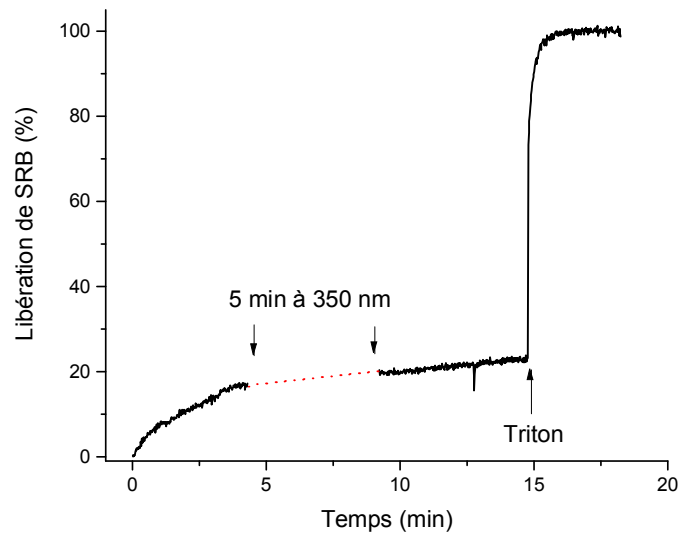


Figure 26 : Libération de SRB en fonction du temps pour une population de liposomes de POPC/azo. La droite pointillée est une intrapolação servant à guider l'œil du lecteur.

La fabrication de liposomes de DPPC/azo chargés en SRB a été difficile, et en une quinzaine d'essais, seules deux populations de liposomes chargés ont été isolées. Un mélange DPPC/DPPS/azo 1.5/1.5/1 a été également testé. La présence de charges négatives de surface apportées par DPPS favorise la répulsion électrostatique entre les liposomes et entre la bicouche et la SRB. Ce mélange était plus facile à extruder, mais il était impossible d'obtenir une libération passive et photoinduite reproductible. La difficulté d'obtenir des liposomes incorporant l'azo en phase *gel* de manière reproductible nous a poussés à suspendre cette partie de l'étude.

3.2.3. Conclusion partielle

Pour la création de liposomes incorporant un dérivé d'azo dans la bicouche en proportion 3/1, permettant de contrôler la perméabilité par sa photoisomérisation, nous concluons que la phase *lo* semble la plus indiquée pour des applications de libération contrôlée. La phase *ld* de liposomes POPC/azo accommode l'isomérisation de l'azo et la présence des azo-cis subséquents sans changement dans son taux de fuite et montre une fuite passive élevée. La phase *gel* de liposomes de DPPC/azo rend la fabrication reproductible malaisée.

Nous posons l'hypothèse que l'isomérisation de l'azo pendant l'illumination et la présence d'azo-cis consécutive à l'illumination, sont deux moteurs de libération de la SRB. La quantité de SRB libérée par l'isomérisation de l'azo pendant la première minute d'illumination est variable, et il est probable que des variations mineures dans la composition de la bicouche, le pH interne, le pH externe, l'osmolalité, ou une combinaison de ces facteurs soient partiellement responsables du manque de reproductibilité.

3.3. Stérosomes : ^2H RMN

Dans cette section, nous tentons d'identifier le mécanisme par lequel l'isomérisation du dérivé d'azobenzène influe sur la perméabilité de la bicouche lipidique de liposomes de composition SC/azo 3/1 (mol/mol). Pour ce faire, des analyses de RMN solides du deutérium ont été effectuées, où du palmitate perdeutééré vient remplacer une partie du dérivé d'azobenzène dans la bicouche. L'effet de l'isomérisation de la fonction azobenzène sur l'ordre de la bicouche y est discuté.

3.3.1. Étude des spectres

Afin d'approfondir notre compréhension du mécanisme de perméabilisation de l'azo sur la bicouche des stérosomes, le spectre RMN (^2H) d'un acide gras perdeutééré, PA₃₁, dans la bicouche de stérosomes SC/azo dont la moitié de l'azo est substitué par du PA₃₁, est mesuré, avec l'azo en conformation trans ou cis. Avant cela, nous avons fait des expériences de photolibération pour s'assurer que le comportement des stérosomes de composition SC/azo/PA en proportions 6/1/1 (mol/mol) chargés de SRB soit similaire à celui de stérosomes sans PA lors de l'isomérisation de l'azo par illumination à 350 nm.

La Figure 27 présente ces résultats et les compare à ceux de la Figure 22 B. Pour les liposomes de SC/azo/PA, il n'y a pas de libération pendant les 5 premières secondes, puis libération rapide qui plafonne après 60 s ; le comportement des liposomes avec et sans PA est semblable. Les deux courbes montrent une période de 5 secondes d'illumination sans fuite. Une régression exponentielle appliquée sur la courbe (en omettant la période de 0 à 5 secondes) donne les τ suivants : 34 ± 2 s pour le système SC/azo, et 30 ± 4 s pour le système avec PA. Finalement, les valeurs de libération aux plateaux sont aussi semblables.

La Figure 28 présente trois spectres RMN du ^2H de bicouches de stérosomes, et le résultat du depakeing de chacun. Les spectres A et B ont été mesurés sur des stérosomes SC/azo/PA₃₁. Les spectres C sont le résultat d'analyses faites par Bastiat et Lafleur, sur des stérosomes de composition SC/PA₃₁ 70/30, à pH 5.5.⁶⁴ La Figure 29 présente les spectres depakés superposés, pour une meilleure comparaison. La Figure 30 montre les profils d'ordre calculés à partir des spectres depakés.

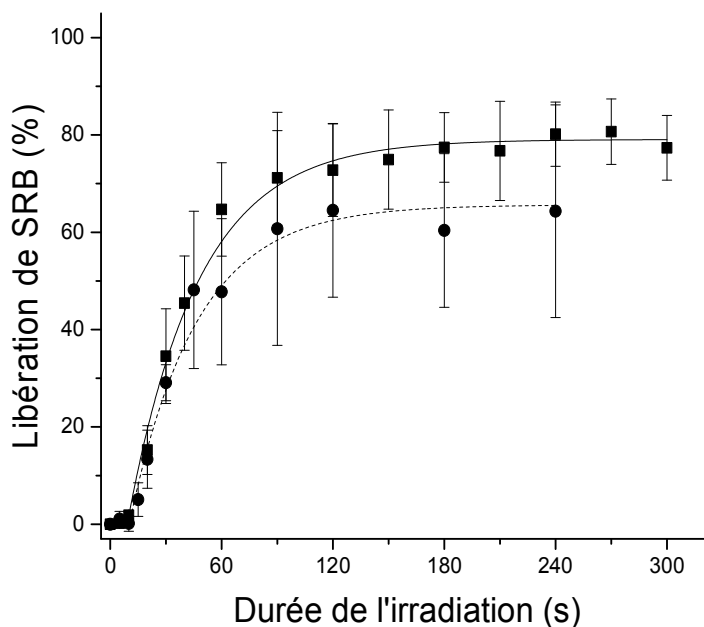


Figure 27 : Libération de SRB en fonction de la durée de l'illumination pour deux populations de stérosomes : SC/azo en proportions 3/1 (mol/mol) (▪) (n=7) et SC/azo/PA en proportions 6/1/1 (mol/mol) (•) (n=3). Les points représentent la moyenne et les barres d'erreurs, les écarts-type).

Les spectres des trois mélanges sont caractéristiques de systèmes en phase lamellaire fluide : on y retrouve plusieurs motifs de poudre superposés. Le motif possédant l'éclatement le plus faible est associé au méthyle terminal, celui-ci possédant une dynamique propre. Les contributions avec les éclatements les plus importants, autour de 50-60 kHz sont associées aux méthylènes proches de l'interface lipide-eau ; elles conduisent au plateau dans le profil d'ordre. Ces valeurs sont caractéristiques d'une phase *lo*.^{94,121} Plusieurs spectres de poudre avec des éclatements plus petits sont observés et sont associés aux méthylènes qui sont plus mobiles, au fur et à mesure qu'on se dirige vers le bout de la chaîne alkyle.

Le spectre du système SC/PA₃₁ (Figure 28, spectre C), est le plus large, à ± 55 kHz. Le spectre déPaké (Figure 29, vert) montre un éclatement des méthyles d'environ 4,9 kHz. On retrouve entre le signal du méthyle et le massif à éclatement maximal quatre doublets dans le spectre déPaké bien isolés entre 6 et 15 kHz, correspondant aux méthylènes les plus désordonnés. Le profil d'ordre (Figure 30, carrés), est typique de la phase lamellaire avec la

région du plateau, entre les positions 2 et 7, où l'ordre varie peu, suivie d'une diminution plus accentuée de l'ordre vers le bout de la chaîne.

Les spectres de PA₃₁ dans la bicouche de stérosomes avec et sans azo ont des allures différentes : de manière générale, la présence d'azo réduit considérablement l'ordre dans la bicouche. Le spectre de PA₃₁ dans une bicouche SC/PA₃₁/azo-trans (Spectre B) est plus étroit, avec des massifs aux extrémités du spectre ayant un éclatement de ± 50 kHz. Sur la Figure 29, on note que le signal central associé au méthyle terminal a un éclatement quadripolaire de 6 kHz, soit légèrement plus large que le système SC/PA₃₁ (4,9 kHz). Le rapport signal/bruit rend difficile l'identification formelle de pics de méthylènes entre le méthyle central et le massif extérieur, mais il semble y avoir moins de spectres de poudre résolus. Le profil d'ordre (Figure 30, ronds) présente un profil semblable à celui du SC/PA₃₁, mais avec une décroissance plus progressive de l'ordre le long de la chaîne méthylène (quasi linéaire pour onze-douze méthylènes sur les quatorze de la chaîne).

Le spectre de PA₃₁ dans une bicouche SC/PA₃₁/azo-cis (Spectre A) est le plus étroit, le signal le plus large étant de ± 46 kHz. L'éclatement du méthyle est le plus étroit également : 3,7 kHz. À nouveau, le rapport signal/bruit rend difficile l'identification formelle de pics de méthylènes entre le méthyle central et le massif extérieur. La variation d'ordre le long de la chaîne est semblable aux profils de SC/PA₃₁ et SC/PA₃₁/azo-trans, avec des S moindres (Figure 30, triangles) : le profil d'ordre en présence d'azo-cis est le plus désordonné et présente un plateau plus court qu'en présence d'azo-trans (dix méthylènes). Donc la présence de l'azo en conformation cis diminue l'ordre dans la bicouche des stérosomes tel que mesuré par PA₃₁.

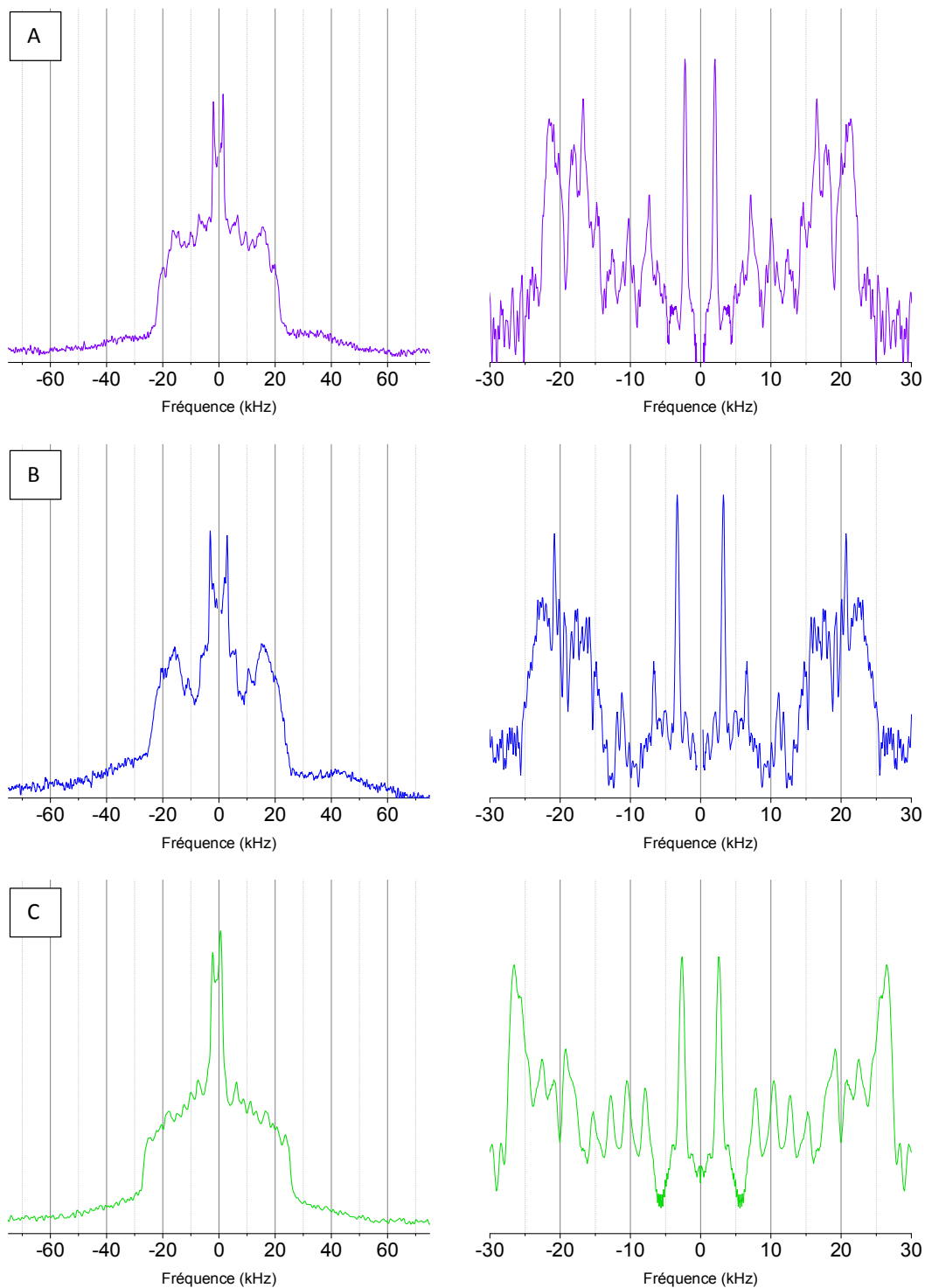


Figure 28 : Spectres RMN de PA_{31} dans la bicouche de sterosomes et spectres depakés correspondants (à droite). Sterosomes dont l'azo est sous forme cis (A) ; sterosomes dont l'azo est sous forme trans (B) ; spectre de PA_{31} dans une bicouche SC/PA_{31} 70/30⁶⁴ (C). Le pic fin au centre des spectres de poudre a été éliminé pour mettre en évidence le signal provenant de la bicouche.

L'interprétation des signaux des méthylènes les plus ordonnés est délicate pour plusieurs raisons. La première est le faible rapport signal/bruit. La seconde, parce que la position de l'azobenzène dans la bicouche a une grande influence sur l'ordre dans cette bicouche. On peut imaginer qu'en conformation trans, et donc plane, un régime plus ordonné comme le centre d'une des monocouches (ni dans le cœur de la bicouche, ni proche des fonctions hydrophiles), pourrait l'accommoder. La fonction azo plane pourrait se placer parmi les chaînes alkyles et les cycles relativement plats des cholestérols sans générer beaucoup de désordre. En conformation cis, le groupement est plus volumineux et il est plus probable qu'il soit dans le cœur de la bicouche, la zone la plus désordonnée de la bicouche, où il sera plus facile d'accommoder un groupement volumineux. Suivant la position respective des isomères du groupement azobenzène, il peut y avoir un déplacement de ce groupement à cause de l'isomérisation. On peut imaginer un phénomène de migration des groupements après l'isomérisation. Après illumination à 350 nm, le groupement cis migrerait vers le cœur de la bicouche. Après illumination à 450 nm, le groupement trans pourrait rejoindre le centre de la monocouche où se trouve la molécule. Le gain de volume et cet hypothétique mouvement pourraient expliquer la forte augmentation de perméabilité pendant l'isomérisation.

La littérature propose que l'azobenzène en fin de chaîne alkyle soit au cœur de la bicouche, dans la zone la plus hydrophobe.^{116,122,123} À partir des résultats présentés ici, il est difficile d'identifier la localisation dans la bicouche SC/azo du groupement azo, cœur de la bicouche ou centre d'une des deux monocouches. La part de subjectivité dans la détermination de la ligne de base et des bornes d'intégration pour le dephasing, le rapport signal/bruit limité des spectres peuvent influencer les profils d'ordre. De plus, on suppose un ordre décroissant le long de la chaîne alkyle, ce qui n'est peut-être pas le cas. Il faut donc considérer les profils d'ordre avec prudence. Cependant, avec la conformation trans, on observe une diminution de l'ordre près de l'interface, mais une augmentation du paramètre d'ordre pour le méthyle terminal. Le groupement azo peut perturber l'empilement des cholestérols dans la bicouche, conduisant à plus de désordre conformationnel de PA. Le méthyle de PA d'une couche pourrait s'étirer pour occuper le « volume libre » de la couche opposée laissé par l'empilement moins compact. L'isomère cis cause une diminution de l'ordre tout le long de la chaîne. Des expériences supplémentaires, comme des simulations de dynamique moléculaire, doivent être faites pour comprendre les détails des variations d'ordre observées. Nous concluons que la

forme trans et la forme cis affectent l'ordre du cœur hydrophobe tel que sondé par PA₃₁, et que l'effet de la forme cis est plus prononcé.

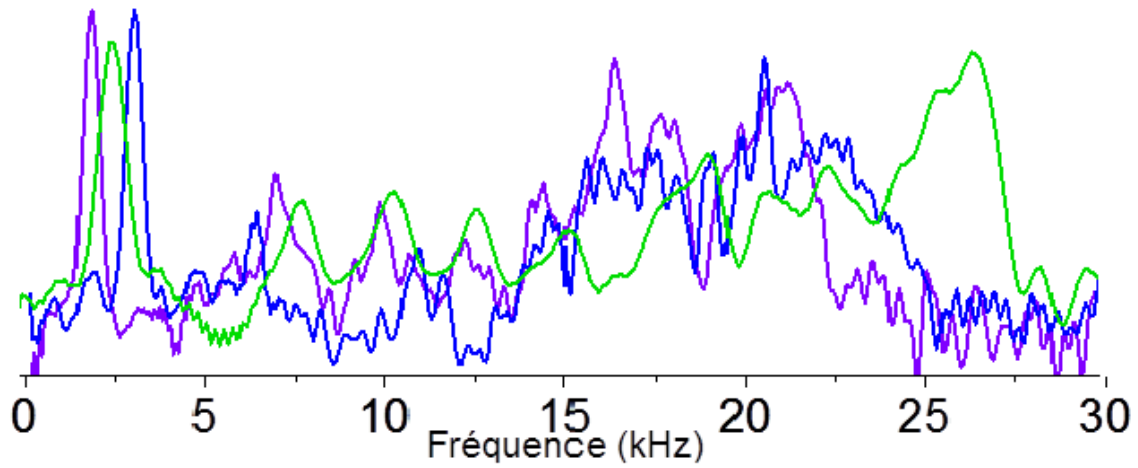


Figure 29 : Spectres RMN depakés de PA₃₁ dans la bicouche de stérosomes de SC/PA₃₁ 70/30 (vert), SC/azo/PA₃₁ dont l'azo est sous forme trans (bleu), et SC/azo/PA₃₁ dont l'azo est sous forme cis (violet).

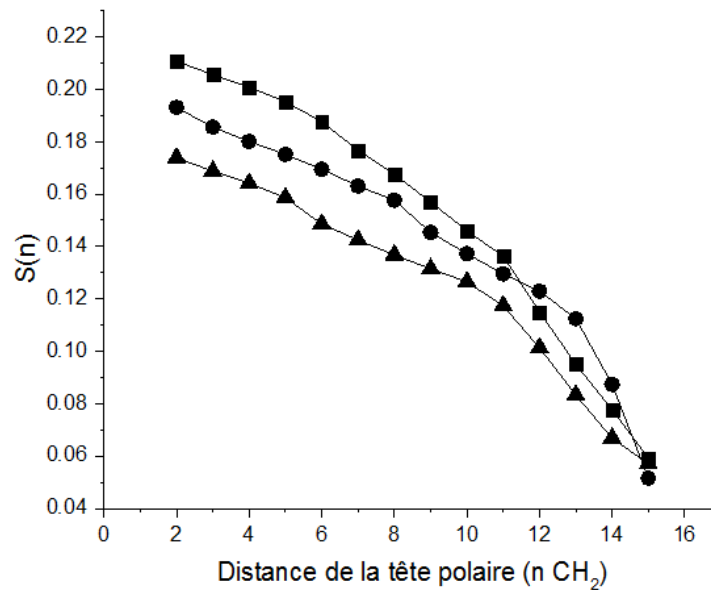


Figure 30 : Profils d'ordre du système SC/PA₃₁/azo-trans (●), SC/PA₃₁/azo-cis (▲) et SC/PA₃₁ (■).

3.3.2. Isomérisation : étude de la cinétique

Nous avons identifié à la section précédente que l'éclatement quadripolaire du méthyle terminal de PA₃₁ varie de manière considérable lors du passage de la conformation cis-trans de l'azo. Nous avons donc exploité cette variation afin de déterminer la cinétique de relaxation cis-trans de l'azo dans les bicouches de SC/azo/PA₃₁. La Figure 31 présente cette cinétique observée de deux manières indépendantes : par la variation de $\Delta\nu_Q$ des méthyles terminaux et par la variation de l'absorbance à 350 nm.

La cinétique par spectroscopie électronique a été obtenue pour une dispersion de stérosomes de composition identique à celle utilisée en RMN, sauf avec PA hydrogéné (i.e. sans deutérium), soit SC/azo/PA en proportions molaires 6/1/1, à une concentration de 20 μ M de lipides. Les mesures ont eu lieu à température de la pièce. La formation complète de l'isomère cis a été effectuée par illumination à 350 nm, et contrôlée par spectroscopie électronique jusqu'à ce que l'absorbance à 350 nm atteigne une valeur stable (environ 7 minutes). La proportion d'azo-cis est calculée selon l'équation (3), section 2.3.1. Comme prévu, cette proportion a diminué avec le temps, et présente un comportement exponentiel. Le temps caractéristique est 51 h.

Pour les mesures RMN, la suspension a été illuminée à 350 nm, et l'isomérisation considérée comme terminée (100 % d'azo-cis) lorsque l'absorbance à 350 nm d'un aliquote de cette suspension ne variait plus, même après illumination de cet aliquote à 350 nm. Comme prévu, l'éclatement a augmenté avec le temps, de 3,7 kHz à 6 kHz, et présente un comportement exponentiel. Le temps caractéristique est 34 h.

Les deux approches conduisent donc à un temps caractéristique de l'isomérisation cis-trans similaire. Les résultats obtenus sont aussi cohérents avec ceux obtenus par Cui et al qui rapportaient un temps caractéristique de 31 h pour le système SC/azo, mesuré par spectroscopie électronique.⁶⁸

Il faut préciser qu'il existe des différences entre les méthodes de mesure et entre les systèmes : concentration, formations lipidiques (MLV pour les résultats présentés dans ce travail, LUV pour les résultats de Cui et al.). Les mesures en spectroscopie électronique sont instantanées – un spectre est mesuré quelques secondes après l'illumination – et directes : on sait que l'azo voit son absorbance à 350 nm changer avec l'isomérisation, comme montré sur les

Figures 21 et 26. Les données RMN, elles, représentent chacune une accumulation de signal pendant 3 heures.

La cinétique obtenue par les deux approches pourrait être aussi significativement différente. L'observation UV-vis apporte de l'information directe sur l'isomérisation de l'azo. Mais pour la RMN, c'est une observation indirecte, via le désordre de la bicouche sondé par le $\Delta\nu_Q$ des méthyles de PA₃₁. Il est possible que le désordre de ces méthyles ne réponde pas de manière directe et linéaire à la proportion cis-trans. Il est possible qu'une faible proportion de conformères cis n'ait pas d'effet mesurable par RMN, ce qui entraînerait un retour plus rapide aux valeurs d'éclatement associées à la présence des conformères trans. Cette observation serait en fait compatible avec l'absence de libération que nous observons avec une proportion limitée de conformère cis. Pour valider ce point, des mesures sur un plus grand nombre d'échantillons devront être effectuées.

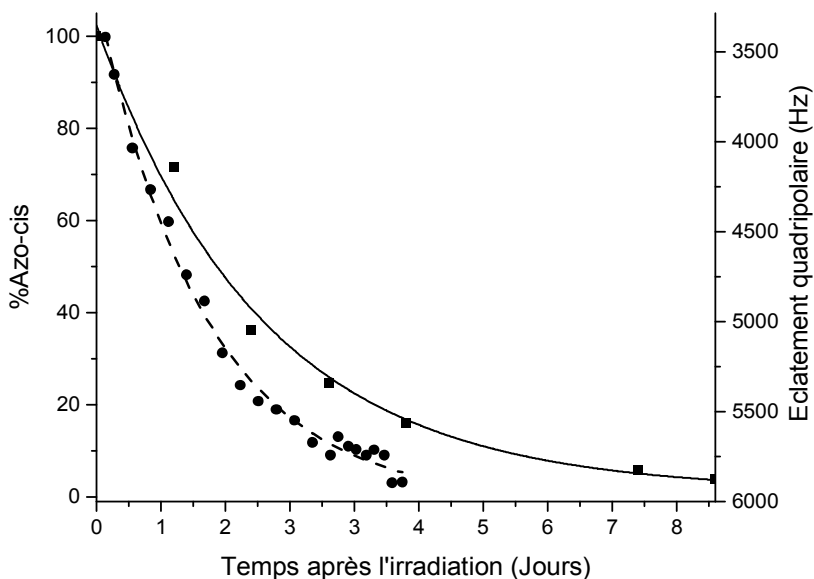


Figure 31 : Proportion d'azo sous forme cis dans le système SC/azo/PA : mesurée par spectrométrie UV-Vis (■), et estimée par la variation de $\Delta\nu_Q$ en ^2H -RMN du solide (●). Les courbes sont les régressions exponentielles liées à l'évolution de cette proportion dans les deux cas.

3.3.3. Conclusion partielle

Le spectre RMN du ^2H de l'acide palmitique perdeutééré dans des stérosomes porteurs d'azo présente un profil ne correspondant pas à celui d'un stérosome SC/PA en proportion 70/30. Cette différence peut être associée à la substitution de la moitié du PA par un dérivé d'azobenzène monoalkylé, qui perturbe l'ordre de la bicouche. Cette perturbation affecte toute la bicouche. L'azo sous forme cis accentue globalement cette perturbation par rapport à la forme trans.

Il ne faut pas oublier que l'effet perturbateur de l'azo sous ses formes trans et cis observé ici en 2H-RMN ne représente que celui de la moitié de la quantité d'azo utilisée pour les expériences présentées dans la partie 3.2, vu que la moitié a été substituée par du PA₃₁. Cependant les résultats présentés à la Figure 27 indiquent que la cinétique de libération des liposomes SC/azo 70/30 et SC/azo/PA 70/15/15 est plutôt semblable.

4. Conclusion et perspectives

Dans cette étude, nous avons étudié la distribution d'un médicament antitumoral, le SN-38, dans une population de micelles d'un copolymère tribloc PEG-PMMA-PnBMA par spectroscopie infrarouge à l'échelle nano. Une distribution homogène est un aspect important de ce type de formulation, pour assurer un traitement homogène. En comparant les spectres ATR de poudre de micelles vides, de SN-38 pur, de micelles avec SN-38 à 10 (p/p) % et d'un mélange de micelles vides et de SN-38 pur à 20 (p/p) %, nous avons identifié des longueurs d'onde nous permettant de repérer la présence de SN-38 dans le copolymère. L'évaporation d'une goutte de suspension aqueuse de micelles chargées crée un film de polymères et médicament. Nous avons sélectionné deux longueurs d'onde, l'une représentative du copolymère et du médicament, l'autre du médicament (majoritairement). En étudiant le rapport des intensités à ces longueurs d'onde sur une section de l'échantillon, nous avons identifié les extrêmes de ce rapport d'intensité. Deux spectres ont été mesurés sur les régions présentant ces extrêmes, et comparés : il n'y avait pas de différence significative entre eux. Ces deux spectres présentent un profil très semblable à celui de la poudre de micelles pleines. Avec les résultats obtenus ici, nous concluons que le procédé de fabrication de ces micelles chargées produit une distribution homogène de médicament dans la population de micelles, ce qui était l'objectif d'Altus Formulation, et un était de fait désirable pour une efficacité thérapeutique optimale de ces micelles.

Dans la deuxième partie du travail, dans le but de mieux comprendre le mécanisme et les facteurs influençant la libération d'une sonde provoquée par une perturbation de l'ordre de la bicouche de liposomes majoritairement composés de stérols, nous avons étudié les paramètres régissant la photolibération de SRB par illumination d'une suspension de liposomes de composition SC/azo 3/1 (mol/mol).⁶⁸ En illuminant ces stérosomes à 350 nm, on provoque

l'isomérisation trans - cis de l'azo. Pendant l'isomérisation, une libération rapide de SRB a lieu, et la présence d'azo-cis résultante augmente le taux de fuite passive. Illuminer ces stérosomes porteurs d'azo-cis à 450 nm provoque l'isomérisation cis-trans et une diminution de la fuite passive. La possibilité de contrôler la libération d'un composé, et qui plus est de pouvoir effectuer plusieurs libérations différées est une perspective très attirante dans nombre de domaines dont la médecine. La bicouche des stérosomes SC/azo est en phase *lo*. Nous avons étudié le comportement de l'azo en phase *ld* (liposomes POPC/azo). L'isomérisation trans-cis ou cis-trans de l'azo n'a aucun impact sur la fuite passive en phase *ld*. En phase *gel*, la fabrication de liposomes DPPC/azo chargés de SRB est très erratique, et il fut impossible d'étudier la photolibération de manière reproductible. Par spectroscopie d'absorption UV, nous avons suivi la cinétique d'isomérisation trans-cis dans ces trois phases. L'isomérisation est plus rapide en phase *ld* qu'en phase *lo*, et plus rapide en phase *lo* qu'en phase *gel*. Ces différences de vitesse indiquent que l'isomérisation de l'azo est influencée par la rigidité du milieu, en accord avec les conclusions sur des systèmes similaires.⁷⁶ Nous suggérons que la grande mobilité des lipides en phase *ld* permet l'accommodation des fonctions azobenzène en conformation cis. Nous suggérons que l'azo en conformation trans, plane⁶⁹, est plus facile à accommoder qu'en conformation cis, plus volumineuse. Ce serait le désordre généré par ces azo-cis qui augmenterait la perméabilité de la bicouche *lo*, plus rigide que la phase *ld*.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié par RMN solide du deutérium un système lipidique où la moitié de l'azo a été remplacée par de l'acide palmitique perdeutééré, SC/azo/PA₃₁ 3/0.5/0.5. Les spectres RMN de systèmes contenant de l'azo présentent un profil différent de celui d'un système SC/PA₃₁ 70/30.⁶⁴ Le signal de ce dernier est plus large, et présente quatre pics distincts pour les quatre premiers méthylènes. Les spectres des systèmes avec l'azo en conformation trans et cis sont plus étroits, indiquant un plus grand désordre dans

la bicouche^{93, 94} ; ce désordre est accentué par la présence d'azo-cis par rapport à l'azo-trans, car le spectre du système comportant de l'azo-cis est plus étroit que pour le système comportant de l'azo-trans. Nous avons étudié la cinétique de relaxation trans-cis de systèmes SC/azo/PA₃₁ 3/0.5/0.5 par RMN, via l'augmentation en fonction du temps de $\Delta\nu_Q$ des méthyles de PA, et par spectrométrie d'absorption UV, via l'augmentation de l'absorbance à 350 nm. Nous n'avons pas mesuré de différence significative entre les deux systèmes, en UV et en RMN. Ces résultats nous apportent des éclaircissements sur le mécanisme de perméabilisation de la bicouche de stérosomes par l'isomérisation d'un composé azo amphiphile.

Pour la suite, il serait intéressant de déterminer ce qui fait que la libération photo-induite de SRB n'est pas complète (~80 %, Figure 22 B) et que la libération diminue au fur et à mesure des photocycles (Figure 23 B). Pour ce faire, on pourrait observer l'évolution de la taille des stérosomes, par DLS par exemple, en fonction du nombre de photo-isomérisations. On pourrait alors déterminer s'il y a des stérosomes détruits, si les stérosomes fusionnent, etc. Pour imiter au mieux les conditions de libération, il faudrait pour cela que les stérosomes soient chargés, mais avec une sonde permettant de prendre des mesures par DLS ; donc, pas de la SRB. Une autre piste serait d'illuminer les stérosomes à des intensités différentes pour étudier les différences dans le comportement de photolibération. Cela pourrait permettre de différencier l'effet sur la perméabilité de l'isomérisation d'une part, et de l'azo en conformation cis de l'autre. Plus l'intensité est faible, plus ces deux phénomènes sont simultanés ; au contraire, plus l'intensité est élevée, plus ces deux phénomènes seront dissociés dans le temps.

Remerciements

Clara, mes parents et famille, pour leur soutien et leur confiance inaltérables.

Aysha, pour ses conseils.

Bibliographie

1. Bawarski, W. E., Chidlow, E., Bharali, D. J. & Mousa, S. A. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **4**, 273–282 (2008).
2. Riehemann, K. *et al.* Nanomedicine – challenge and perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **48**, 872–897 (2009).
3. Ferrari, M. Nanovector therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 343–346 (2005).
4. Matsumura, Y. & Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **46**, 6387–6392 (1986).
5. Kumari, A., Singla, R., Guliani, A. & Yadav, S. K. Nanoencapsulation for drug delivery. *EXCLI J.* **13**, 265 (2014).
6. Oliveira, H. *et al.* Magnetic field triggered drug release from polymersomes for cancer therapeutics. *J. Controlled Release* **169**, 165–170 (2013).
7. Yao, C. *et al.* Near-Infrared-Triggered Azobenzene-Liposome/Upconversion Nanoparticle Hybrid Vesicles for Remotely Controlled Drug Delivery to Overcome Cancer Multidrug Resistance. *Adv. Mater.* **28**, 9341–9348 (2016).
8. Beija, M., Salvayre, R., Lauth-de Viguier, N. & Marty, J.-D. Colloidal systems for drug delivery: from design to therapy. *Trends Biotechnol.* **30**, 485–496 (2012).
9. Chen, L.-T. & Weiss, L. The Role of the Sinus Wall in the Passage of Erythrocytes Through the Spleen. *Blood* **41**, 529–537 (1973).
10. Braet, F. *et al.* Contribution of high-resolution correlative imaging techniques in the study of the liver sieve in three-dimensions. *Microsc. Res. Tech.* **70**, 230–242 (2007).

11. Choi, H. S. *et al.* Renal Clearance of Nanoparticles. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1165–1170 (2007).
12. Horne, R. W., Bangham, A. D. & Whittaker, V. P. Negatively Stained Lipoprotein Membranes. *Nature* **200**, 1340–1340 (1963).
13. Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P. & Huang, L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* **268**, 235–237 (1990).
14. Nagaoka, T. *et al.* Characterization of bio-nanocapsule as a transfer vector targeting human hepatocyte carcinoma by disulfide linkage modification. *J. Controlled Release* **118**, 348–356 (2007).
15. Yu, D. *et al.* Engineered bio-nanocapsules, the selective vector for drug delivery system. *IUBMB Life* **58**, 1–6 (2006).
16. Galindo-Rodriguez, S., Allémann, E., Fessi, H. & Doelker, E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm. Res.* **21**, 1428–1439 (2004).
17. Dangé, C., Maincent, P. & Ubrich, N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *J. Controlled Release* **117**, 163–170 (2007).
18. Müller, R. H., Mäder, K. & Gohla, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 161–177 (2000).
19. Kesharwani, P. & Iyer, A. K. Recent advances in dendrimer-based nanovectors for tumor-targeted drug and gene delivery. *Drug Discov. Today* **20**, 536–547 (2015).
20. Gaucher, G. *et al.* Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J. Controlled Release* **109**, 169–188 (2005).

21. Kataoka, K., Harada, A. & Nagasaki, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 113–131 (2001).
22. Masayuki, Y. *et al.* Polymer micelles as novel drug carrier: Adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *J. Controlled Release* **11**, 269–278 (1990).
23. Adams, M. L. & Kwon, G. S. Relative aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B encapsulated by poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl-L-aspartamide)-acyl conjugate micelles: effects of acyl chain length. *J. Controlled Release* **87**, 23–32 (2003).
24. Harada, A. & Kataoka, K. Formation of Stable and Monodisperse Polyion Complex Micelles in Aqueous Medium from Poly(L-lysine) And Poly(Ethylene Glycol)-Poly(Aspartic Acid) Block Copolymer. *J. Macromol. Sci. Part A* **34**, 2119–2133 (1997).
25. Kataoka, K. *et al.* Spontaneous Formation of Polyion Complex Micelles with Narrow Distribution from Antisense Oligonucleotide and Cationic Block Copolymer in Physiological Saline. *Macromolecules* **29**, 8556–8557 (1996).
26. Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Suwa, S. & Kataoka, K. Introduction of cisplatin into polymeric micelle. *J. Controlled Release* **39**, 351–356 (1996).
27. Harada, A., Cammas, S. & Kataoka, K. Stabilized α -Helix Structure of Poly(L-lysine)-block-poly(ethylene glycol) in Aqueous Medium through Supramolecular Assembly. *Macromolecules* **29**, 6183–6188 (1996).
28. Yokoyama, M. Polymeric micelles as drug carriers: their lights and shadows. *J. Drug Target.* **22**, 576–583 (2014).
29. Reddy, B. P. K., Yadav, H. K. S., Nagesha, D. K., Raizaday, A. & Karim, A. Polymeric Micelles as Novel Carriers for Poorly Soluble Drugs--A Review. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **15**, 4009–4018 (2015).

30. Liu, J., Zeng, F. & Allen, C. Influence of serum protein on polycarbonate-based copolymer micelles as a delivery system for a hydrophobic anti-cancer agent. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **103**, 481–497 (2005).
31. Burt, H. M., Zhang, X., Toleikis, P., Embree, L. & Hunter, W. L. Development of copolymers of poly(D,L-lactide) and methoxypolyethylene glycol as micellar carriers of paclitaxel. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **16**, 161–171 (1999).
32. Jette, K. K., Law, D., Schmitt, E. A. & Kwon, G. S. Preparation and Drug Loading of Poly(Ethylene Glycol)-block-Poly(ϵ -Caprolactone) Micelles Through the Evaporation of a Cosolvent Azeotrope. *Pharm. Res.* **21**, 1184–1191
33. Thurmond II, K. B., Huang, H., Clark Jr, C. G., Kowalewski, T. & Wooley, K. L. Shell cross-linked polymer micelles: stabilized assemblies with great versatility and potential. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **16**, 45–54 (1999).
34. Ohno, R. *et al.* An early phase II study of CPT-11: a new derivative of camptothecin, for the treatment of leukemia and lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **8**, 1907–1912 (1990).
35. Redinbo, M. R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J. J. & Hol, W. G. J. Crystal Structures of Human Topoisomerase I in Covalent and Noncovalent Complexes with DNA. *Science* **279**, 1504–1513 (1998).
36. Stewart, L. A Model for the Mechanism of Human Topoisomerase I. *Science* **279**, 1534–1541 (1998).
37. Catimel, G. *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of irinotecan (CPT-11) administered daily for three consecutive days every three weeks in patients with advanced solid tumors. *Ann. Oncol.* **6**, 133–140 (1995).
38. Mathijssen, R. H. J. *et al.* Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Irinotecan (CPT-11). *Am. Assoc. Cancer Res.* **7**, 2182–2194 (2001).

39. Combes, O. *et al.* In vitro binding and partitioning of irinotecan (CPT-11) and its metabolite, SN-38, in human blood. *Invest. New Drugs* **18**, 1–5 (2000).
40. Anthony, L. Irinotecan toxicity. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* **1**, 35–39 (2007).
41. Yuan, F. *et al.* Mirovascular Permeability and Interstitial Penetration of Sterically Stabilized (Stealth) Liposomes in a Human Tumor Xenograft. *Cancer Res.* **54**, 3352–3356 (1994).
42. Koizumi, F. *et al.* Novel SN-38–Incorporating Polymeric Micelles, NK012, Eradicate Vascular Endothelial Growth Factor–Secreting Bulky Tumors. *Cancer Res.* **66**, 10048–10056 (2006).
43. Hamaguchi, T. *et al.* Phase I Study of NK012, a Novel SN-38–Incorporating Micellar Nanoparticle, in Adult Patients with Solid Tumors. *Am. Assoc. Cancer Res.* **16**, 5058–5066 (2010).
44. Carie, A. *et al.* IT-141, a Polymer Micelle Encapsulating SN-38, Induces Tumor Regression in Multiple Colorectal Cancer Models. *J. Drug Deliv.* **2011**, (2011).
45. Sapra, P. *et al.* Novel Delivery of SN38 Markedly Inhibits Tumor Growth in Xenografts, Including a Camptothecin-11–Refractory Model. *Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 1888–1896 (2008).
46. de Coupade, C. *et al.* Novel human-derived cell-penetrating peptides for specific subcellular delivery of therapeutic biomolecules. *Biochem. J.* **390**, 407–418 (2005).
47. Meyer-Losic, F. *et al.* DTS-108, A Novel Peptidic Prodrug of SN38: In vivo Efficacy and Toxicokinetic Studies. *Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 2145–2153 (2008).
48. Ebrahim, S., Peyman, G. A. & Lee, P. J. Applications of Liposomes in Ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.* **50**, 167–182 (2005).

49. Bozzuto, G. & Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* 975 (2015). doi:10.2147/IJN.S68861
50. Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 5577 (2012). doi:10.2147/IJN.S36111
51. Miller, C. R., Bondurant, B., McLean, S. D., McGovern, K. A. & O'Brien, D. F. Liposome-cell interactions in vitro: Effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry (Mosc.)* **37**, 12875–12883 (1998).
52. Batzri, S. & Korn, E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **298**, 1015–1019 (1973).
53. Bangham, A. D., De Gier, J. & Greville, G. D. Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals. *Chem. Phys. Lipids* **1**, 225–246 (1967).
54. Swaay, D. van & deMello, A. Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab. Chip* **13**, 752–767 (2013).
55. Dos Santos, N. *et al.* pH gradient loading of anthracyclines into cholesterol-free liposomes: enhancing drug loading rates through use of ethanol. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1661**, 47–60 (2004).
56. Torchilin, V. P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 813–827 (2014).
57. Landon, C. D., Park, J.-Y., Needham, D. & Dewhirst, M. W. Nanoscale Drug Delivery and Hyperthermia: The Materials Design and Preclinical and Clinical Testing of Low Temperature-Sensitive Liposomes Used in Combination with Mild Hyperthermia in the Treatment of Local Cancer. *Open Nanomedicine J.* **3**, 38–64 (2011).

58. Ward, M. A. & Georgiou, T. K. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers* **3**, 1215–1242 (2011).
59. Ta, T. & Porter, T. M. Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy. *J. Controlled Release* **169**, 112–125 (2013).
60. Yavlovich, A., Singh, A., Blumenthal, R. & Puri, A. A novel class of photo-triggerable liposomes containing DPPC:DC(8,9)PC as vehicles for delivery of doxorubicin to cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 117–126 (2011).
61. Rand, R. P., Parsegian, V. A., Henry, J. A. C., Lis, L. J. & McAlister, M. The effect of cholesterol on measured interaction and compressibility of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Can. J. Biochem.* **58**, 959–968 (1980).
62. Virden, J. W. & Berg, J. C. Sodium chloride-induced aggregation of dipalmitoylphosphatidylglycerol small unilamellar vesicles with varying amounts of incorporated cholesterol. *Langmuir* **8**, 1532–1537 (1992).
63. Liang, X., Mao, G. & Ng, K. Y. S. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. *J. Colloid Interface Sci.* **278**, 53–62 (2004).
64. Bastiat, G. & Lafleur, M. Phase behavior of palmitic acid/cholesterol/cholesterol sulfate mixtures and properties of the derived liposomes. *J. Phys. Chem. B* **111**, 10929–10937 (2007).
65. Bastiat, G., Oligier, P., Karlsson, G., Edwards, K. & Lafleur, M. Development of non-phospholipid liposomes containing a high cholesterol concentration. *Langmuir* **23**, 7695–7699 (2007).
66. Cui, Z.-K. & Lafleur, M. Lamellar self-assemblies of single-chain amphiphiles and sterols and their derived liposomes: Distinct compositions and distinct properties. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **114**, 177–185 (2014).

67. Cui, Z.-K. *et al.* Impact of interfacial cholesterol-anchored polyethylene glycol on sterol-rich non-phospholipid liposomes. *J. Colloid Interface Sci.* **428**, 111–120 (2014).
68. Cui, Z.-K. *et al.* Nonphospholipid fluid liposomes with switchable photocontrolled release. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **30**, 10818–10825 (2014).
69. Bandara, H. M. D. & Burdette, S. C. Photoisomerization in different classes of azobenzene. *Chem Soc Rev* **41**, 1809–1825 (2012).
70. Diau, E. W.-G. A new trans-to-cis photoisomerisation mechanism of azobenzene on the $S_1(n,\pi^*)$ surface. *J. Phys. Chem. A* **108**, 950–956 (2004).
71. Rau, H. Spectroscopic Properties of Organic Azo Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **12**, 224–235 (1973).
72. Zhang, Q. & Bazuin, C. G. Liquid crystallinity and other properties in complexes of cationic azo-containing surfactomesogens with poly(styrenesulfonate). *Macromolecules* **42**, 4775–4786 (2009).
73. Yager, K. G. & Barrett, C. J. Chapter 17. Azobenzene Polymers as Photomechanical and Multifunctional Smart Materials. in *Intelligent Materials* (eds. Shahinpoor, M. & Schneider, H.-J.) 424–446 (Royal Society of Chemistry, 2007).
74. Hartley, G. S. The Cis-form of Azobenzene. *Nature* **140**, 281–281 (1937).
75. Eisenbach, C. D. Effect of polymer matrix on the cis-trans isomerization of azobenzene residues in bulk polymers. *Makromol. Chem.* **179**, 2489–2506 (1978).
76. Shimomura, M. & Kunitake, T. Fluorescence and photoisomerization of azobenzene-containing bilayer membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5175–5183 (1987).
77. Zollinger, H. *Color Chemistry: Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments*. (John Wiley & Sons, 2003).

78. Merino, E. & Ribagorda, M. Control over molecular motion using the *cis* – *trans* photoisomerization of the azo group. *Beilstein J. Org. Chem.* **8**, 1071–1090 (2012).
79. Banghart, M., Borges, K., Isacoff, E., Trauner, D. & Kramer, R. H. Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat. Neurosci.* **7**, 1381–1386 (2004).
80. Angelos, S., Choi, E., Vögtle, F., De Cola, L. & Zink, J. I. Photo-Driven Expulsion of Molecules from Mesostructured Silica Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **111**, 6589–6592 (2007).
81. Schäfer, L. V., Müller, E. M., Gaub, H. E. & Grubmüller, H. Elastic Properties of Photoswitchable Azobenzene Polymers from Molecular Dynamics Simulations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 2232–2237 (2007).
82. Ferri, V. *et al.* Light-Powered Electrical Switch Based on Cargo-Lifting Azobenzene Monolayers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 3407–3409 (2008).
83. Leonenko, Z. V., Finot, E., Ma, H., Dahms, T. E. S. & Cramb, D. T. Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy. *Biophys. J.* **86**, 3783–3793 (2004).
84. Seelig, J. & Browning, J. L. General features of phospholipid conformation in membranes. *FEBS Lett.* **92**, 41–44 (1978).
85. Rawicz, W., Olbrich, K. C., McIntosh, T., Needham, D. & Evans, E. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* **79**, 328–339 (2000).
86. Cullis, P. R., Hope, M. J. & Tilcock, C. P. S. LIPID POLYMORPHISM AND THE ROLES OF LIPIDS IN MEMBRANES. *Chem. Phys. Lipids* **40**, 127–144 (1986).
87. Lewis, R. N. A. H. & McElhaney, R. N. Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1828**, 2347–2358 (2013).

88. Lindblom, G., Orädd, G. & Filippov, A. Lipid lateral diffusion in bilayers with phosphatidylcholine, sphingomyelin and cholesterol. An NMR study of dynamics and lateral phase separation. *Chem. Phys. Lipids* **141**, 179–184 (2006).
89. Filippov, A., Oradd, G. & Lindblom, G. The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers. *Biophys. J.* **84**, 3079–3086 (2003).
90. Filippov, A., Orädd, G. & Lindblom, G. Lipid Lateral Diffusion in Ordered and Disordered Phases in Raft Mixtures. *Biophys. J.* **86**, 891–896 (2004).
91. Lafleur, M., Bloom, M. & Cullis, P. R. Lipid polymorphism and hydrocarbon order. *Biochem Cell Biol* **68**, 1–8 (1989).
92. Paré, C. & Lafleur, M. Formation of liquid ordered lamellar phases in the palmitic acid/cholesterol system. *Langmuir* **17**, 5587–5594 (2001).
93. Lafleur, M., Cullis, P. R., Fine, B. & Bloom, M. Comparison of the orientational order of lipid chains in the La and HII phases. *Biochemistry (Mosc.)* **29**, 8325–8233 (1990).
94. Clarke, J. A., Heron, A. J., Seddon, J. M. & Law, R. V. The Diversity of the Liquid Ordered (Lo) Phase of Phosphatidylcholine/Cholesterol Membranes: A Variable Temperature Multinuclear Solid-State NMR and X-Ray Diffraction Study. *Biophys. J.* **90**, 2383–2393 (2006).
95. Q: How deep does the infrared light penetrate at the position of contact between the prism and sample during ATR measurements?: SHIMADZU (Shimadzu Corporation). SHIMADZU (Shimadzu Corporation) Available at: <http://www.shimadzu.com/an/ftir/support/faq/2.html>. (Accessed: 16th January 2017)
96. Anderson, M. S. Infrared Spectroscopy with an Atomic Force Microscope. *Appl. Spectrosc.* **54**, 349–352 (2000).
97. Hammiche, A. *et al.* Photothermal FT-IR Spectroscopy: A Step towards FT-IR Microscopy at a Resolution Better Than the Diffraction Limit. *Appl. Spectrosc.* **53**, 810–815 (1999).

98. Hammiche, A., Bozec, L., Pollock, H. M., German, M. & Reading, M. Progress in near-field photothermal infra-red microspectroscopy. *J. Microsc.* **213**, 129–134 (2004).
99. Polymers, composite fibers | Anasys Instruments. Available at: <https://www.anasysinstruments.com/application/polymers-afmir-nano-ftir/>. (Accessed: 28th June 2017)
100. Water absorption spectrum. Available at: http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_vibrational_spectrum.html#ir2. (Accessed: 16th January 2017)
101. Dufourc, E. J., Parish, E. J., Chitrakorn, S. & Smith, I. C. P. Structural and dynamical details of cholesterol-lipid interaction as revealed by deuterium NMR. *Biochemistry (Mosc.)* **23**, 6062–6071 (1984).
102. Kodati, R. V. & Lafleur, M. Comparaison between orientational and conformational orders in fluid lipid bilayers. *Biophys. J.* **64**, 163–170 (1993).
103. Sternin, E., Bloom, M. & Mackay, A. L. De-pake-ing of NMR spectra. *J. Magn. Reson.* **55**, 274–282 (1983).
104. Lafleur, M., Fine, B., Sternin, E., Cullis, P. R. & Bloom, M. Smoothed orientational order profile of lipid bilayers by ²H-nuclear magnetic resonance. *Biophys. J.* **56**, 1037–1041 (1989).
105. Chen, R. F. & Knutson, J. R. Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes : energy transfer to nonfluorescent dimers. *Anal. Biochem.* **172**, 61–77 (1988).
106. FT-IR spectrum of PMMA | Open-i. Available at: https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3244794_1556-276X-3-118-2&req=4. (Accessed: 23rd December 2016)

107. Trivedi, J. H., Thaker, M. D. & Trivedi, H. C. Photo-induced synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate) grafted sodium salt of partially carboxymethylated guar gum. *Chin. J. Polym. Sci.* **32**, 1690–1703 (2014).
108. Chen, S.-P. & Harn, P.-J. Crystalline polymorph of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. (2012).
109. Varnamkhasti, B. S. *et al.* Protein corona hampers targeting potential of MUC1 aptamer functionalized SN-38 core-shell nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **494**, 430–444 (2015).
110. Liu, Y. *et al.* Comparison of two self-assembled macromolecular prodrug micelles with different conjugate positions of SN38 for enhancing antitumor activity. *International Journal of Nanomedicine* (2015). Available at: <http://www.dovepress.com/secure-sci-hub.cc/comparison-of-two-self-assembled-macromolecular-prodrug-micelles-with-peer-reviewed-article-IJN>. (Accessed: 23rd December 2016)
111. Agafonov, A. *et al.* A permeability transition in liposomes induced by the formation of Ca²⁺/palmitic acid complexes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1609**, 153–160 (2003).
112. Agafonov, A. V. *et al.* Ca²⁺-Induced Phase Separation in the Membrane of Palmitate-Containing Liposomes and Its Possible Relation to Membrane Permeabilization. *J. Membr. Biol.* **215**, 57–68 (2007).
113. Pashkovskaya, A. *et al.* Light-Triggered Liposomal Release: Membrane Permeabilization by Photodynamic Action. *ResearchGate* **26**, 5726–33 (2009).
114. Moisenovich, M. M. *et al.* Novel Photosensitizers Trigger Rapid Death of Malignant Human Cells and Rodent Tumor Transplants via Lipid Photodamage and Membrane Permeabilization. *ResearchGate* **5**, e12717 (2010).

115. Sorochkina, A. I. *et al.* Peptide-induced membrane leakage by lysine derivatives of gramicidin A in liposomes, planar bilayers, and erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 2428–2435 (2013).
116. Song, X., Perlstein, J. & Whitten, D. G. Supramolecular Aggregates of Azobenzene Phospholipids and Related Compounds in Bilayer Assemblies and Other Microheterogeneous Media: Structure, Properties, and Photoreactivity¹. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 9144–9159 (1997).
117. Shimomura, M., Ando, R. & Kunitake, T. Orientation and Spectral Characteristics of the Azobenzene Chromophore in the Ammonium Bilayer Assembly. *Berichte Bunsenges. Für Phys. Chem.* **87**, 1134–1143 (1983).
118. Kuiper, J. M. & Engberts, J. B. F. N. H-Aggregation of Azobenzene-Substituted Amphiphiles in Vesicular Membranes. *Langmuir* **20**, 1152–1160 (2004).
119. Xiang, T.-X. & Anderson, B. D. Phase structures of binary lipid bilayers as revealed by permeability of small molecules. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1370**, 64–76 (1998).
120. Disalvo, E. A. & Simon, S. A. *Permeability and Stability of Lipid Bilayers*. (CRC Press, 1995).
121. Paré, C. & Lafleur, M. Formation of Liquid Ordered Lamellar Phases in the Palmitic Acid/Cholesterol System. *Langmuir* **17**, 5587–5594 (2001).
122. Donaldson, S. H., Lee, C. T., Chmelka, B. F. & Israelachvili, J. N. General hydrophobic interaction potential for surfactant/lipid bilayers from direct force measurements between light-modulated bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 15699–15704 (2011).
123. Benedini, L. A., Sequeira, M. A., Fanani, M. L., Maggio, B. & Doderio, V. I. Development of a Nonionic Azobenzene Amphiphile for Remote Photocontrol of a Model Biomembrane. *J. Phys. Chem. B* **120**, 4053–4063 (2016).

