

Université de Montréal

**Détermination de l'effet protecteur des liposomes non phospholipidiques à
haute teneur en cholestérol**

Par

Gustavo David Carbajal Romero

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

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

Novembre 2013

© Gustavo David Carbajal Romero, 2013

Résumé

Nous démontrons qu'il est possible de former des bicouches fluides non phospholipides en milieu aqueux avec un mélange d'acide palmitique (PA), cholestérol (Chol) et sulfate de cholestérol (Schol) avec une proportion molaire de 30/28/42. Ces liposomes non phospholipidiques peuvent maintenir un gradient de pH ($\text{pH}_{\text{interne}} 8 / \text{pH}_{\text{externe}} 6$) sur une période 100 fois plus longue que les liposomes faits de 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC) et de cholestérol (60/40 mol/mol). De plus, ces LUV non phospholipidiques protègent l'acide ascorbique d'un milieu oxydant (1 mM de fer (III)). Une fois piégé dans les liposomes, l'acide ascorbique présente une vitesse de dégradation similaire à celle obtenue en l'absence de fer(III). Ces performances illustrent la perméabilité exceptionnellement limitée de ces liposomes, ce qui implique qu'ils peuvent présenter des avantages comme nanocontenants pour certaines applications. D'autre part, des vésicules unilamellaires géantes (GUV pour *Giant Unilamellar Vesicles*) ont été formées à partir d'un mélange d'acide palmitique et de cholestérol (30/70 mol/mol). Ces GUV sont stables sur l'échelle de temps de semaines, elles ne s'agrègent pas et elles sont sensibles au pH. Afin d'établir la formation des GUV, l'imagerie par microscopie confocale à balayage laser a été utilisée. Deux sondes fluorescentes ont été utilisées: le rouge du Nile, une sonde hydrophobe qui s'insère dans le cœur hydrophobe des bicouches lipidiques, et la calcéïne, une sonde hydrophile qui a été emprisonné dans le réservoir interne des GUV. Cette approche a permis l'observation des parois des GUV ainsi que de leur contenu. Ces résultats montrent la possibilité de former de

nouveaux microcontenants à partir d'un mélange d'un amphiphile monoalkylé et de stérol.

Mots-clés : nanovecteurs, liposomes, stérol, amphiphile monoalkylé, perméabilité, gradient de pH, acide ascorbique, fluorescence, vésicules unilamellaires géantes.

Abstract

First, we demonstrate that it is possible to form non-phospholipid fluid bilayers in aqueous milieu with a mixture of palmitic acid (PA), cholesterol (Chol), and cholesterol sulfate (Schol) in a molar proportion of 30/28/42. These non-phospholipid liposomes can sustain a pH gradient ($\text{pH}_{\text{internal}} 8 / \text{pH}_{\text{external}} 6$) 100 times longer than LUVs made of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) and cholesterol (60/40 mol/mol). These non-phospholipid LUVs are shown to protect ascorbic acid from an oxidizing environment (1 mM Iron (III)). Once entrapped in these liposomes, ascorbic acid displays a degradation rate similar to that obtained in the absence of Iron (III). This ability illustrates the exceptionally limited permeability of these liposomes, indicating that they can present advantages as nanocontainers for some applications. Second, Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) were formed from a mixture of palmitic acid and cholesterol (30/70 mol/mol). These GUVs were stable over weeks, did not aggregate, and were pH-sensitive. In order to establish their formation, confocal laser scanning microscopy imaging was carried out. Two fluorescent probes were used: Nile Red, a hydrophobic probe that inserted in the hydrophobic core of lipid bilayers, and calcein, a hydrophilic probe that was trapped in the GUV internal pool. This approach allowed observation of both the walls of the GUVs as well as their entrapped content. These results show the possibility to form novel microcontainers from a mixture of a monoalkylated amphiphile and sterols.

Keywords : nanovectors, liposomes, sterol, single-chain amphiphile, permeability, pH gradient, ascorbic acid, fluorescence, giant unilamellar vesicles.

Table des matières

	Résumé.....	i
	Abstract.....	iii
	Table de matières.....	iv
	Liste de tableaux.....	vii
	Liste de figures.....	viii
	Liste des abréviations et des symboles.....	xii
	Dédicace.....	xiv
	Remerciements.....	xv
	Chapitre 1	1
1	Introduction	1
1.1	Physico-chimie des amphiphiles.....	3
	L'effet du cholestérol dans la membrane.....	9
1.2	Les stérosomes.....	11
1.3	Types de liposomes.....	16
	Méthodes de préparation.....	18
1.4	Les stérosomes comme nanocontenants.....	21
1.4.1	Gradient du pH.....	21
1.4.2	L'acide ascorbique (AA)	26
	Protection de l'AA.....	28
	Description du projet.....	31

	Chapitre 2	33
	Introduction	33
2.1	Matériel et méthodes.....	33
	Produits chimiques.....	33
	Méthode.....	34
	Préparation de liposomes contenant de l'acide ascorbique.....	34
2.2	Étude de la protection de l'acide ascorbique d'un environnement oxydant.....	35
	Dosage de cholestérol	38
	Préservation du gradient de pH.....	40
2.3	Résultats.....	42
2.3.1.	Stabilité de l'acide ascorbique.....	42
2.3.2.	Préservation du gradient du pH.....	46
2.4.	Discussion.....	54
	Chapitre 3	57
	Introduction	57
3.1	Matériel et méthodes.....	57
	Produits chimiques.....	57
	Méthode.....	58
	Préparation de vésicules unilamellaires géantes.....	58
	Microscopie de contraste de phase.....	59

	Microscopie confocale à balayage laser (MCBL)	60
3.2	Résultats et discussion.....	61
	Formation de GUV.....	61
	Sensibilité au pH.....	69
3.3	Conclusion.....	72
	Chapitre 4	73
	Conclusion générale.....	73
	Bibliographie.....	76

Liste des tableaux

Table 2.1	Effet protecteur de liposomes et stabilité de l'acide ascorbique en présence d'ion Fe^{3+}	46
------------------	---	----

Liste des figures

Figure 1.1	Structure de l'acide gras, des phospholipides et des stérols utilisés dans ce mémoire.....	3
Figure 1.2	Structures d'agrégats lipidiques lamellaires et non lamellaires formés dans l'eau et le facteur de forme (FF) correspondant.....	8
Figure 1.3	Représentation schématique à l'échelle d'une GUV de 10 μm et d'une LUV de 100 nm.....	18
Figure 1.4	Représentation schématique de la formation de GUV avec la méthode à double émulsion. A. L'émulsion double formée par sonication. B. Le solvant est progressivement éliminé à pression réduite et la couche organique est de plus en plus mince avec le temps. C. La bicouche de la GUV est formée.....	20
Figure 1.5	Forme protonée et déprotonée du HPTS.....	26
Figure 1.6	L'oxydation de l'ascorbate commence par la perte d'un électron et d'un proton pour produire le radical ascorbate. La perte d'un autre électron conduit à la formation d'une molécule complètement oxydée, l'acide déshydroascorbique (DHA)	27
Figure 2.1	Oxydation de l'acide ascorbique par le Fe^{3+} . La phénanthroline réagit avec le Fe^{2+} et produit la ferroïne qui absorbe à 510 nm.....	37
Figure 2.2	Courbe de calibration d'acide ascorbique.....	38

Figure 2.3	Courbe de calibration de cholestérol.....	39
Figure 2.4	Protection de l'acide ascorbique par son encapsulation dans les liposomes. Les symboles pleins et vides représentent respectivement la présence ou l'absence d'ions Fe ³⁺ dans le milieu externe. Les profils de dégradation sont obtenus pour l'acide ascorbique libre en solution (les triangles) ou encapsulé dans des liposomes de PA/Chol/Schol (les cercles), ou de POPC/Chol (les carrés). Les expériences ont été faites à (A) 4°C et à (B) température de la pièce. n = 3 pour les LUV de PA/Chol/Schol et n = 1 pour le contrôle POPC/Chol.....	45
Figure 2.5	Le spectre d'excitation du HPTS à différents pH (directement indiqués dans la figure). Longueur d'onde d'émission=510 nm. HPTS, 20 nM dans le tampon MES/TRIS/NaCl/EDTA. La sonde était initialement encapsulée dans des LUV de composition PA/Chol/Schol 30/28/42 puis libérée par l'addition de Triton X-100.....	47
Figure 2.6	Le spectre d'émission du HPTS à différents pH. Longueur d'onde d'excitation=450 nm. HPTS 20 nM dans le tampon MES/TRIS/NaCl/EDTA. La sonde était initialement encapsulée dans des LUV de composition PA/Chol/Schol 30/28/42 puis libérée par l'addition de Triton X-100	48
Figure 2.7	Courbes de calibration pour le HPTS. Excitation: 450 et 415 nm. Émission: 510 nm.....	51
Figure 2.8	Dissipation du gradient du pH. Liposomes de PA/Chol/Schol (●) et POPC/Chol (■). pH(externe) = 8 et pH(interne) initial = 6.....	53

Figure 3.1	Image de GUV de PA/Chol obtenue par microscopie de contraste de phase. Des GUV (GUV) et des gouttelettes de solvant (S) sont identifiées sur l'image.	62
Figure 3.2	Images de MCBL des GUV de POPC/POPG/Chol à pH 8.3 GUV de POPC/POPG/Chol avec calcéine (GUV) et GUV vides (V). GUV allongées (B) et oligolamellaires (O). Gouttelettes de solvant (S).....	64
Figure 3.3	Image de MCBL d'un échantillon de GUV préparées avec le mélange PA/Chol, à pH 8.3. Rouge du Nil (le canal rouge) et calcéine (le canal vert), Sur l'image ont été identifiées quelques GUV (GUV), vésicules multilamellaires (M) et gouttelettes de solvant (S).....	66
Figure 3.4	Images de MCBL A) GUV de PA/Chol et B) de POPC/POPG/Chol.....	67
Figure 3.5	Images d'épifluorescence de GUV de PA/Chol à pH 8.4. Le canal rouge correspond aux parois marquées avec le rouge du Nil et le canal vert, à la calcéine encapsulée à l'intérieur des vésicules. L'image à gauche est obtenue par la superposition des deux images de droite. Les barres d'échelle correspondent à 10 µm.....	68
Figure 3.6	Comportement d'une GUV de PA/Chol en fonction du pH observé par microscopie de contraste de phase. La barre d'échelle représente 10 µm...	70

Figure 3.7 Images de MCBL de variation du pH pour une GUV de PA / Chol. La membrane de la GUV est marquée avec le rouge du Nil en rouge et le canal vert correspond à la calcéine dans l'intérieur de la GUV. La barre d'échelle représente 10 μm 71

Liste des abréviations et des symboles

λ_{em}	onde d'émission
λ_{exc}	onde d'excitation
AA	acide ascorbique
A_H	section efficace occupé par la partie hydrophobe
A_o	section efficace occupée par la tête polaire
CAC	concentration d'agrégation critique
calcéine	3,6-dihydroxy-2,3-bis[N,N'-di(carboxyméthyl)-aminométhyl]fluorane
Chol	cholestérol
CMC	concentration micellaire critique
DPPE	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
FF	facteur de forme
GUV	vésicules unilamellaires géantes
HPTS	8-hydroxy-pyrène-1,3,6-trisulfonate de trisodium
l	longueur de la chaîne acyle
l_o	phase liquide-ordonnée
LUV	larges vésicules unilamellaires
L_α	phase liquide-cristalline
L_β	phase solide-ordonnée
MCBL	microscopie confocale à balayage laser
MES	acide 2-[N-morpholino] éthanesulfonique

MLV	vésicules multilamellaires
PA	acide palmitique
PC	phosphatidylcholine
PG	phosphatidylglycérol
P_{H^+}	coefficient de perméabilité au H^+
pH_i	pH interne
P_{Na^+}	coefficient de perméabilité du Na^+
POPC	1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
POPG	1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylglycérol
PVC	chlorure de polyvinyle
rouge de Nil	9-(diéthylamino)-benzo[a]phénoxazin-5(5H)-one
SC	stratum corneum
Schol	sulfate de cholestérol
SUV	petites vésicules unilamellaires
$t_{1/2}$	temps au bout duquel la concentration tombe à la moitié de sa valeur initiale
TRIS	tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
Triton X-100	polyéthylène glycol p-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)-phényl éther
w/o/w	eau/huile/eau

*À ma femme, Cristina et à mes enfants,
Fernando et Valeria*

Remerciements

Mes remerciements sincères s'adressent tout particulièrement à mon directeur de recherche Michel Lafleur. Il a été la grande source d'inspiration, ses conseils et ses suggestions, ainsi que son encouragement, tant au niveau de la recherche que de la rédaction m'ont été très précieux et sans son aide ce projet n'aurait pas été possible. Merci de me faire partie du développement des stérosomes. Merci infiniment, Michel.

Un grand merci aux membres du groupe Lafleur pour leurs aides efficaces, spécialement à Cui pour ses conseils et commentaires et à Nicolas pour sa bonne volonté et son aide avec le microscope confocale à balayage laser.

Finalement, un très grand merci à ma femme qui me supporte et m'apporte tout son amour. Merci de m'avoir accompagné au Québec dans cette aventure remplie de défis. Merci pour ton aide, ta patience et ton soutien sans faille.

Chapitre 1

1. Introduction

Les liposomes sont des nanocontenants faits de lipides principalement utilisés pour protéger et transporter des solutés hydrophiles et/ou hydrophobes. Ils sont utilisés dans différents domaines incluant l'industrie pharmaceutique (Torchilin 2005, Karanth et al., 2007, Knop et al., 2010), cosmétique (Guenin et al., 1994, Dubey et al., 2007, Nohynek et al., 2007), alimentaire (Gibbs et al., 1999, Mozafari et al., 2006, Luykx et al., 2008) et agricole (Taylor et al., 2005). Les liposomes s'inspirent des membranes biologiques et ils sont généralement constitués de phospholipides. Au cours des 10 dernières années, notre groupe de recherche a apporté une contribution originale en créant des liposomes non phospholipidiques qui présentent un potentiel intéressant pour diverses applications (Cui et al., 2014). Ces nouveaux systèmes sont constitués d'un mélange d'un amphiphile monoalkylé et d'un stérol. Ils possèdent une haute teneur en stérol, entre 50 et 75 (mol/mol)%, et pour cette raison ils sont appelés stérosomes. La forte teneur en stérol entraîne une très grande imperméabilité de stérosomes à cause de l'ordre élevé qu'elle génère dans le cœur hydrophobe de la bicouche fluide. Malgré la forte proportion de stérol, les bicouches formées par ces mélanges sont suffisamment flexibles pour être extrudées et produire des liposomes unilamellaires (LUV pour *Large Unilamellar Vesicles*) en utilisant des techniques classiques d'extrusion.

Le premier volet de la présente étude porte sur la démonstration de la faible perméabilité des stérosomes. Le système utilisé est un mélange d'acide palmitique (PA), de cholestérol (Chol) et de sulfate de cholestérol (Schol) avec une composition molaire PA/Chol/Schol équivalente à 30/28/42. Selon des études réalisées précédemment dans notre groupe de recherche (Bastiat et al., 2007), ces stérosomes devraient être stables sur une large gamme de pH. Pour démontrer l'imperméabilité élevée de ces stérosomes, deux approches différentes ont été utilisées. La première consistait à étudier la stabilité d'un gradient de pH à travers la bicouche lipidique. Il est bien connu que les liposomes de phospholipides ont une perméabilité relativement élevée aux protons par rapport aux petits ions comme le sodium ou le potassium (Biegel et al., 1981, Clement et al., 1981). Le maintien d'un gradient de pH entre l'intérieur et l'extérieur d'un liposome est un défi et permet de démontrer la perméabilité réduite des stérosomes. La deuxième approche a été d'évaluer l'effet protecteur des liposomes pour l'acide ascorbique dans un environnement fortement oxydant. L'acide ascorbique est une vitamine qui est facilement dégradable en présence d'oxygène. Il est également connu qu'il est rapidement oxydé par les ions de Fe^{3+} et le Cu^{2+} (Kirby et al., 1991, Wechtersbach et al., 2012). Sa protection est importante dans l'industrie alimentaire (Steskova et al., 2006, Abbas et al., 2012).

Le second volet de cette recherche traite de la possibilité de faire des vésicules unilamellaires géantes (GUV pour Giant Unilamellar Vesicles) à partir d'acide palmitique et cholestérol avec une composition molaire PA/Chol de 30/70. Ce mélange a été largement étudié précédemment par notre groupe de recherche et il a été montré qu'il forme des bicouches fluides qui mènent à des LUV. Nous voulons

examiner si le système peut aussi former des GUV. De plus, le mélange PA/Chol est sensible au pH (Paré et al., 2001, Ouimet et al., 2003, Bastiat et al., 2007, Bastiat et al., 2007). Lorsque le pH du milieu est amené près et en dessous du pK_a apparent de l'acide palmitique dans la bicouche, la protonation d'une fraction importante de l'acide provoque une déstabilisation de la membrane conduisant à la libération du contenu intravésiculaire. Nous avons examiné si les GUV produites conservaient cette sensibilité au pH.

1.1 Physico-chimie des amphiphiles

Généralités (Israelachvili 1991, Cullis et al., 1996, Mouritsen 2005)

La plupart des lipides sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie polaire hydrophile (tête polaire) et d'une partie apolaire hydrophobe (chaînes aliphatiques). La figure 1.1 montre la structure de l'acide gras, des stérols et des phospholipides utilisés dans les travaux de ce mémoire.

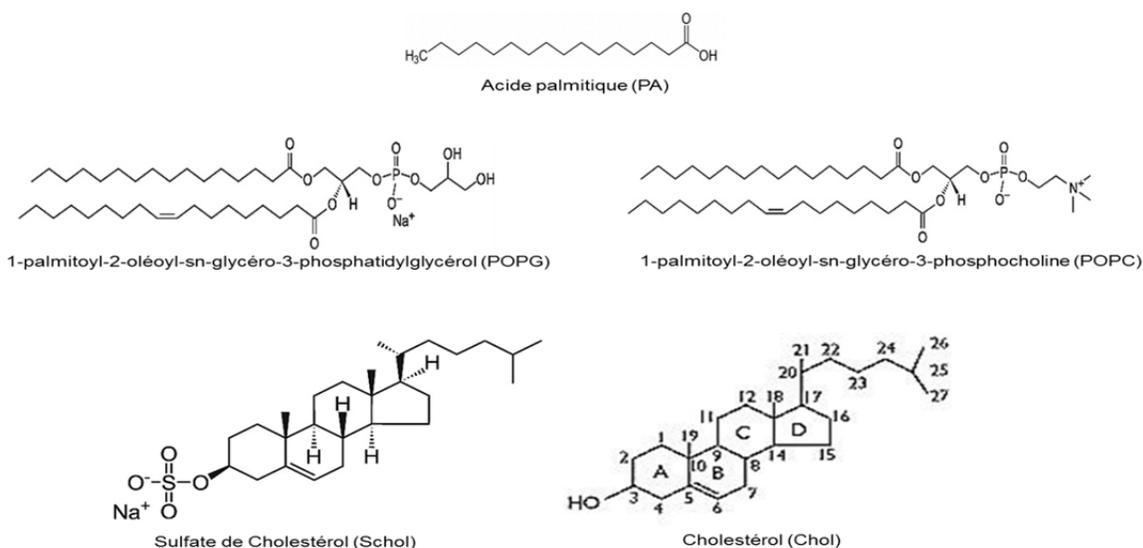


Figure 1.1. Structure de l'acide gras, des phospholipides et des stérols utilisés dans ce mémoire.

Parmi les lipides les plus abondants des membranes cellulaires, on retrouve les phospholipides. Ces molécules possèdent un groupement phosphate auquel est greffé un groupe fonctionnel qui distingue les différents phospholipides. Dépendant du substituant, on retrouve, entre autres, la phosphatidylcholine (PC) et le phosphatidylglycérol (PG). La PC peut représenter jusqu'à 60% des phospholipides des membranes biologiques (Vandeenen et al., 1982). Nous pouvons remarquer que la 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC) est neutre (zwitterionique) et le 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylglycérol (POPG) est chargé négativement (figure 1.1). Les phospholipides présents dans la membrane cellulaire ont généralement deux chaînes acyles différentes dont une est saturée et l'autre, insaturée. La double liaison de la chaîne insaturée possède une configuration "cis" et introduit un coude rigide dans la chaîne hydrocarbonée. Cette anomalie dans la partie hydrophobe rend la membrane moins imperméable.

Une autre famille importante de lipides est les stéroïls. Le cholestérol est le principal membre de cette famille. Sa structure, relativement différente de celles des phospholipides, comprend un simple groupe hydroxyle (-OH) en tant que tête polaire et un squelette stéroïde rigide auquel est greffé une chaîne hydrocarbonée sur le carbone C-17 (figure 1.1). Le squelette stéroïde est composé de quatre anneaux, dont trois cycles à six carbones et un autre à cinq. Les anneaux sont reliés via la configuration trans en créant une structure plane et rigide qui caractérise le cholestérol et la plupart de ses analogues. Deux groupements méthyle, C18 et C19, sont greffés aux positions 10 et 13, dans une orientation cis. En raison de ce qui

précède, le système cyclique de cholestérol a un côté plan sans aucun substituant et un côté irrégulier avec deux groupements méthyle (Rog et al., 2009).

Les acides gras sont les éléments constitutifs de plusieurs lipides dans les organismes vivants. Ils possèdent un groupe carboxylique avec une chaîne aliphatique saturée ou insaturée (figure 1.1). Les acides gras libres sont rarement trouvés dans les membranes cellulaires. Par contre, ils forment entre 7 et 13 % (p/p) de la phase lipidique du stratum corneum (SC), la couche la plus externe de la peau. Dans cet organe, ils sont saturés et possèdent entre 16 et 28 atomes de carbone, les plus abondants étant ceux avec 22 et 24 carbones (Norlén et al., 1998, Arseneault et al., 2007).

La plupart des lipides amphiphiles ont la propriété fondamentale de s'auto-assembler spontanément en milieu aqueux pour former différentes structures. Ainsi, ils s'organisent de façon à minimiser les interactions entre l'eau et les chaînes acyles (effet hydrophobe) tandis que les domaines polaires interagissent avec les molécules d'eau (via des liaisons hydrogène, interactions dipôle-dipôle, etc.). La concentration d'amphiphile joue un rôle important dans la formation d'auto-assemblages. À faibles concentrations, les amphiphiles se trouvent sous la forme de monomères. Au fur et à mesure que leur concentration augmente, la concentration en monomère augmente jusqu'à ce qu'elle atteigne un point où elle est constante. C'est ce qu'on appelle la concentration micellaire critique (CMC) ou concentration d'agrégation critique (CAC). L'ajout de plus d'amphiphiles mène alors à la formation d'agrégats produits par auto-assemblage, coexistant avec une concentration constante de monomères. L'agrégation des lipides en milieu aqueux peut former diverses structures telles que

les micelles, les bicouches et les phases hexagonales. La géométrie de l'auto-assemblage peut être prédite à partir du modèle d'Israelachvili (Israelachvili 1991). Elle dépend du facteur de forme (FF), donné par: $FF = \frac{V}{A_o * l}$ où V est le volume spécifique occupé par la partie hydrophobe, A_o est la section efficace occupée par la tête polaire et l est la longueur de la chaîne acyle. La figure 1.2 illustre la relation entre le paramètre de forme et l'architecture de l'auto-assemblage lipidique. De manière analogue, le FF peut aussi être défini à partir de A_H , qui est la section efficace occupée par la partie hydrophobe (Cullis et al., 1986). Lorsque $A_o > A_H$, la molécule lipidique présente une forme conique favorisant la formation de micelles sphériques; le FF est alors inférieur à 1/3. C'est généralement le cas des amphiphiles ne possédant qu'une seule chaîne, comme les acides gras. Si $A_o = A_H$, la molécule possède une géométrie dite cylindrique; lorsque $0.5 < FF \leq 1$, les amphiphiles forment des bicouches. Les phospholipides à double chaîne comme la POPC et le POPG possèdent une forme cylindrique. Lorsque $A_o < A_H$, ou $FF > 1$, la formation de phases inversées est favorisée. Par conséquent, le facteur de forme d'un lipide est une façon de décrire sa capacité à former une bicouche lipidique. Le facteur de forme peut varier avec la température, le pH, le degré d'insaturation de la chaîne alkyle, la longueur de chaîne et la taille efficace de la tête polaire (qui peut être influencée, par exemple, par l'addition d'ions qui font écran aux charges de la tête polaire). Des changements au niveau de ces paramètres peuvent produire différentes phases et modifier les interactions entre les agrégats (Israelachvili 1991). Dans le cadre de ce mémoire, nous nous limiterons à l'étude des bicouches (figure 1.2).

La bicouche lipidique peut être considérée comme deux monocouches associées par leurs faces non polaires, avec les parties polaires en contact avec l'eau. Les extrémités de cette bicouche ne peuvent pas être en contact avec le milieu aqueux à cause de l'effet hydrophobe. Les bicouches lipidiques se replient donc pour former des vésicules multilamellaires (MLV pour *Multilamellar Vesicles*). Les MLV peuvent être transformées en vésicules unilamellaires à l'aide de différentes méthodes qui seront décrites plus loin. Ces vésicules unilamellaires sont utilisées comme modèles de membranes cellulaires.

Un lipide pur est caractérisé par sa température de transition entre la phase solide-ordonnée (ou gel) et la phase liquide-désordonnée (ou liquide-cristalline). Il faut noter que l'ordre fait référence à la conformation des chaînes acyles tandis que la fluidité (solide ou liquide) fait référence au degré de liberté de translation (diffusion) des lipides. La phase solide-ordonnée (L_{β}) se caractérise par un coefficient de diffusion latérale relativement faible, soit $<10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Almeida et al., 1992). Dans cette phase, les chaînes sont très ordonnées et possèdent une organisation cristalline ou presque cristalline. Les liens C-C des chaînes sont en conformation trans (anti), maximisant les interactions de van der Waals et impliquant un empilement compact des chaînes. Au-dessus de la température de transition, la phase liquide-cristalline (L_{α}) se caractérise par une augmentation considérable du coefficient de diffusion latérale, $\sim 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Almeida et al., 1992). Dans cette phase, les chaînes sont plus désordonnées, contenant des liens C-C en conformation gauche (syn). Ce désordre plus élevé conduit à une longueur effective plus courte et donc à une diminution de l'épaisseur de la bicouche.

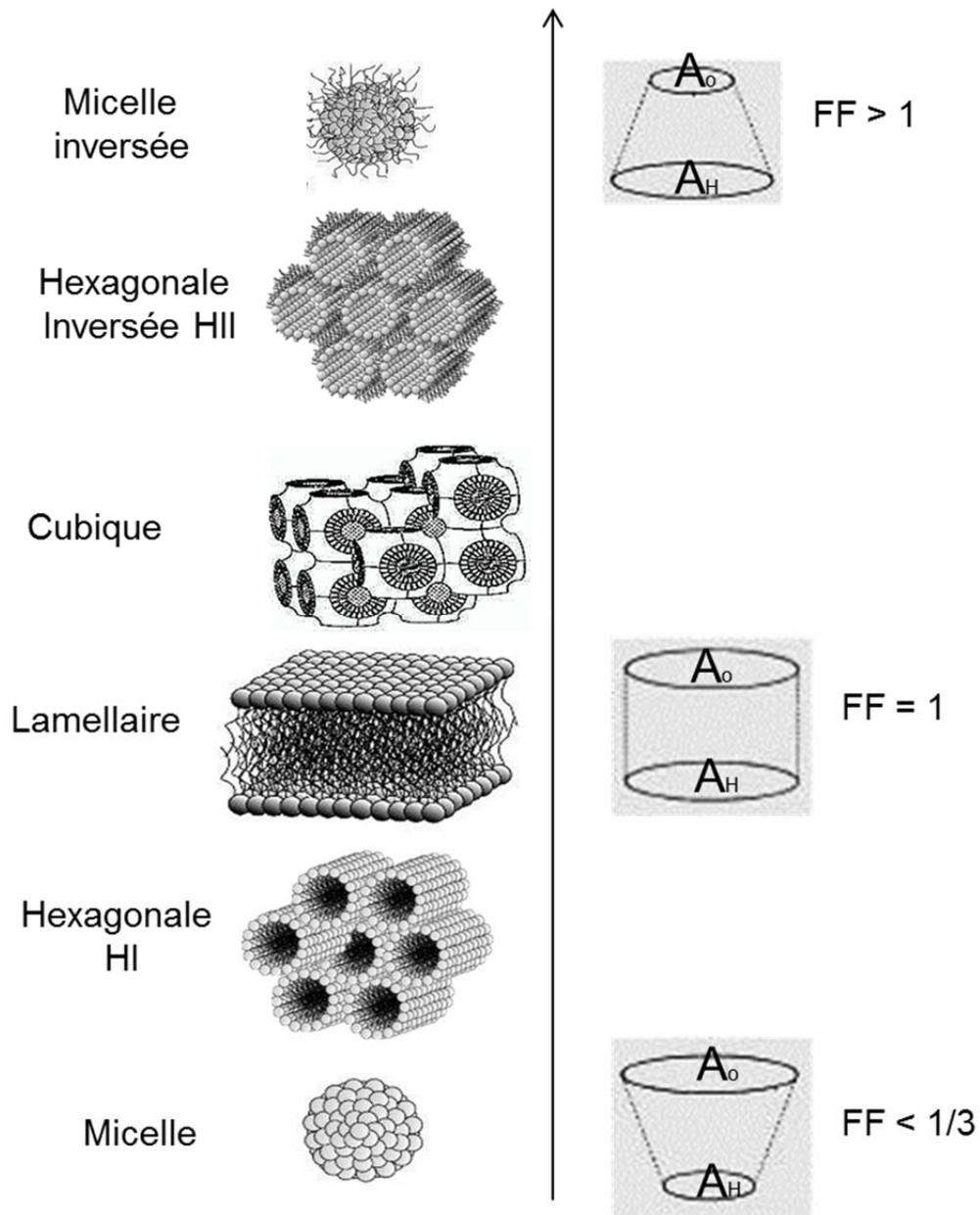


Figure 1.2. Structures d'agrégats lipidiques lamellaires et non lamellaires formés dans l'eau et le facteur de forme (FF) correspondant (Mouritsen 2011).

L'effet du cholestérol dans la membrane

Comme mentionné auparavant, le cholestérol possède un groupe hydrophile –OH et un squelette stéroïde constituant une partie hydrophobe (figure 1.1). Il est un amphiphile qui peut être incorporé dans la bicouche. Il s'aligne généralement parallèle à la normale de la bicouche, le groupe hydroxyle étant placé au niveau de l'interface (Kessel et al., 2001, Paré et al., 2001, Ouimet et al., 2004, Harroun et al., 2006, Rog et al., 2009). Cette orientation déterminée pour des membranes modèles est similaire à celle observée dans les membranes de globules rouges (Kelusky et al., 1983). Il est bien connu que lorsque le cholestérol est incorporé dans les bicouches phospholipidiques, il conduit à la formation de la phase liquide-ordonnée (lo) (Vist et al., 1990, McMullen et al., 1995, Paré et al., 2001, Filippov et al., 2003, Filippov et al., 2007, Saito et al., 2011). Cette phase est intermédiaire entre la phase solide-ordonnée et la phase liquide-désordonnée. Dans la phase lo, le coefficient de diffusion latérale des lipides est semblable à celui observé dans la phase liquide-désordonnée ($\sim 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) (Vist et al., 1990, Filippov et al., 2003, Filippov et al., 2007). Cependant, les chaînes des lipides sont ordonnées, de conformation majoritairement trans (anti), comme dans la phase solide-ordonnée. Par conséquent, la présence de cholestérol dans la membrane conduit à la formation d'une bicouche plus épaisse et rigide que dans la phase L_{α} tout en conservant son caractère fluide. La dualité ordre/fluidité associée au cholestérol pourrait être expliquée d'une part, par sa partie hydrophobe qui possède une structure plane et rigide favorisant l'ordre des chaînes acyles adjacentes qui s'étirent pour maximiser les interactions de van der Waals. D'autre part, avec sa taille et sa forme particulière, le cholestérol ne s'empile

pas parfaitement avec les chaînes aliphatiques des phospholipides. Cet effet, semblable à celui d'une impureté, empêche la formation d'une structure hautement ordonnée et favorise une phase fluide. En conclusion, le cholestérol a un effet ambivalent remarquable sur les membranes : il favorise une membrane rigide, épaisse et moins perméable que la phase liquide-désordonnée, tout en retenant la fluidité des lipides nécessaire pour le fonctionnement biologique.

Le Schol est un analogue naturel du cholestérol. La structure du Schol est semblable à celle du cholestérol à la différence du groupe sulfate (figure 1.1). Ce dernier possède un pK_a de ~ 3.3 (Strott et al., 2003). Malgré leur grande similitude de structure moléculaire, ils ont des fonctions différentes dans les systèmes biologiques (Faure et al., 1997). Le couple Chol/Schol est trouvé dans diverses membranes (Strott et al., 2003, Eberlin et al., 2010), incluant la membrane des spermatozoïdes (Langlais et al., 1981), le SC (Arseneault et al., 2007) et la membrane d'érythrocytes (Muskiel et al., 1983). La modification du rapport Chol/Schol mène à une réduction d'efficacité de fécondation des spermatozoïdes (Langlais et al., 1981) ou influence le processus naturel de desquamation de la peau (Arseneault et al., 2007).

Le Schol dans la bicouche conduit aussi à la formation de phases lamellaires lo (Faure et al., 1996, Bastiat et al., 2007). Sa position est similaire à celle de cholestérol (Faure et al., 1997, Smondyrev et al., 2000, Bastiat et al., 2007, Ko et al., 2012). La substitution du cholestérol par le Schol génère une plus grande perméabilité (Faure et al., 1996, Bastiat et al., 2007); Schol ordonne moins les chaînes acyles par rapport au cholestérol (Faure et al., 1996, Bastiat et al., 2007). Ce

dernier effet peut être expliqué par l'augmentation de l'aire interfaciale efficace du Schol par rapport au cholestérol, augmentation due aux effets stériques, à la répulsion électrostatique et à une meilleure hydratation du groupe sulfate (Faure et al., 1996, Faure et al., 1997, Smondyrev et al., 2000).

1.2 Les stérosomes (Cui et al., 2014)

Les stérosomes sont le nom donné dans notre groupe aux liposomes formés à partir des divers amphiphiles monoalkylés non phospholipidiques et un stérol en forte proportion. Ce type de liposomes a été découvert par notre groupe de recherche. (Paré et al., 2001, Ouimet et al., 2003, Ouimet et al., 2004, Bastiat et al., 2007, Bastiat et al., 2007, Cui et al., 2010, Cui et al., 2010, Phoeung et al., 2010). Les stérosomes peuvent intégrer dans leurs membranes jusqu'à 75 mol % de stérol (Paré et al., 2001, Ouimet et al., 2003, Ouimet et al., 2004, Bastiat et al., 2007). Avec cette quantité élevée de stérol, ces mélanges peuvent former une phase lamellaire lo stable sur une large gamme de températures. Ils peuvent être extrudés à la température de la pièce avec les techniques classiques d'extrusion pour former des LUV (Bastiat et al., 2007). Ces liposomes sont plus imperméables que ceux formés avec les mélanges de phospholipides et cholestérol (Bastiat et al., 2007, Bastiat et al., 2007, Cui et al., 2010). Cette grande proportion de stérol contraste avec celles observables dans les bicouches phospholipidiques. La limite de solubilité des stérols dans les membranes phospholipidiques est généralement comprise entre 10 à 55 mol % (Mayer et al., 1990, Bach et al., 2003). Ce facteur limite l'imperméabilité de ces membranes.

La formation de la phase lamellaire l_o par des mélanges binaires de stérol et d'amphiphile monoalkylés requiert certains détails moléculaires. Une des conditions importantes est les proportions relatives d'acide gras et de stérol. Paré et Lafleur (2001) ont analysé le comportement de mélanges PA/Chol avec différentes compositions, à pH 5.5. Un résultat fondamental de cette étude a été l'établissement du diagramme composition-phase qui montre qu'avec une proportion de 70 mol% en stérol, la phase lamellaire l_o est présente à des températures supérieures à 50 °C. Bien que l'acide palmitique et le cholestérol ne forment pas de phase lamellaire fluide lorsqu'ils sont hydratés individuellement, ils forment des bicouches fluides lorsqu'ils sont mélangés ensemble dans la proportion indiquée. Il a été postulé que même si les molécules d'acide palmitique ne sont pas ionisées à ce pH, la fusion de l'acide gras fournit un environnement amphiphile qui permet la solubilisation de cholestérol. Ce dernier ordonne les chaînes acyle d'acide gras et favorise la formation de bicouches.

L'autre condition importante pour la stabilisation de la phase lamellaire l_o est la présence de charges à l'interface de la bicouche. Dans les mélanges PA/Chol, la phase lamellaire l_o est plus stable si une fraction importante de groupes carboxyliques est déprotonée que si ces groupes carboxyliques sont protonés (Paré et al., 2001, Ouimet et al., 2003). La substitution du cholestérol par Schol change complètement ce comportement (Bastiat et al., 2007). Par exemple, à la température de la pièce, le système PA/Chol à pH ≥ 7.4 forme une phase lamellaire l_o stable tandis que cette phase est formée à pH ≤ 7 pour le mélange PA/Schol. Le pK_a apparent du PA dans la bicouche est entre 6.4 et 7 (Bastiat et al., 2007). Donc, dans

le système PA/Chol à haut pH, une partie significative de PA est déprotonée, conduisant à des interactions répulsives entre les PA. Leur mélange avec les molécules de cholestérol, réduisant cette répulsion, est favorisé. Dans le système PA/Schol à bas pH, les interactions répulsives entre les molécules chargées négativement de Schol sont présentes et, de manière analogue, favorisent le mélange des lipides. Lorsque le système PA/Chol est à bas pH ($\text{pH} < 7.4$), il y a protonation de l'acide carboxylique. Le PA neutre et le cholestérol, aussi neutre, favorisent la séparation de phase et la formation de domaines de PA et de cholestérol solides. De manière similaire, dans le système PA/Schol à pH élevé, le PA et le Schol sont chargés négativement déstabilisant le système et conduisant à une séparation de phases. Donc, l'état protonée et déprotonée de l'acide carboxylique est un facteur clé pour la stabilisation/déstabilisation de la phase lamellaire de ces mélanges.

Cette sensibilité au pH peut être exploitée pour faire des LUV sensibles au pH. Par exemple, la libération de la calcéine, un fluorophore hydrosoluble, encapsulée dans des LUV de PA/Chol et de PA/Schol peut être déclenchée par une variation du pH. Dans les LUV de PA/Chol à température de la pièce, il n'y a pas libération considérable de calcéine à pH 7.4 et 9, même après deux mois (Bastiat et al., 2007, Cui et al., 2010). A pH 5.5, la calcéine est cependant totalement libérée quasi immédiatement (Bastiat et al., 2007). Par contre, dans les LUV de PA/Schol à pH 5.5, la calcéine reste encapsulée; en fait, 42 % de la calcéine est toujours encapsulée après de 50 jours (Bastiat et al., 2007). À pH 7.4 et 9 la libération de calcéine est de 20 et 90 % respectivement après deux minutes (Bastiat et al., 2007)

Les mélanges PA/Chol/Schol (70 mol % en stérol total) présentent un comportement intermédiaire de ceux observés pour les mélanges de PA/Chol et PA/Schol (70 mol % en stérol). Pour ces systèmes, la sensibilité au pH est finement modulée par le rapport molaire Chol/Schol. Bastiat et Lafleur (2007) montrent que les LUV de PA/Chol_{1-x}/Schol_x ($x \geq 0.1$) sont stables à pH 5.5 et à température de la pièce. Le niveau d'encapsulation de la calcéine dans les LUV de PA/Schol est 42 % après de 50 jours. Il augmente au fur et à mesure que la proportion de cholestérol augmente. Après 50 jours, 82, 89 et 93 % de la calcéine est toujours à l'intérieur des LUV formées par les mélanges PA/Chol_{1-x}/Schol_x avec $x = 0.1, 0.25$ et 0.5 , respectivement.

Une autre condition importante pour la formation de la phase lamellaire l_0 est la concordance hydrophobe entre l'axe longitudinal du cholestérol et la chaîne acyle de l'acide gras. Ouimet et Lafleur (2004) ont examiné la formation de stérosomes avec différents acides gras et le cholestérol. Il a été démontré que les acides gras avec des chaînes de 14 à 18 atomes de carbone forment des stérosomes avec le cholestérol. Ces chaînes correspondent à des longueurs effectives entre 14 à 19 Å, une gamme cohérente avec la longueur de la partie hydrophobe du cholestérol, qui est d'environ 16 Å. Les acides gras dont la chaîne est de 12 atomes de carbone ou moins et de 24 ou plus, ne forment pas la phase lamellaire l_0 en présence de cholestérol. Cette correspondance hydrophobe a également été observée pour les mélanges de phospholipides (McMullen et al., 1993, Sugahara et al., 2002, Mannock et al., 2010). De même, dans les systèmes biologiques, cette concordance hydrophobe entre les segments hydrophobes des protéines et les membranes

lipidiques est essentielle pour l'inclusion, la stabilisation et le fonctionnement correct des protéines membranaires (Mouritsen et al., 1984, Killian 1998, Webb et al., 1998, Lee 2003).

La formation de la phase lamellaire l_0 dans les stérosomes est aussi influencée par la structure des stérols. La formation de stérosomes avec PA a été examinée pour le dihydrocholestérol, le 7-déhydrocholestérol, l'ergostérol, le stigmastanol et le stigmastérol (Cui et al., 2010). Leur taille est semblable (Barenholz 2002). Il a été montré que les stérols avec une chaîne en C17 semblable à celle du cholestérol peuvent former des phases l_0 . Les stérols avec des chaînes en C17 plus volumineuses (substituée ou insaturée) ne semblent pas conduire à un empilement suffisamment compact des chaînes alkyles pour former de bicouches. Les détails du réseau de cycles stérol semblent avoir peu d'impact sur la formation de phases lamellaires avec PA.

Un des avantages les plus importants des stérosomes est leur imperméabilité élevée par rapport aux liposomes de phospholipides. Par exemple, les liposomes de POPC libèrent la presque totalité du glucose encapsulé après 2 jours (Bastiat et al., 2007). Bien que plus imperméables, les LUV de POPC/Chol 60/40 (mol/mol)% retiennent seulement 10 % du glucose encapsulé après 30 jours. Les LUV de PA/Chol conservent 80 % du glucose encapsulé sur une période de 30 jours à pH 7.4 (Bastiat et al., 2007). La capacité d'encapsulation a également été évaluée pour calcéine. Les LUV de POPC/Chol conservent 20 % de calcéine après 14 jours tandis que celles de PA/Chol ne montrent à toutes fins pratiques aucune fuite après 40 jours à pH 7.4 (Bastiat et al., 2007). Les LUV de PA/Chol/Schol de composition molaire 30/35/35

conservent 93 % de la calcéine à l'intérieur après 50 jours, à pH 5.5 (Bastiat et al., 2007). Dans la même veine, les LUV de chlorure de cétylpyridinium et Schol (CPC/Schol) de composition molaire 30/70 conservent 90 % de calcéine encapsulée après 4 mois à pH 7.4, et la même quantité après 1 an à pH 5.5 (Phoeung et al., 2009) .

En conclusion, la création des stérosomes à la température de la pièce est possible si on tient compte de certaines exigences quant aux détails structuraux de l'amphiphile monoalkylé et du stérol. Actuellement, notre groupe de recherche s'intéresse aux applications spécifiques de ces stérosomes.

1.3 Types de liposomes

Les liposomes peuvent être classés en fonction de leur taille et du nombre de bicouches incluses l'une dans l'autre. Les vésicules unilamellaires sont composées d'une seule bicouche et d'un seul compartiment aqueux. Elles sont classées selon leur taille : les vésicules géantes unilamellaires (*Giant Unilamellar Vesicles* ou GUV) avec un diamètre entre 1 et 200 μm , les grandes vésicules unilamellaires (*Large Unilamellar Vesicles* ou LUV), avec un diamètre entre 100 et 200 nm, et les petites vésicules unilamellaires (*Small Unilamellar Vesicles* ou SUV), avec un diamètre entre 30 et 50 nm. La figure 1.3 compare la différence de taille entre une GUV et une LUV. Les vésicules multilamellaires (MLV) sont formées par un compartiment central aqueux et plusieurs bicouches concentriques internes, organisées comme les couches d'un oignon. Il existe aussi de vésicules oligolamellaires formées par une seule vésicule avec plusieurs vésicules non concentriques à l'intérieur. Le type de liposome est choisi selon l'objectif de l'étude. Par exemple, pour des études de

perméabilité, on utilise généralement des LUV. Elles présentent un intérieur et un extérieur bien définis, encapsulent un volume d'eau important et ne présentent pas de stress de courbure. Les MLV sont principalement choisies quand il s'agit d'encapsuler des solutés hydrophobes parce qu'elles présentent un haut contenu hydrophobe par rapport aux vésicules unilamellaires. Finalement, les GUV qui ont une taille du même ordre que celui des cellules, peuvent être directement observés par microscopie optique (Bagatolli et al., 2000). Elles sont assez grosses pour permettre leur manipulation et l'observation de processus de transformation en temps réel (Hotani et al., 1999) lors de l'application d'un stimulus externe (Nappini et al., 2011) ou interne (Menger et al., 1995, Bucher et al., 1998). Les GUV ont permis d'identifier des modifications morphologiques résultant de changements de la pression osmotique (Kahya et al., 2002, Claessens et al., 2008), du pH (Quemeneur et al., 2008, Kuroda et al., 2011, Trier et al., 2011, Bandekar et al., 2012) et de la température (Singh et al., 1998, Angelova et al., 1999). De plus, elles sont utiles pour l'étude des interactions entre la membrane lipidique et un agent externe comme les peptides (Ambroggio et al., 2005, Bagatolli 2009) Finalement, à cause de leur taille, les GUV ont été utilisées comme système biomembranaire (Menger et al., 1998, Dimova et al., 2006, Wegrzyn et al., 2011) pouvant effectuer des réactions enzymatiques (Kato et al., 2003), la synthèse de l'ARNm (Fischer et al., 2002), la synthèse de la protéine fluorescente verte (Noireaux et al., 2004, Saito et al., 2009) et même s'auto-reproduire (Kurihara et al., 2011).

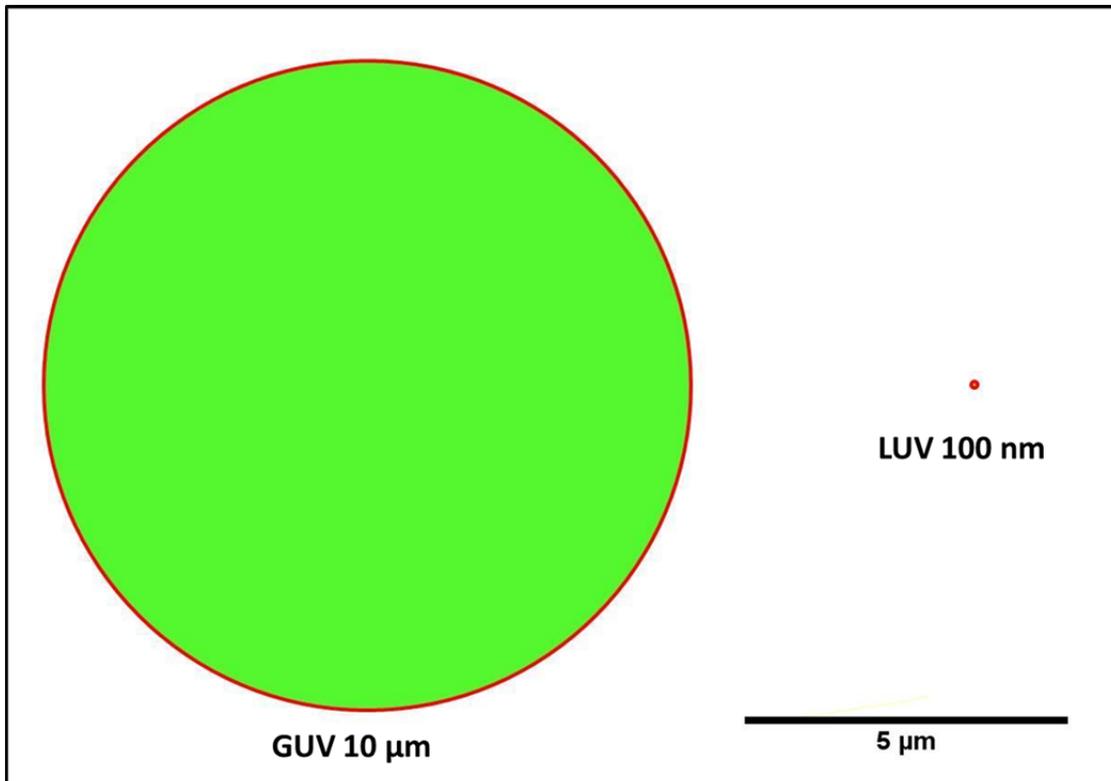


Figure 1.3. Représentation schématique à l'échelle d'une GUV de 10 μm et d'une LUV de 100 nm.

Méthodes de préparation

Actuellement, il existe de nombreuses façons de préparer des liposomes unilamellaires. L'extrusion et la sonication sont les méthodes les plus courantes; elles nécessitent l'application d'énergie mécanique. L'extrusion est basée sur le passage sous pression d'une dispersion de MLV à travers des filtres possédant un diamètre des pores précis (Olson et al., 1979). L'extrusion des MLV produit des LUV. La pression nécessaire pour extruder l'échantillon est fournie soit manuellement ou soit à partir d'un cylindre de gaz comprimé. Des filtres de différents matériaux tels que le polycarbonate ou le chlorure de polyvinyle (*polyvinyl chloride*, PVC), avec différents

diamètres de pores sont utilisées. L'extrusion est possible si le mélange lipidique forme une phase fluide (Nayar et al., 1989). L'application d'ultrasons permet aussi de réduire la taille des MLV et d'obtenir des vésicules unilamellaires (Hunt et al., 1981). Il existe plusieurs méthodes pour fabriquer des GUV, incluant l'hydratation spontanée, l'électroformation et diverses approches basées sur les émulsions. Pour une revue voir (Angelova et al., 1988, Moscho et al., 1996, Stachowiak et al., 2008, Tsumoto et al., 2009, Walde et al., 2010). La méthode utilisée dans ce mémoire est basée sur la formation d'une émulsion double eau/huile/eau (w/o/w) (figure 1.4). Dans l'émulsion double, une gouttelette interne d'eau est placée dans une autre gouttelette d'huile, laquelle est placée encore dans une phase aqueuse externe. Chaque gouttelette d'eau interne est recouverte avec molécules des lipides, la partie hydrophile étant dirigée vers la partie aqueuse de la gouttelette et la partie lipophile vers la gouttelette d'huile. Cette dernière est recouverte de molécules de lipides avec les têtes hydrophiles orientées vers le coeur de phase aqueux (figure 1.4 A). L'élimination de la phase organique par un vide moyen (évaporateur rotatif) conduit à la formation des GUV dans lesquelles les lipides couvrant initialement les gouttelettes d'eau internes de l'émulsion double w/o/w constituent la monocouche interne de la bicouche des GUV (figure 1.4 B). Les lipides dans l'interface qui est en contact avec eau externe constituent la monocouche externe des GUV (figure 1.4 C). Cette méthode a été utilisée parce que la fabrication de GUV est rapide, aisée à mettre en place et abordable.

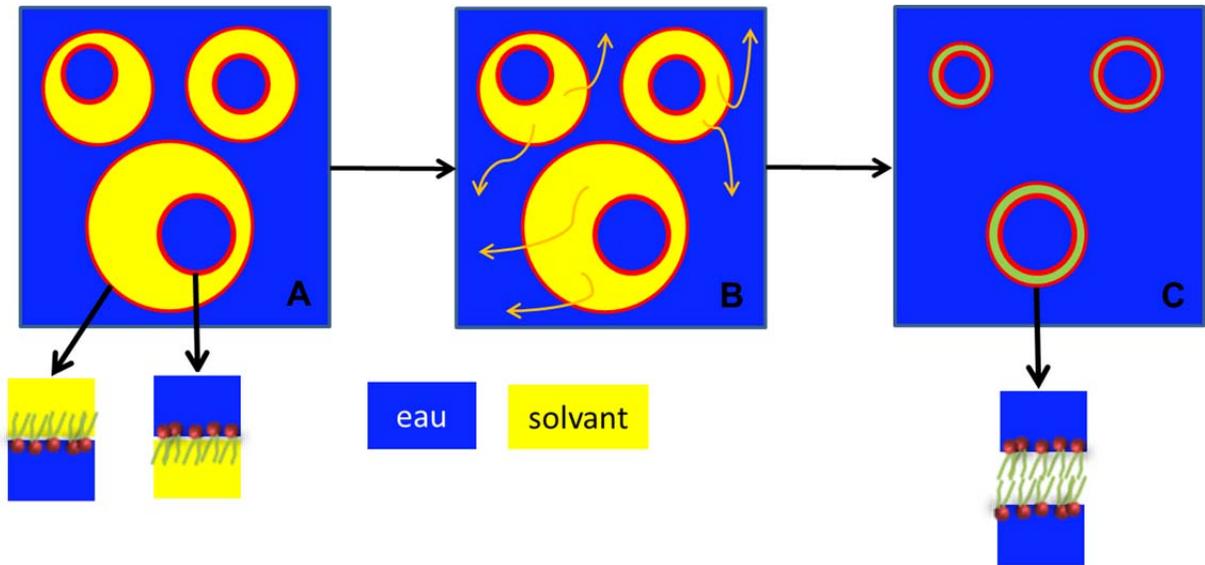


Figure 1.4. Représentation schématique de la formation de GUV avec la méthode à double émulsion. **A.** L'émulsion double formée par sonication. **B.** Le solvant est progressivement éliminé à pression réduite et la couche organique est de plus en plus mince avec le temps. **C.** La bicouche de la GUV est formée.

1.4 Les stérosomes comme nanocontenants

Comme indiqué précédemment, ce mémoire examine le pouvoir protecteur des stérosomes. Deux propriétés ont été étudiées : le maintien d'un gradient de pH transmembranaire et la protection de l'acide ascorbique encapsulé contre un milieu oxydant.

1.4.1 Gradient du pH

Le maintien et la régulation de gradients de protons et d'ions à travers les membranes biologiques sont importants pour le fonctionnement cellulaire (Biegel et al., 1981, Kuyper et al., 2006). Les cellules utilisent les gradients électrochimiques de cations (principalement H^+ et Na^+) pour, par exemple, le contrôle de la division et de la croissance cellulaires (Gerson et al., 1977, Bobik et al., 1991), la synthèse d'ATP, le transport de nutriments, l'excrétion et le rejet des toxines (Mitchell 1961, Mitchell 1972, Paula et al., 1996, Haines 2001). L'activité chimique des protons à travers les membranes cellulaires n'est pas en équilibre avec le potentiel électrochimique, ce qui suggère que le transport actif de protons est impliqué dans la régulation du pH intracellulaire (Nichols et al., 1980). Plusieurs études ont mesuré le coefficient de perméabilité d'ions au travers les membranes phospholipidiques. Les valeurs obtenues pour le coefficient de perméabilité du Na^+ (P_{Na^+}) pour différentes bicouches phospholipidiques varient entre 10^{-10} et 10^{-15} $cm\ s^{-1}$ (Papahadj.D 1971, Papahadj.D et al., 1972, Hauser et al., 1973, Brunner et al., 1980, Nichols et al., 1980, Nozaki et al., 1981, Hamilton et al., 1990, Hamilton et al., 1990, Leontiadou et al., 2007). D'autres cations monovalents et le chlorure possèdent des coefficients de

perméabilité entre 10^{-13} et 10^{-14} cm s^{-1} et 10^{-11} et 10^{-12} cm s^{-1} respectivement (Nichols et al., 1980, Kuyper et al., 2006). Ces valeurs montrent que la perméabilité des membranes phospholipidiques pour ces ions est généralement faible. Nichols et Deamer (1980) ont été les premiers à mesurer le coefficient de perméabilité au H^+ (P_{H^+}) de vésicules de PC et les valeurs obtenues étaient de l'ordre de 10^{-4} cm s^{-1} . Subséquemment, différents chercheurs ont trouvé des valeurs de P_{H^+} entre 10^{-1} à 10^{-8} cm s^{-1} (Biegel et al., 1981, Clement et al., 1981, Nozaki et al., 1981, Pohl 1982, Rossignol et al., 1982, Cafiso et al., 1983, Deamer et al., 1983, Krishnamoorthy et al., 1984, Perkins et al., 1986, Deamer 1987, Gutknecht 1987, Lande et al., 1995, Kuyper et al., 2006, Nichols et al., 2010). P_{H^+} est donc de 4 à 5 ordres de grandeur plus élevée que P_{Na^+} . Ce résultat suggère que la perméabilité des protons possède un mécanisme de transport différent et unique des autres ions (Nichols et al., 1980). Pour traverser la membrane, le soluté doit d'abord se dissoudre dans la région hydrophobe, diffuser au travers, quitter la membrane et se dissoudre dans la seconde phase aqueuse. On peut estimer le coefficient de perméabilité en considérant l'épaisseur de la membrane et les coefficients de partition du soluté. Les coefficients de partition d'ions se calculent à partir de l'énergie de Born, qui correspond à l'énergie nécessaire pour transférer une particule chargée de la phase aqueuse, qui possède une constante diélectrique élevée, à l'intérieur de la membrane de faible constante diélectrique. Les valeurs prédites par cette théorie et celles observées diffèrent de trois ordres de grandeur pour l'ion sodium mais de dix ordres de grandeur pour le proton (Paula et al., 1996), suggérant une complexité beaucoup plus grande du transport de ce dernier. Pour cette raison, des mécanismes alternatifs de transport

membranaire de protons ont été proposés. Premièrement, le mécanisme des fils d'eau transitoires suggère que la perméation est produite par la création d'une chaîne de molécules d'eau qui pénètrent la bicouche à cause de fluctuations thermiques. Une fois que la première molécule d'eau s'incorpore dans la bicouche, les autres molécules d'eau peuvent suivre le même chemin et une chaîne de molécules d'eau s'aligne à travers la bicouche. Les protons sont transférés par un réarrangement des liaisons hydrogène sur ces chaînes de molécules d'eau. De cette manière, les protons peuvent échapper à la haute barrière d'énergie d'activation associée au coefficient de partition dans le cœur hydrophobe de la membrane. On sait que le cholestérol diminue la quantité d'eau dans les bicouches, une conséquence de son effet de condensation sur l'empilement des chaînes aliphatiques des lipides. Cette diminution pourrait expliquer la diminution de la perméabilité aux protons observée lors de l'augmentation la quantité de cholestérol dans la bicouche (Haines 2001, Krishnamoorthy et al., 2001) si on suppose que l'eau est utilisée pour transporter des protons à travers les membranes. Deuxièmement, les protons peuvent traverser les membranes via des acides faibles ou des bases faibles qui servent de transporteurs de protons (Gutknecht 1987). La membrane est généralement beaucoup plus perméable à la forme neutre d'une molécule qu'à sa forme chargée. Si la forme neutre d'un acide ou d'une base traverse la membrane, elle peut libérer ou capter un proton de l'autre côté, tout dépendant du pH du milieu auquel elle est exposée. Par exemple, un acide faible protoné, HA, initialement solubilisé dans le milieu extérieur du liposome peut traverser la membrane et, une fois solubilisé à l'intérieur de la vésicule, il peut se dissocier, libérant ainsi son proton et abaissant de ce fait le pH

interne. La base faible a un effet analogue (Decoursey 2003). Troisièmement, le mécanisme de flip-flop est similaire à celui associé aux acides et bases faibles mais il se fait à partir de molécules endogènes à la membrane de phospholipides. Par exemple, les acides gras protonés peuvent effectuer un flip-flop à travers la membrane (i.e. passer d'un feuillet à l'autre de la bicouche) et libérer leur proton sur l'autre côté, participant ainsi au transport transmembranaire de protons (Biegel et al., 1981, Clement et al., 1981, Kamp et al., 1992, Simard et al., 2008). Le P_H^+ est difficile à mesurer et les valeurs rapportées varient sur plusieurs ordres de grandeur (Decoursey 2003). Cette grande variation de P_H^+ est, en partie, attribuable à des variations de la composition de la bicouche phospholipidique, de température, de la concentration de cations des deux côtés de la bicouche et de la méthode utilisée pour calculer le coefficient de perméabilité (Paula et al., 1996, Haines 2001). Cependant, l'ensemble de ces raisons permet difficilement d'expliquer la variation de sept ordres de grandeur trouvés pour P_H^+ (Decoursey 2003). On sait que la dissipation d'un gradient de pH se produit en deux régimes (Biegel et al., 1981, Clement et al., 1981, Deamer et al., 1983, Deamer et al., 1989). Premièrement, il y a une rapide décroissance de pH, sur l'échelle de temps de millisecondes. Elle est attribuée à la diffusion des protons au travers la bicouche des liposomes. Ce mouvement rapide de protons conduit à la création d'un potentiel électrique transmembranaire qui empêche l'entrée de plus de protons à l'intérieur de la membrane. On retrouve donc, dans un deuxième temps, une diminution du pH interne plus lente à cause de ce potentiel. La cinétique est alors représentative de l'échange transmembranaire de contre-ions. Ceux-ci quittent le liposome de manière à rétablir l'électroneutralité. La description de

la dissipation totale du gradient de pH est donc principalement reliée au transport de contre-ions. Pour examiner le transport de protons, nous avons utilisé le 8-hydroxy-pyrène-1,3,6-trisulfonate de trisodium (HPTS, ou pyranine) dans le but de mesurer le pH interne (pH_i) des vésicules (figure 1.5). Le HPTS est une sonde organique fluorescente soluble dans l'eau et auquel les membranes lipidiques sont imperméables (Wolfbeis et al., 1983). Sa toxicité est faible et il est bon marché par rapport à d'autres indicateurs de pH (Han et al., 2010). Il possède un groupe hydroxyle. Le maximum d'excitation est à 450 nm pour la forme déprotonée tandis qu'un point isoémissif est observé à 415 nm. L'intensité de fluorescence à cette dernière longueur d'onde représente alors la concentration totale de la sonde (protonée et déprotonée). Le maximum d'émission est à 510 nm pour les 2 formes. Donc, la fluorescence à 510 nm générée par une excitation à 450 nm reflète la concentration de la forme déprotonée tandis que celle obtenue avec une excitation à 415 est essentiellement associée à la concentration totale de la sonde. Le rapport de ces intensités de fluorescence est alors représentatif du pH du milieu (Kano et al., 1978). Ainsi, cette sonde ratiométrique a été utilisée pour mesurer le pH à l'intérieur et à la surface de liposomes (Wolfbeis et al., 1983) et pour la détermination du pH intracellulaire (Willoughby et al., 1998).

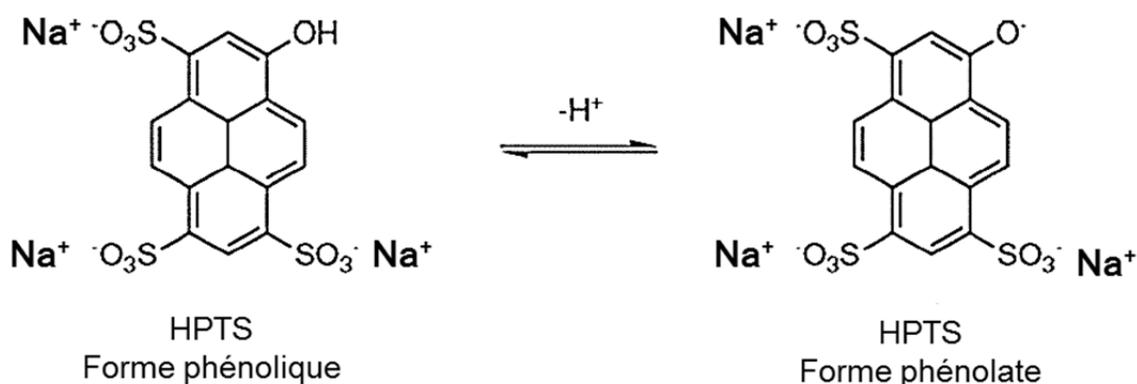


Figure 1.5. Forme protonée et déprotonée du HPTS.

1.4.2 L'acide ascorbique (AA) (Coates 2010)

L'acide ascorbique est une α -cétolactone de six atomes de carbone avec une masse molaire de 176.12 g/mol. Il contient deux groupes $-\text{OH}$ en position C2 et C3, ce qui lui donne un caractère acide. Le $\text{pK}_{\text{a}1}$ pour le OH du C3 est 4.17 et le $\text{pK}_{\text{a}2}$ pour celui du C2 est 11.79. La forme la plus abondante en milieux biologiques est donc l'ascorbate. L'acide peut donner de manière séquentielle les deux électrons de sa liaison double C2-C3 (figure 1.6). Le premier intermédiaire formé est le radical libre ascorbate. La stabilité de ce radical libre dépend de la disponibilité dans l'environnement d'accepteurs d'électrons comme le Fe^{3+} ou Cu^{2+} . En absence de ces accepteurs, le radical ascorbate est relativement stable et n'interagit pas avec d'autres composants pour former des radicaux libres potentiellement plus dangereux. La stabilité de ce radical est due au fait que son électron non apparié est dans un système π hautement délocalisé (Buettner et al., 1996). Le radical ascorbate subit une seconde oxydation en présence d'accepteurs d'électrons conduisant à la

formation d'acide déhydroascorbique (DHA). Ce dernier peut être réduit à l'ascorbate ou subir la rupture du cycle pour former l'acide 2,3-dicétogulonique. (Buettner 1993).

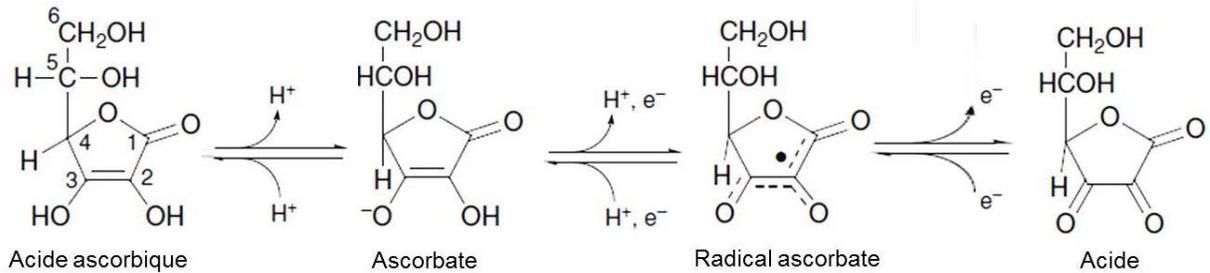


Figure 1.6. L'oxydation de l'ascorbate commence par la perte d'un électron et d'un proton pour produire le radical ascorbate. La perte d'un autre électron conduit à la formation d'une molécule complètement oxydée, l'acide déshydroascorbique (DHA) (Ball 2005).

À cause de sa propriété de donneur d'électrons, la vitamine C est connue comme un antioxydant exceptionnel et un capteur de radicaux. Physiologiquement, il est la première défense contre les radicaux aqueux dans le sang (Niki 1991). L'ascorbate protège les biomembranes contre les dommages peroxydatifs en retenant effectivement les radicaux aqueux peroxyde et les produits de peroxydation des lipides avant qu'ils puissent atteindre les membranes riches en lipides et initier la peroxydation (Padayatty et al., 2003). L'ascorbate peut également protéger les membranes contre la peroxydation grâce à son effet antioxydant synergétique avec la vitamine E (tocophérol). Dans ce cas, l'ascorbate réagit avec le radical tocophéroxyl, un produit résultant de l'activité antioxydante de la vitamine E, pour régénérer le

tocophérol. Le radical ascorbate, moins réactif, peut être alors réduit par des enzymes à l'acide ascorbique (Levine et al., 1991). En conséquence, l'ascorbate peut améliorer ou rétablir l'activité du tocophérol, le principal antioxydant liposoluble.

Protection de l'AA

L'AA est un micronutriment vital à la santé humaine. Il est synthétisé par les plantes et la majorité des animaux. Les humaines et certains autres primates ont perdu la capacité de synthétiser l'AA à cause d'une mutation génétique de la L-gulonolactone oxydase, l'enzyme du foie essentiel pour la production d'AA. En conséquence, les humains doivent obtenir l'AA via des fruits, des légumes et des suppléments vitaminiques. L'apport nutritionnel recommandé au Canada est entre 75 et 90 mg/jour pour les adultes (Santé-Canada 2007). Les fruits frais, en particulier les agrumes (40 – 50 mg/100 g) et les légumes à feuilles vertes (50 – 150 mg/100 g) sont de bonnes sources d'AA (Olson et al., 1987). Malheureusement, l'AA se détériore lorsqu'il est exposé à des températures élevées, à l'humidité, à l'oxygène, à la lumière et à des pH élevés (Kirby et al., 1991, Buettner et al., 1996, Wechtersbach et al., 2012). En raison du caractère hautement instable de la vitamine, la perte d'AA dans les fruits et légumes est accélérée après la récolte, lors de l'entreposage et pendant les processus de transformation (Davey et al., 2000). L'oxydation est la principale cause de la perte d'AA via sa conversion en acide déshydroascorbique (figure 1.6). Pour compenser cette diminution et pour aider à atteindre l'apport nutritionnel recommandé, les aliments en conserve sont enrichis en AA. La présence de vitamine C améliore la stabilité du produit à cause de son pouvoir antioxydant et protège la qualité sensorielle et nutritionnelle des aliments (Kirby et al., 1991). Malgré

l'enrichissement, la haute réactivité de l'AA peut entraîner son épuisement complet dans les aliments. Donc, les hautes concentrations initiales d'AA ne garantissent pas des concentrations stables pendant la durée de vie du produit. En présence d'oxygène, des processus oxydatifs provoqués par des radicaux libres produisent une série d'intermédiaires réactifs (Liao et al., 1988). Les processus de dégradation oxydative sont fortement catalysés par les ions fer et cuivre menant à la complète dégradation de l'ascorbate. L'oxydation est aussi accélérée à des pH basique (Buettner et al., 1996). L'AA est ajouté à une grande variété de produits aqueux (par exemple, jus de fruits et de légumes, fruits et légumes en conserve) pour éliminer l'oxygène avant l'emballage et l'entreposage. L'inconvénient avec cette technique de conservation est que s'il est trop en excès, l'AA réagit avec les acides aminés présents dans le produit alimentaire. Cette réaction produit un changement désagréable de saveur, d'odeur et une déstabilisation de couleur (brunâtre) ou la décoloration. La dégradation d'AA est aussi produite par des enzymes qui se trouvent dans les plantes comme l'ascorbate oxydase et l'ascorbate peroxydase, lesquelles sont éliminées via le traitement à haute température (stérilisation) des aliments (Kirby et al., 1991). L'exclusion de l'oxygène, la diminution du pH et de la température sont les processus les plus courants pour la stabilisation d'AA dans les émulsions et les solutions.

L'encapsulation de l'AA dans des liposomes afin d'en améliorer la stabilité a déjà été étudiée. Kirby et al. (1991) ont montré que l'AA encapsulé dans des MLV de PC/Chol (composition molaire 50/50) additionnés d' α -tocophérol (1 mol % des phospholipides totaux) est plus stable que la forme libre. L'étude montre un pourcentage

d'encapsulation élevée de 50 (p/p)% obtenu avec la méthode de déshydratation/réhydratation (Kirby et al., 1984). La dégradation de l'AA encapsulé et non encapsulé est plus rapide à la température de la pièce qu'à 4 °C. Cette étude montre aussi que les liposomes peuvent protéger l'AA de l'oxydase ascorbique, des ions de cuivre et de la lysine, des composants qui sont trouvés dans différents aliments en conserve. Dans cette étude, l'AA libre en solution (concentration initiale de 1.15 mM) se dégrade complètement après 18 jours à 4 °C et après 6 jours à la température de la pièce. L'AA encapsulé à la même concentration est intact à 60 % à 4 °C et à 20 % à la température de la pièce après 50 jours. Récemment Wechtersbach et al. (2012) ont montré que l'encapsulation de l'AA dans des LUV de 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DPPC) et DPPC/Chol 0.85/0.15 (mol/mol)% est plus stable que l'AA libre en solution. L'étude montre un pourcentage d'encapsulation autour de 5 % et une concentration interne en AA de 50 mM pour des LUV obtenus par des cycles de gel-dégel suivi d'une extrusion. L'oxydation d'AA est réduite significativement par son encapsulation dans des LUV. Par exemple, la demi-vie ($t_{1/2}$) de l'AA libre dans le tampon citrate à pH 4 avec 32 μM Cu^{2+} est de 2.1 heures tandis que la $t_{1/2}$ de l'AA encapsulé dans les LUV atteint à 240 heures. La stabilité de l'AA est dépendante du pH. À pH 3 l'oxydation de l'AA encapsulé montre une cinétique similaire à celle obtenue à pH 4, mais elle est significativement plus rapide à pH 5. Les auteurs ont aussi montré que l'encapsulation de l'AA dans les liposomes diminue significativement sa cinétique d'oxydation dans le jus de pomme. L'AA libre dans ce jus se dégrade complètement après un jour à 25 °C et après 5 jours à 4 °C. Par contre, l'AA encapsulé est conservé, à 25 °C, à 80% et 40% après 1

et 20 jours respectivement. À 4 °C, la conservation est de plus de 60 % après 20 jours. Nous désirons donc déterminer la protection offerte à l'AA par les liposomes non phospholipidiques développés dans le groupe et comparer ces résultats avec les formulations actuelles.

Description du projet

Dans le chapitre suivant, nous avons étudié la perméabilité de liposomes non phospholipidiques de PA/Chol/Schol (composition molaire 30/28/42). Des études précédentes par notre groupe de recherche montrent que cette composition molaire devrait être stable sur une large gamme de pH. Nous démontrons la perméabilité réduite de ces stérosomes de deux manières. D'abord, nous avons étudié le maintien d'un gradient de pH. Nous avons encapsulé une sonde fluorescente sensible au pH (HPTS) dans les liposomes et nous avons imposé un gradient $\Delta\text{pH} = 2$ à travers la membrane. Le maintien du gradient de pH est une façon de montrer la perméabilité réduite des liposomes non phospholipidiques. Deuxièmement, nous avons encapsulé l'acide ascorbique et à l'extérieur nous avons placé un agent oxydant (Fe^{3+}). Nous avons déterminé la stabilité de l'acide ascorbique encapsulé et évalué ainsi l'effet protecteur des stérosomes. Ces mesures ont été faites à la température de la pièce et à 4 °C, la dernière température présentant un intérêt pour le potentiel d'encapsulation dans les aliments réfrigérés.

Dans le chapitre 3, nous rapportons la formation de GUV avec une composition molaire 30/70 de PA/Chol en utilisant la méthode d'évaporation du solvant à partir

d'une émulsion double. Leur sensibilité au pH a été examinée. Ce travail constitue le premier rapport de la fabrication de GUV non phospholipidiques.

Chapitre 2

Introduction

L'effet protecteur des liposomes a été étudié pour les LUV de PA/Chol/Schol 30/28/42 mol/mol/mol. Nous montrons que ces LUV sont capables de maintenir un gradient de pH (pH interne = 8, pH externe = 6) 100 fois plus longtemps que les liposomes de POPC/Chol 60/40 mol/mol. Ils ont également la capacité de protéger l'acide ascorbique d'un environnement fortement oxydant (Fe^{3+} , 1 mM). L'ion Fe^{3+} réagit rapidement avec l'acide ascorbique libre en solution. Cependant, l'acide ascorbique encapsulé dans des liposomes mis en présence de 1 mM de Fe^{3+} montre une dégradation similaire à celle observée en absence de Fe^{3+} ; la membrane le protège de ce fort agent oxydant.

2.1 Matériel et méthodes

Produits chimiques

L'acide palmitique (environ 99 %), le cholestérol (>99 %), le tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane (TRIS) (99 %), l'acide 2-[N-morpholino] éthanesulfonique (MES) (>99 %), l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) (99 %), le chlorure de sodium (NaCl) (>99 %), le Triton X-100 (99 %), l'acide ascorbique (99.9 %), la 1,10-phénanthroline (>99 %), le chlorure du fer hexahydraté (98 %), l'acide citrique monohydraté (>99 %), le phosphate de sodium dibasique (>99 %) ont

été achetés chez Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). L'acide sulfurique (>95 %), l'acide acétique (99.7 %) et le méthanol (99.9 %) proviennent de Fischer Scientific. La POPC et le sulfate de cholestérol (sel de sodium) (>99 %) proviennent de la compagnie Avanti Polar Lipids Inc (Alabaster, AL, USA). Le HPTS et le gel Sephadex G-50 (moyen) ont été achetés de la compagnie Invitrogen Corporation (Burlington, ON, Canada), et Pharmacia (Uppsala, Suède) respectivement. Le benzène (>99 %), le phthaldialdéhyde (98 %) et l'éthanol (95 %) ont été achetés chez BDH Inc (Toronto, ON, Canada), Alfa Aesar et Commercial Alcohols Inc. (Brampton, ON) respectivement. L'eau Milli-Q avec une résistivité de 18.2 M Ω cm a été utilisée. Tous ces produits ont été utilisés sans purification ultérieure.

Méthode

Préparation de liposomes contenant de l'acide ascorbique

Les mélanges de PA/Chol/Schol (30/28/42 mol/mol/mol) et de POPC/Chol (60/40 mol/mol) ont été obtenus en mélangeant des quantités connues de chaque composant solubilisé dans une solution de benzène/méthanol (75/25 (v/v) pour PA/Chol/Schol et 95/5 (v/v) pour POPC/Chol). Pour assurer l'homogénéisation du mélange lipidique, la suspension a été congelé à la température de l'azote liquide (-196 °C) et les échantillons ont été lyophilisés pendant au moins 14 heures afin d'éliminer tout le solvant organique. La poudre lipidique obtenue par lyophilisation a été hydratée avec une solution d'acide ascorbique (100 mM) dans un tampon acide citrique/phosphate (acide citrique 10 mM, phosphate 20 mM et NaCl 140 mM) à pH 4. La concentration finale de lipide était 50 mg/mL. La suspension lipidique a été

soumise à cinq cycles de gel-dégel (de la température de l'azote liquide jusqu'à ~70 °C) et vortexée entre les cycles. Le pH de la suspension de PA/Chol/Schol en présence d'acide ascorbique était de 2.5 après hydratation; il a donc été réajusté à 4 avec des aliquotes d'une solution de NaOH (~5 M). Les vésicules unilamellaires (LUV) ont été préparées en utilisant une extrudeuse manuelle (modèle Lipofast, d'Avestin, Ottawa, ON, CA). La dispersion a été passée quinze fois à travers deux filtres de polycarbonate avec des pores de 400 nm de diamètre, puis quinze autre fois à travers deux filtres de polycarbonate avec de pores de 100 nm de diamètre. Les extrusions ont été faites à la température de la pièce. Les LUV contenant l'acide ascorbique ont été séparées de l'acide ascorbique libre à la température de la pièce par chromatographie d'exclusion sur gel en utilisant une colonne de 1.5 cm de diamètre et de 25 cm de longueur, remplie avec un gel Sephadex G-50 moyen, équilibré avec le tampon acide citrique/phosphate à pH 4. Les LUV contenant l'acide ascorbique recueillies ont été diluées deux fois avec un tampon acide citrique/phosphate à pH 4 contenant du FeCl_3 de manière à obtenir une concentration de Fe^{3+} de 1 mM. Cette dilution est définie comme le temps zéro. Les échantillons ont alors été incubés à la température de la pièce (20 ± 5 °C) et à 4 °C. Immédiatement après la dilution, une aliquote a été prélevée pour doser la quantité du cholestérol. Un contrôle (l'acide ascorbique encapsulé en absence de fer) a été incubé aux mêmes températures.

2.2. Étude de la protection de l'acide ascorbique d'un environnement oxydant

Le dosage de l'acide ascorbique est basé sur son oxydation par le Fe^{3+} (Besada 1987). Le Fe^{2+} ainsi formé a réagi avec la 1,10-phénanthroline pour former le

complexe de ferroïne. La concentration de ce complexe orange a été déterminée à 510 nm. L'acide ascorbique encapsulé a été séparé de l'acide qui aurait pu quitter les liposomes par chromatographie d'exclusion avec une colonne centrifugée (spin column). Pour ce faire, une aliquote a été prélevée et passée à travers une colonne d'élution (1 mL, 0.5 cm x 5 cm, remplie avec gel Sephadex G-50 moyen et équilibrée avec le tampon acide citrique/phosphate à pH 4). La mini-colonne a été centrifugée à 2500 RPM pendant 1 minute. Après la centrifugation, une aliquote de l'éluat a servi à quantifier le cholestérol. Une autre aliquote de la suspension des LUV recueillies (contenant l'acide ascorbique mais exempt de fer qui demeurait trappé sur la colonne) a été placée dans une cellule en quartz. À cette solution a été ajouté une solution contenant du Fe^{3+} (~3 mM) et de la phénanthroline (~9 mM) afin d'obtenir une concentration finale dans la cellule de ~150 μM en Fe^{3+} et ~450 μM en phénanthroline. Le volume a été complété à 2 mL avec du tampon pH 4. Après une période de 3 à 5 minutes, la réaction devait être complète et l'absorbance à 510 nm était mesurée. Ce contrôle indiquait, par une absorbance nulle, qu'il n'y avait pas d'acide ascorbique à l'extérieur des liposomes. Subséquemment, 25 μL de Triton X-100 (10 v/v% dans le tampon à pH 4) ont été ajoutés pour lyser les liposomes et libérer tout l'acide ascorbique encapsulé qui réagissait alors avec le Fe^{3+} et la phénanthroline. Après une période de 3 à 5 minutes, l'absorbance à 510 nm était mesurée afin d'obtenir la concentration totale d'acide ascorbique. La concentration finale de Fe^{3+} (~150 μM) était systématiquement supérieure à la concentration finale d'acide ascorbique totale escomptée en absence de réaction (~15 μM) de manière à assurer la réaction complète de l'acide ascorbique. Les concentrations ont été

déterminées à partir d'une courbe de calibration obtenue avec le tampon pH 4 (figure 2.2).

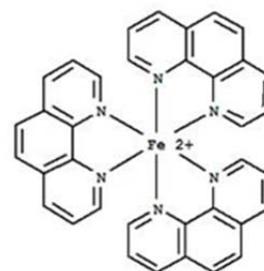
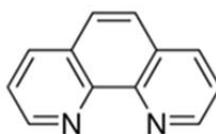
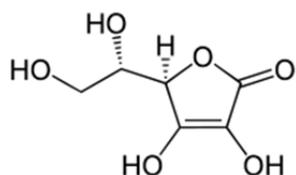
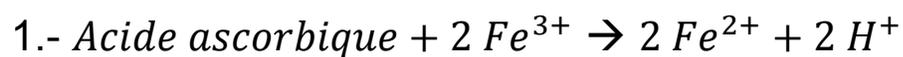


Figure 2.1. Oxydation de l'acide ascorbique par le Fe^{3+} . La phénanthroline réagit avec le Fe^{2+} et produit la ferroïne qui absorbe à 510 nm.

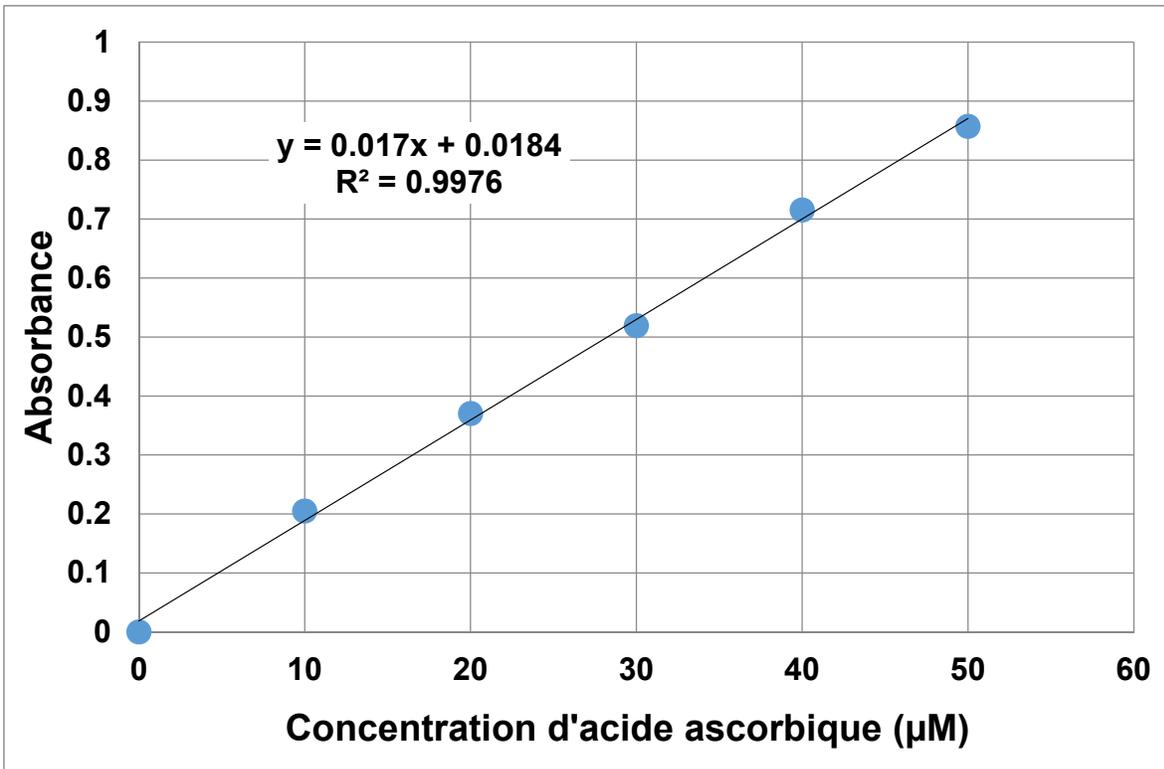


Figure 2.2. Courbe de calibration d'acide ascorbique.

Dosage de cholestérol (Rudel et al., 1973)

La détermination de la concentration du cholestérol a été faite utilisant une analyse colorimétrique utilisant la phthaldialdéhyde. Une aliquote contenant entre 10 et 20 µg de cholestérol a été séchée à l'azote. L'échantillon devait être bien sec parce que l'eau (et l'éthanol dans le cas du standard) diminue l'absorbance finale. Subséquemment, 2 mL d'une solution de phthaldialdéhyde (0.5 mg/mL d'acide acétique) ont été ajoutés. Une solution fraîche de phthaldialdéhyde a été préparée pour chaque analyse. La solution a été bien agitée pendant 10 minutes puis 1 mL d'acide sulfurique a été ajouté. Une coloration violette apparaissait à ce moment. La mesure d'absorbance à 550 nm devait être faite à l'intérieur d'une heure et demie

parce que l'intensité du couleur diminuait après ce temps (Zlatkis et al., 1969). Il était recommandé de faire la réaction dans la cellule de mesure parce que la réaction entre l'acide sulfurique et l'acide acétique est exothermique, augmente la viscosité de la mélange et produit des bulles avec le temps. Le transfert d'échantillon d'un contenant à un autre introduit des bulles qui sont difficiles à éliminer à cause de la grande viscosité. La courbe de calibration a été faite avec des solutions de différentes concentrations du cholestérol (0 – 25 µg) dans éthanol (figure 2.3).

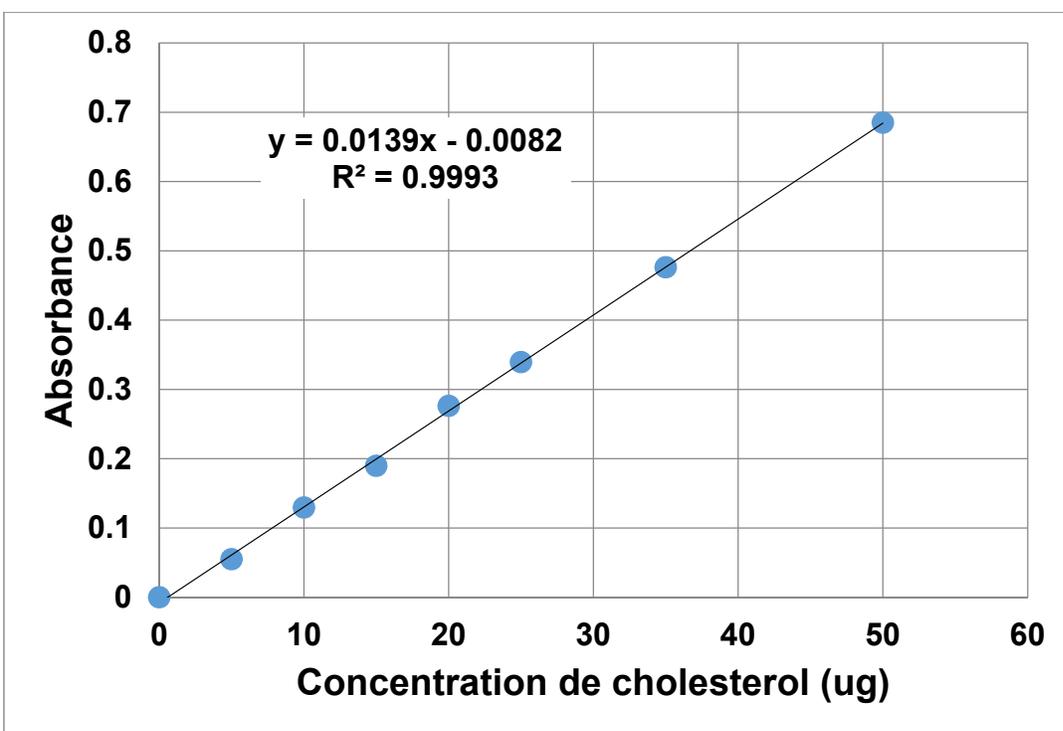


Figure 2.3. Courbe de calibration du cholestérol

Préservation du gradient de pH

La poudre lipidique obtenue par la lyophilisation a été hydratée avec une solution de HPTS (0.5 mM) dans un tampon MES/TRIS dont la composition est: MES 50 mM, TRIS 50 mM, NaCl 140 mM et EDTA 0.5 mM, à pH 8. Pour le mélange de PA/Chol/Schol, la solution de HPTS (0.5 mM) avait un pH initial de 8.5 afin de d'anticiper la diminution du pH due à l'acide palmitique. Le mélange de POPC/Chol ne nécessite aucun ajustement du pH. La concentration finale en lipides était de 20 mg/mL. Les suspensions de lipides ont été soumises à cinq cycles de gel-dégel (de la température de l'azote liquide jusqu'à ~75 °C en cas du mélange PA/Chol/Schol et jusqu'à ~40 °C pour le mélange POPC/Chol) et vortexées entre les cycles. Les LUV ont été préparées en utilisant une extrudeuse manuelle (modèle Lipofast, d'Avestin, Ottawa, ON, CA). Les dispersions ont été passées quinze fois à travers deux filtres de polycarbonate avec de pores de 100 nm de diamètre. L'extrusion a été faite à la température de la pièce pour les deux mélanges. Les LUV contenant le HPTS ont été séparées du HPTS libre à la température de la pièce par chromatographie d'exclusion sur gel en utilisant une colonne de 1.5 cm de diamètre et de 25 cm de longueur, remplie avec Sephadex G-50 moyen, équilibrée avec un tampon MES/TRIS (MES 50 mM, TRIS 50 mM, NaCl 140 mM et EDTA 0.5 mM) à pH 8. Les LUV recueillies contenant le HPTS ont été diluées 100 fois en utilisant un tampon MES/TRIS (MES 50 mM, TRIS 50 mM, NaCl 140 mM et EDTA 0.5 mM) à pH 6, nommé le tampon externe. Cette dilution est définie comme le temps égal à zéro. La suspension diluée 1/100 a été incubée à la température de la pièce. Immédiatement après la dilution, le spectre d'excitation du HPTS ($\lambda_{\text{fluorescence}} = 510 \text{ nm}$) a été

mesuré sur un spectrofluorimètre QuantaMaster-40 de Photon Technology International avec une bande passante à l'excitation et à l'émission de 6 et 3 nm, respectivement. La détermination du pH était basée sur l'intensité de la fluorescence à 510 nm mesurée pour une excitation à 415 et 450 nm. L'échantillon a été placé dans une cuvette en verre de 1 cm de côté, avec agitation constante, à 25 °C. Une aliquote de 2 mL de la dilution 1/100 du LUV a été prélevée et les mesures de fluorescence ont été faites avant et après l'addition du 20 µL de Triton X-100 (10 % v/v dans le tampon externe) afin de libérer complètement le HPTS. Les mesures de fluorescence après l'addition de Triton X-100 ont été utilisées pour vérifier que le pH rapporté par le HPTS correspondait bien au pH extérieur, soit 6. En parallèle, le pH de cette solution a été validé en utilisant une microélectrode en verre. Afin de mesurer tout changement de pH sur un court temps (une heure dans le cas des LUV de PA/Chol/Schol et 4 heures pour celles de POPC/Chol), 2 mL du tampon externe (pH 6) ont été placés dans la cuvette de fluorescence et 20 µL de LUV contenant du HPTS y ont été ajoutés. Le spectre d'excitation a été enregistré toutes les dix minutes. À la fin de cette période, du Triton X-100 a été ajouté et le pH externe a été mesuré à l'aide du HPTS et d'une microélectrode en verre afin de vérifier qu'il était bien de 6.

2.3. Résultats

2.3.1. Stabilité de l'acide ascorbique

La figure 2.4 montre l'effet protecteur des liposomes PA/Chol/Schol (30/28/42) pour l'acide ascorbique vis-à-vis du Fe^{3+} , en conditions aérobiques. L'efficacité d'encapsulation d'acide ascorbique a été de 7.2 et 9.1 % pour les liposomes de PA/Chol/Schol et POPC/Chol respectivement. La masse d'acide ascorbique par rapport aux lipides totaux est de 1.6 et 2.4 mg/g de lipide pour les mélanges PA/Chol/Schol et POPC/Chol respectivement. L'acide ascorbique libre en solution est complètement dégradé entre 3 et 5 minutes en présence de 1 mM du Fe^{3+} . Des taux semblables d'oxydation d'acide ascorbique en présence du Fe^{3+} ont été observés dans la littérature (1 à 2 minutes) (Besada 1987).

La dégradation de l'acide est significativement ralentie lorsqu'il est encapsulé dans les liposomes. Par exemple, à température ambiante, il reste encore entre 20 et 30% de la vitamine dans les liposomes après 2 jours. À 4 °C, plus de 90% de l'acide ascorbique encapsulé est encore intact après 2 jours. Ces résultats sont en accord à la littérature. Par exemple, Kirby et al. (1991) ont observé que 85% de l'acide ascorbique encapsulé dans des liposomes de phosphatidylcholine et cholestérol (PC:Chol 1:1 mol:mol) avec 1 mol% d' α -tocophérol sont intacts après 2 jours. De manière similaire, l'étude de Wechterbach et al. (2012) montre que 50% de l'acide ascorbique encapsulé dans des liposomes de DPPC :Chol (3:1 mol:mol) à pH 4 est intact après 6 jours à la température ambiante.

Les courbes de dégradation d'acide ascorbique ont été simulées en utilisant :

$\% \text{ acide ascorbique} = A e^{-t/T}$ où T est le temps caractéristique de dégradation (table 2.1). L'acide ascorbique libre en présence d'ion Fe^{3+} se dégrade avec un temps caractéristique d'une minute (0.00072 jour) (figure 2.4 A). Par contre, en absence de cet agent oxydant, l'acide ascorbique est environ 8 000 fois plus stable - avec un temps caractéristique de 5.9 jours. L'acide ascorbique encapsulé est plus stable que libre en solution; le temps caractéristique de dégradation a augmenté de 5.9 jours à ~15 jours lorsqu'on a encapsulé l'acide ascorbique. En présence d'ions Fe^{3+} , la vitamine encapsulée est 20 000 fois plus stable que libre en solution. En fait, les profils de dégradation de l'acide ascorbique dans les liposomes avec et sans Fe^{3+} dans le milieu externe sont très similaires, montrant que la protection des liposomes est totale face à ces ions oxydants. Les systèmes PA/Chol/Schol et POPC/Chol ne montrent pas de différence sur la stabilité de l'acide ascorbique encapsulé et il est conclu que les deux systèmes sont tout aussi efficaces.

On sait que la hausse de la température rend la cinétique de dégradation de la vitamine plus rapide (Kirby et al., 1991, Abbas et al., 2012, Wechtersbach et al., 2012). Le temps caractéristique de dégradation de l'acide ascorbique à la température de la pièce, en absence d'ions Fe^{3+} , est de 1.36 jours pour la forme libre et la forme encapsulée. La présence d'ions Fe^{3+} dans le milieu externe n'affecte pas significativement la dégradation de la vitamine encapsulée qui suit, en fait, le même profil de dégradation que celui obtenu pour la vitamine libre en absence d'ions, indiquant encore une fois que les membranes lipidiques sont efficaces contre le

pouvoir oxydant des ions Fe^{3+} . Aucune différence significative n'a été observée par rapport à l'effet protecteur de liposomes de PA/Chol/Schol et POPC/Chol.

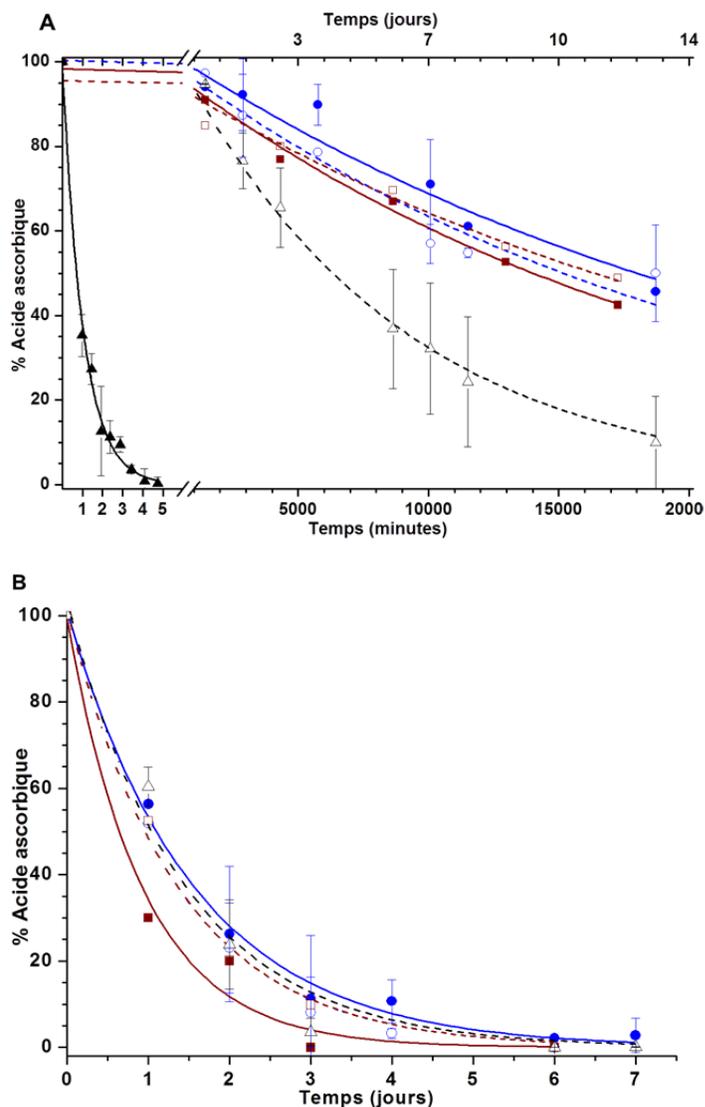


Figure 2.4. Protection de l'acide ascorbique par son encapsulation dans les liposomes. Les symboles pleins et vides représentent respectivement la présence ou l'absence d'ions Fe³⁺ dans le milieu externe. Les profils de dégradation sont obtenus pour l'acide ascorbique libre en solution (les triangles) ou encapsulé dans des liposomes de PA/Chol/Schol (les cercles), ou de POPC/Chol (les carrés). Les expériences ont été faites à (A) 4°C et à (B) température de la pièce. n = 3 pour les LUV de PA/Chol/Schol et n = 1 pour le contrôle POPC/Chol.

Table 2.1. Effet protecteur de liposomes et stabilité de l'acide ascorbique en présence d'ion Fe^{3+} .

		T (jours)	
		Sans Fe^{3+}	Avec Fe^{3+}
4°C	PA/Chol/Schol	15.1 ± 1.7	17.4 ± 1.9
	POPC/Chol	17.5 ± 1.6	14.4 ± 0.7
	Libre	5.9 ± 0.3	0.00072 ± 0.00003
T de la pièce	PA/Chol/Schol	1.36 ± 0.07	1.57 ± 0.08
	POPC/Chol	1.36 ± 0.09	0.94 ± 0.13
	Libre	1.44 ± 0.19	N.D.

2.3.2. Préservation du gradient du pH

L'évolution des spectres d'excitation et d'émission du HPTS en fonction du pH est présentée aux figures 2.5 et 2.6. Elle concorde avec les résultats publiés auparavant dans la littérature (Clement et al., 1981, Giuliano et al., 1987, Kizildereli et al., 2010). Les spectres d'excitation sont enregistrés en utilisant une longueur d'onde d'émission de 510 nm. Le spectre du HPTS montre une forte bande à 450 nm en solution alcaline associée à la forme phénolate. Cette bande disparaît en milieu acide (figure 2.5). En conséquence, le fluorophore absorbe moins de photons à 450 nm si la solution est acide et, en conséquence, émet moins de lumière. Les spectres montrent aussi la présence d'un point isoémissif près de 415 nm qui vient établir l'équilibre

entre les formes phénolate et phénolique. Le spectre d'émission du HPTS, avec une longueur d'onde d'excitation de 450 nm, a été enregistré pour la même gamme de pH. La caractéristique la plus importante est un maximum près de 510 nm, observable particulièrement pour les pH alcalins. Le HPTS est une exception à la «règle du miroir» généralement observée pour les sondes de fluorescence. La différence entre les spectres d'excitation et d'émission est due à une ionisation du groupe hydroxyle.

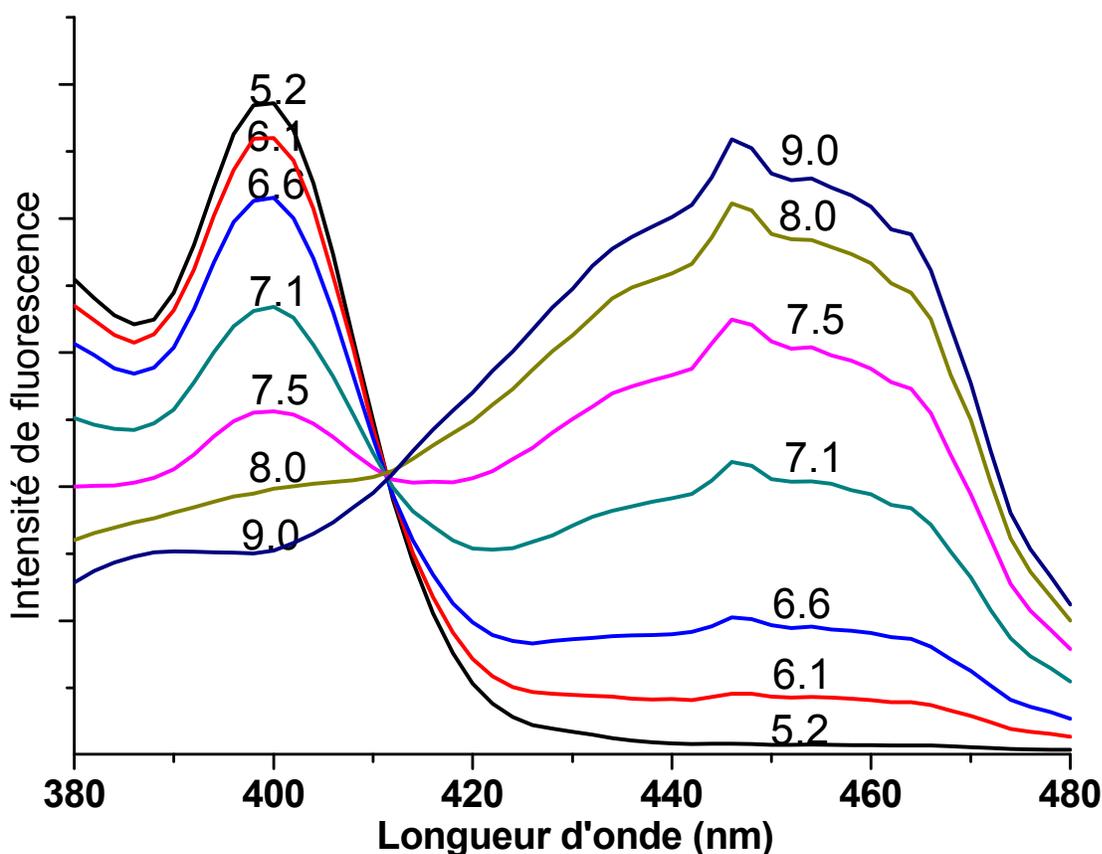


Figure 2.5. Le spectre d'excitation du HPTS à différents pH (directement indiqués dans la figure). Longueur d'onde d'émission=510 nm. HPTS, 20 nM dans le tampon MES/TRIS/NaCl/EDTA. La sonde était initialement encapsulée dans des LUV de composition PA/Chol/Schol 30/28/42 puis libérée par l'addition de Triton X-100.

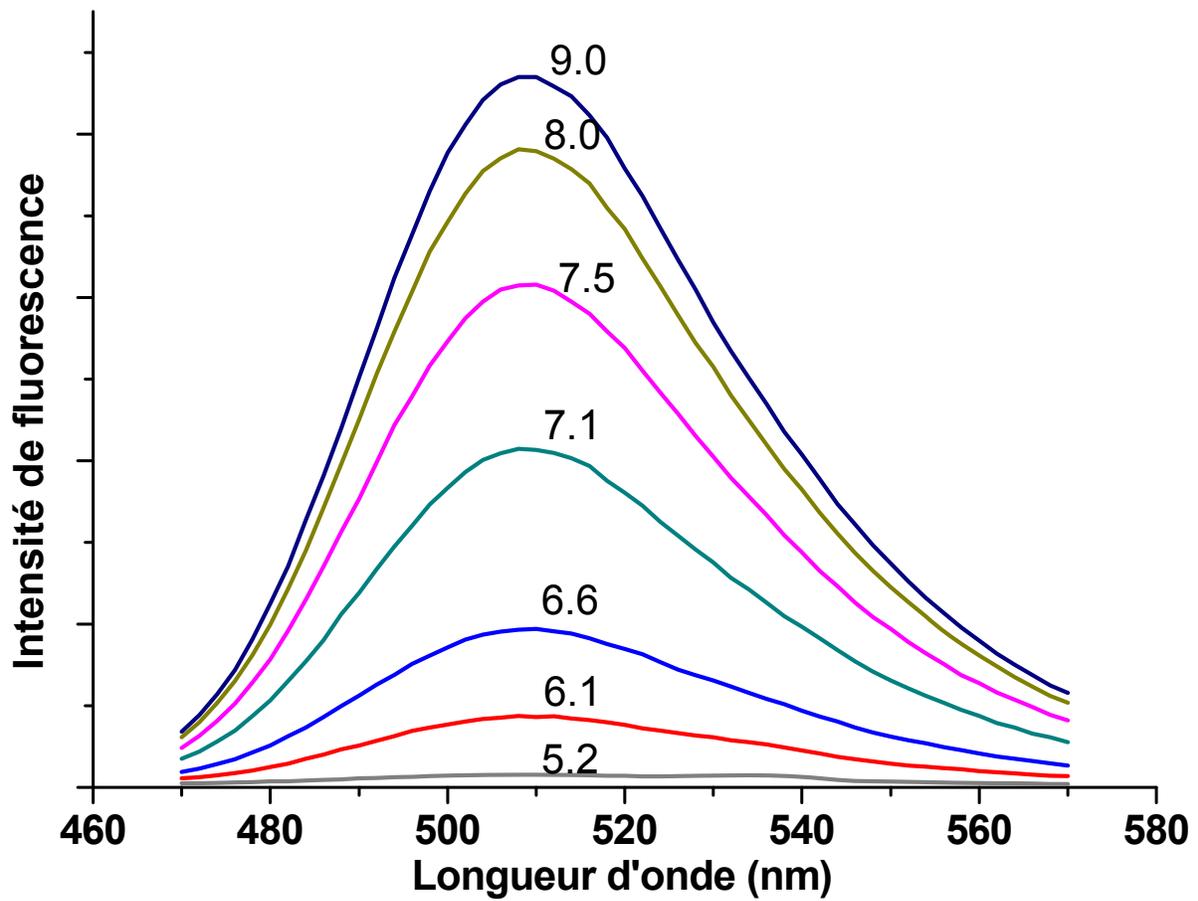


Figure 2.6. Le spectre d'émission du HPTS à différents pH. Longueur d'onde d'excitation=450 nm. HPTS 20 nM dans le tampon MES/TRIS/NaCl/EDTA. La sonde était initialement encapsulée dans des LUV de composition PA/Chol/Schol 30/28/42 puis libérée par l'addition de Triton X-100 .

Les liposomes avec du HPTS à l'intérieur ont été préparés, comme décrit précédemment, et le HPTS libre a été éliminé par chromatographie d'exclusion en utilisant le tampon MES/TRIS à pH 8 comme éluant. La suspension de LUV recueillies a été diluée 100 fois avec le tampon MES/TRIS à pH 6. Cette solution a été divisée et chaque fraction ajustée à un pH différent, entre 2 et 11, par l'addition de HCl ou NaOH dilué. Pour obtenir la courbe de détermination de pH, à chaque fraction a été ajoutée une solution de Triton X-100 (10(v/v)% dans le tampon MES/TRIS à pH 6) de manière à obtenir une concentration finale de 1(v/v)%. Cette approche permet de faire les mesures dans des conditions similaires à celles effectués pour déterminer le pH interne. Le pH a été mesuré avec une électrode en verre. La concentration finale de HPTS est de 20 nM. Par la suite, le spectre d'excitation ($\lambda_{\text{fluorescence}} = 510 \text{ nm}$) du HPTS a été enregistré pour chaque aliquote, à 25 °C sous l'agitation magnétique.

Le pH interne des vésicules a été obtenu par la corrélation du rapport d'intensité de fluorescence et le pH mesuré pour la microélectrode. La courbe de calibration a été simulée avec l'équation de Grynkiewicz, Poenie et Tsein (Grynkiewicz et al., 1985) en utilisant le logiciel Origin™ :

$$pH = pK_a + \log \left(\frac{R - R_a}{R_b - R} \right) \dots \dots \dots \text{équation (1)}$$

et sa forme réarrangée :

$$R = R_a + \left(\frac{R_b - R_a}{1 + \exp[(pK_a - pH) * \ln 10]} \right) \dots \dots \dots \text{équation (2)}$$

Où : R est le rapport d'intensité de fluorescence à 510 nm pour les deux longueurs d'onde d'excitation (λ_{exc}) de 450/415 nm, pK_a est le pK_a apparent de HPTS, R_a est la

valeur minimale de R , mesurée lorsqu'on ne retrouve que la forme protonée du HPTS et R_b est la valeur maximale de R , mesurée lorsqu'on ne retrouve que la forme non protonée du HPTS. Les données sont simulées adéquatement par l'équation 2 (figure 2.7). Cette courbe a été déterminée avec les données de trois expériences indépendantes pour PA/Chol/Schol et POPC/Chol. La courbe de calibration pour PA/Chol/Schol a donné les valeurs suivantes : $pK_a = 6.89 \pm 0.01$, $R_a = 0.11 \pm 0.01$, $R_b = 1.82 \pm 0.01$ (R^2 -ajusté = 0.9995) et pour POPC/Chol : $pK_a = 6.89 \pm 0.04$, $R_a = 0.12 \pm 0.02$, $R_b = 1.90 \pm 0.02$ (R^2 -ajusté = 0.9970).

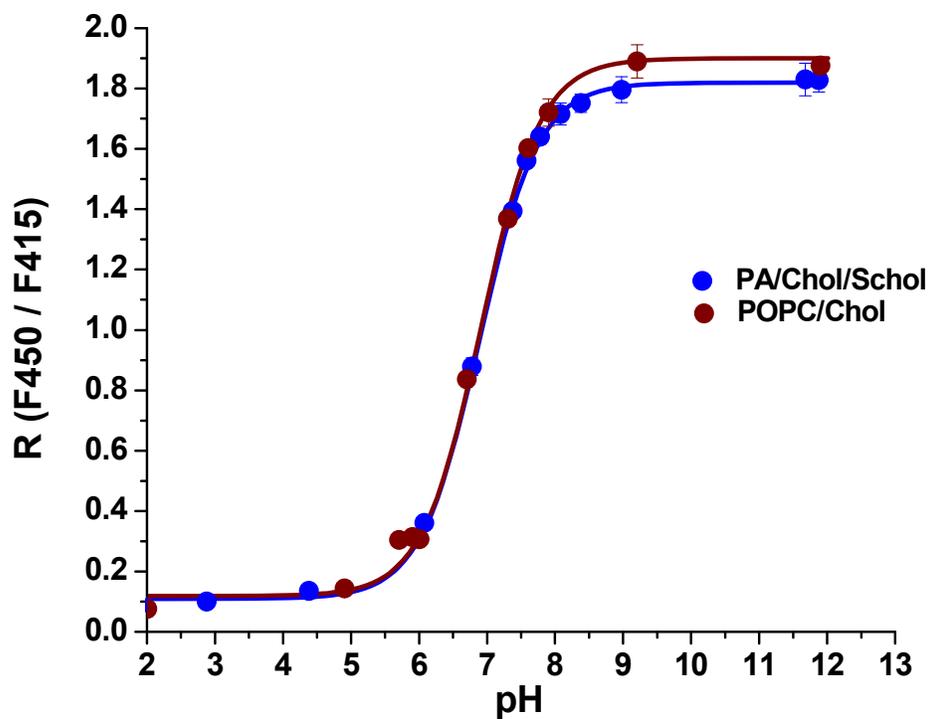


Figure 2.7. Courbes de calibration pour le HPTS. Excitation: 450 et 415 nm. Émission: 510 nm.

L'étude de gradient du pH repose sur la mesure du pHi des LUV. La figure 2.8 montre l'évolution du pHi des liposomes tel que rapporté par HPTS. Initialement, le pHi est de 8, correspondant à la valeur de pH du tampon interne. Lorsque les liposomes sont en contact avec un milieu plus acide, le pHi commence à diminuer. La vitesse de dissipation du gradient de pH pour les liposomes de POPC/Chol est supérieure à celles de PA/Chol/Schol. Par exemple, le temps pour atteindre pH 7 est 20 heures et 0.2 heures (12 minutes) pour PA/Chol/Schol et POPC/Chol respectivement. Ces données démontrent que les LUV non phospholipidiques sont 100 fois meilleures

pour préserver le gradient de pH que celles à base de phospholipides. Comme a été décrit auparavant, le Triton X-100 a été ajouté aux dispersions, à la fin de l'expérience, afin de valider la mesure de pH par la sonde HPTS. Pour les liposomes de POPC/Chol, nous avons obtenu une valeur de 5.98 ± 0.10 avec le HPTS et 5.96 ± 0.06 avec la microélectrode de verre. Pour les liposomes de PA/Chol/Schol, la valeur de pH après l'addition de Triton X-100 était de 6.13 ± 0.11 selon le HPTS et 6.01 ± 0.03 avec la microélectrode en verre. Ce contrôle montre bien que la mesure du pH par la sonde est fiable.

On sait que la dissipation d'un gradient de pH se produit selon deux régimes (Biegel et al., 1981, Clement et al., 1981, Deamer et al., 1983, Deamer et al., 1989). Premièrement, il y a une rapide décroissance de pH, sur l'échelle de temps de millisecondes. Elle est attribuée à la diffusion des protons au travers de la bicouche des liposomes – vers l'intérieur des liposomes dans notre cas. Ce mouvement rapide de protons conduit à la création d'un potentiel électrique transmembranaire qui empêche l'entrée de plus de protons à l'intérieur de la membrane. On retrouve donc, dans un deuxième temps, une diminution du pH interne plus lente à cause de ce potentiel. La cinétique est alors représentative de l'échange transmembranaire de contre-ions, les ions sodium dans notre cas. Ceux-ci quittent le liposome de manière à rétablir l'électroneutralité. La description de la dissipation totale du gradient de pH que nous caractérisons est donc principalement reliée au transport d'ions sodium. La configuration du fluorimètre ne permet malheureusement pas le suivi de la première phase (sur l'échelle de millisecondes).

La conservation durant plusieurs heures du gradient de pH indique que les LUV de PA/Chol/Schol sont stables sur cette gamme de pH, en accord avec des résultats précédents de notre groupe de recherche pour des systèmes similaires (Bastiat et al., 2007).

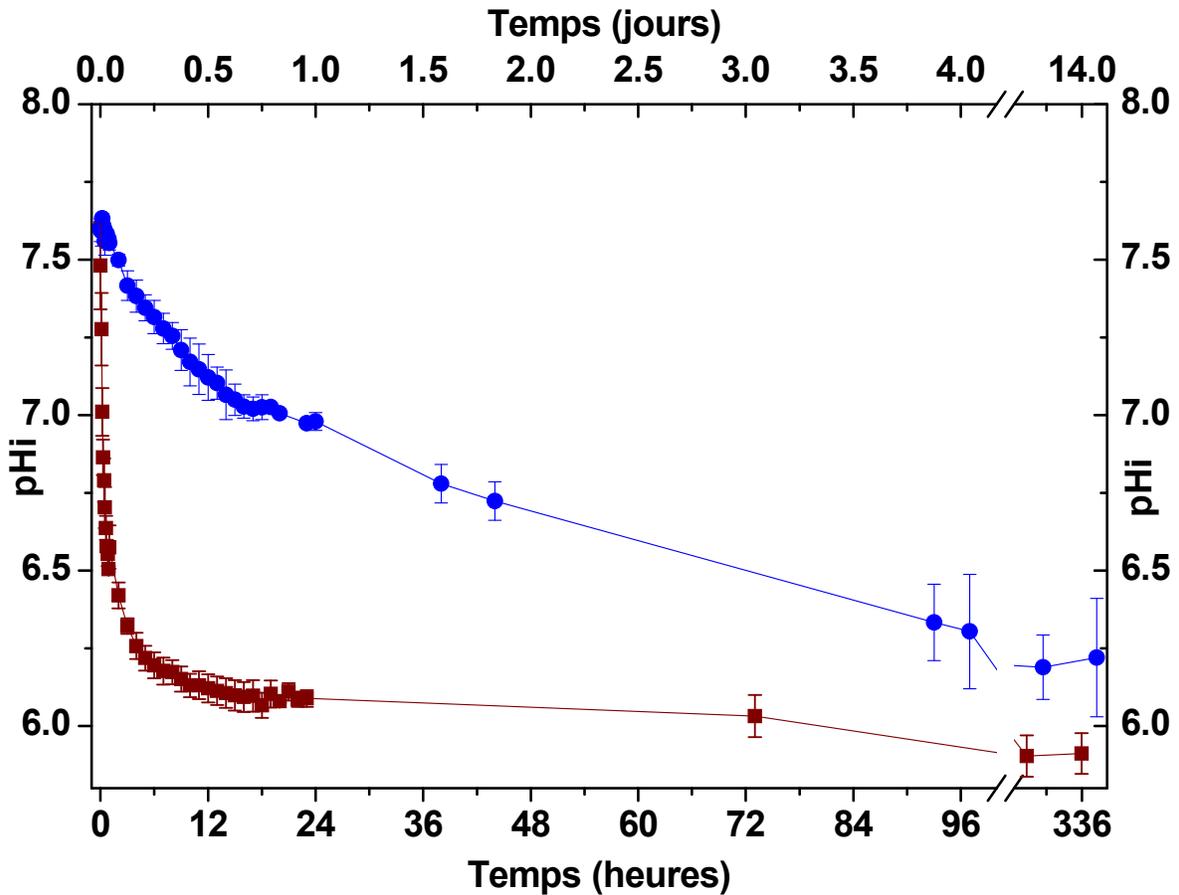


Figure 2.8. Dissipation du gradient du pH. Liposomes de PA/Chol/Schol (●) et POPC/Chol (■). pH(externe) = 8 et pH(interne) initial = 6.

2.4. Discussion

L'effet protecteur de la membrane lipidique contre le Fe^{3+} est notable. L'acide ascorbique libre réagit complètement en moins de 5 minutes avec le Fe^{3+} . Cependant, quand la vitamine est encapsulée, sa stabilité augmente par un facteur de 20 000. Par exemple, à 4 °C, le temps caractéristique de dégradation de l'acide ascorbique est de 1 minute avec la présence de Fe^{3+} et il augmente à 15 jours quand l'acide ascorbique est encapsulé dans les liposomes. La dégradation de l'acide ascorbique se produit en fait comme s'il n'y avait pas d'ions Fe^{3+} dans le milieu. Cet effet protecteur de nos liposomes non phospholipidiques est similaire à ceux des liposomes phospholipidiques déjà rapportés. Par exemple, Kirby et al. (Kirby et al., 1991), qui ont obtenu des temps similaires de demi-vie d'acide ascorbique libre en solution sans agent oxydant à la température de la pièce et à 4°C, ont montré que l'acide ascorbique dans des liposomes faits à base de PC se dégrade à un taux similaire à celui observé pour une solution d'acide ascorbique libre en solution, sans ion oxydant. Wechtersbach et al. (Wechtersbach et al., 2012) ont obtenu un résultat similaire à la température de la pièce: l'acide ascorbique encapsulé dans des liposomes de DPPC est protégé de la dégradation catalysée par les ions cuivre du milieu externe. En fait, ces articles rapportent des temps de dégradation d'acide ascorbique qui sont même supérieurs à ceux présentés dans ce mémoire. D'une part, Kirby et al. (Kirby et al., 1991) ont ajouté aux liposomes de l' α -tocophérol; ce dernier est un antioxydant puissant (Liebler et al., 1986, Mahoney et al., 1986) et apporte vraisemblablement une stabilité supplémentaire. D'autre part, Wechtersbach et al. (Wechtersbach et al., 2012) ont utilisé des liposomes de DPPC dont le diamètre

était de 1300 nm. Cette taille suggère que les liposomes étaient probablement constitués de plusieurs couches lipidiques, ce, qui pourrait apporter un effet protecteur additionnel à l'acide ascorbique.

A 4 °C, l'acide ascorbique encapsulé apparaît même être plus stable que l'acide libre en absence de Fe^{3+} . L'encapsulation de l'acide ascorbique augmente d'un facteur d'environ 3 le temps caractéristique de dégradation par rapport à la vitamine libre en solution. Cette amélioration de la stabilité pourrait être associée à la concentration en acide plus élevée dans les liposomes que celle de l'acide ascorbique libre en solution (0.5 mM). Il a été montré (Kirby et al., 1991) que la vitesse de dégradation de l'acide ascorbique libre diminuait en fonction de l'augmentation de sa concentration.

L'augmentation de la température est un facteur déterminant pour la dégradation de la vitamine. À la température de la pièce et en absence d'ion Fe^{3+} , le temps caractéristique de dégradation de l'acide ascorbique libre en solution est de 1.4 jours tandis qu'à 4 °C, il est de 6 jours. Un phénomène similaire est observé pour la vitamine encapsulée. Pour les liposomes de PA/Chol/Schol, le temps caractéristique de dégradation de l'acide ascorbique passe de 1.6 à 17.4 jours lorsque la température est abaissée de 25 à 4 °C. De manière analogue, il passe de 1 et 14.4 jours pour les liposomes de POPC/Chol.

Dans les conditions utilisées, la stabilité apportée par les deux types de membranes (PA/Chol/Schol et POPC/Chol) est équivalente. L'acide ascorbique libre en solution est généralement plus stable à plus bas pH, à 3 par exemple (Wechtersbach, Poklar et al. 2012). Cependant, les phospholipides s'hydrolysent à ce bas pH pour se dégrader en acide gras et en forme lyso. Par exemple, 4% de la DPPC sont

hydrolysés à pH 3 en 14 jours tandis que seulement 1% est dégradé à pH 4. Cette dégradation diminue l'imperméabilité de la membrane (Wechtersbach, Poklar et al. 2012). Ce phénomène empêche l'utilisation de liposomes phospholipidiques pour l'encapsulation à très bas pH. Le système de PA/Chol/Schol est potentiellement plus stable aux bas pH parce que ces molécules sont moins susceptibles à la dégradation que les phospholipides. Cet aspect devrait être validé et il est possible que les sterosomes présentent un avantage marqué pour l'utilisation de nanocontenants à très bas pH.

Les résultats de la dissipation du gradient du pH montrent que les liposomes de PA/Chol/Schol 30/28/42 mol/mol/mol sont moins perméables que ceux de POPC/Chol. La dissipation du gradient de pH de liposomes de PA/Chol/Schol est 100 fois plus longue que celle de liposomes de POPC/Chol. Cette propriété est liée à la haute teneur de stérol; on retrouve 70 (mol)% de stérol dans les liposomes non phospholipidiques tandis que ce n'est que 40 (mol)% pour ceux à base de POPC. Il est bien connu que le cholestérol améliore la perméabilité des bicouches aux petits ions comme le sodium et le potassium ainsi que de l'eau (Finkelstein et al., 1967, Papahadj.D 1971, Papahadj.D et al., 1972, Bonting et al., 1977, Yeagle 1991, Corvera et al., 1992, Haines 2001, Krishnamoorthy et al., 2001, Bastiat et al., 2007).

Chapitre 3

Introduction

Dans le présent chapitre, nous montrons la formation de GUV à partir du mélange PA/Chol 30/70 mol/mol. Le protocole, basé sur la création d'une double émulsion, s'inspire de celui déjà utilisé avec succès pour les GUV de phospholipides (Moscho et al., 1996, Morigaki et al., 2002, Toyota et al., 2004). Ce chapitre constitue le premier rapport de la création de GUV à partir d'amphiphile monoalkylé et de stérol, sans phospholipide. Nous montrons aussi que ces GUV ont une sensibilité au pH similaire à celle des LUV de même composition chimique.

3.1. Matériel et méthodes

Produits chimiques

L'acide palmitique (PA) (99 %), le cholestérol (Chol) (> 99 %), le rouge du Nil (Nile Red) (> 98 %), le tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane (TRIS) (99 %), l'acide 2-[N-morpholino]éthanesulfonique (MES) (>99 %), l'éther diéthylique (> 99 %), le glucose (réactif ACS) et le saccharose (réactif ACS) ont été fournis par Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). La POPC et le 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylglycérol (POPG) ont été obtenus de la compagnie Avanti Polar Lipids Inc (Alabaster, AL, USA). Le chlorure de potassium (KCl) (réactif ACS), le chloroforme (> 99 %) et la calcéine (haute pureté) ont été achetés chez Biopharm (Montréal, QC, CA), Anachemia (Montréal, QC, CA) et Invitrogen Corporation (Burlington, ON, CA).

respectivement. Tous ces produits ont été utilisés sans purification ultérieure. L'eau Milli-Q avec une résistivité d'au moins 18.2 M Ω ·cm a été utilisée.

Méthode

Préparation de vésicules unilamellaires géantes

Les mélanges de PA/Chol (30/70 mol/mol) et de POPC/POPG/Chol (30/30/40 mol/mol/mol) ont été obtenus en mélangeant des quantités pesées de chaque composant, solubilisées dans une solution de benzène/méthanol (75/25 (v/v)). Cette solution lipidique a été congelée dans l'azote liquide (-196 °C) et les échantillons ont été lyophilisés pendant au moins 16 heures afin d'éliminer tout le solvant organique. Par la suite, la poudre résultante a été dissoute dans du chloroforme (10 mg/mL). Afin de créer l'émulsion double, 320 μ L de la solution lipidique, 1 mL de chloroforme et 1 mL de tampon (TRIS 5 mM, MES 5 mM à pH 8.3) contenant du saccharose (215 mM), ont été mélangés dans une première fiole. Dans une deuxième fiole, ont été ajoutés 320 μ L de la solution lipidique, 0.5 mL d'éther diéthylique et 2.5 mL du tampon contenant le saccharose. Les flacons 1 et 2 ont été traités aux ultrasons pendant 45 et 15 secondes respectivement. Leurs contenus ont été mélangés et soniqués pour une période supplémentaire de 10 secondes. Durant cette étape, l'émulsion double eau/huile/eau a été formée. Le mélange a été transféré dans un ballon à fond rond, placé sur un évaporateur rotatif et le solvant organique a été éliminé sous pression réduite pendant 10 minutes à 40 °C. Durant les 5 premières minutes, un gel visqueux a été formé puis durant les 5 dernières minutes, il est

devenu une suspension aqueuse transparente. L'échantillon a été centrifugé à 537 *g* pendant 30 minutes. Les GUV ont été récoltées dans le surnageant.

Microscopie de contraste de phase

Un aliquote de 100 μL de tampon (TRIS 5 mM et MES 5 mM, à pH 8.3) avec glucose (50 mM) et KCl (0.1 M), a été placé sur une lame de verre. Ensuite, on a ajouté 20 μL de l'échantillon de GUV dilué 10% (v/v) dans le tampon contenant du saccharose. Les tampons avec glucose et saccharose étaient iso-osmotiques (250 mOsm/L) afin d'éviter une perturbation des GUV. A cause de la différence de densité entre les milieux intérieur et extérieur des GUV, une période de cinq minutes induisait la sédimentation des vésicules, facilitant ainsi leur observation (Dimova et al., 2006). Pour vérifier la sensibilité au pH des GUV, des aliquotes de 2.5 μL de HCl 0.05 M ont été ajoutés à chaque 2 minutes. Après l'ajout de cinq aliquotes d'acide, le pH, mesuré à l'aide d'une microélectrode, était de 4.6 ± 0.6 . Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope inversé (Nikon Eclipse TS100) avec un objectif HMC Nikon spécialisé pour la modulation de contraste d'Hoffman (20X LWD/0.40 - WD 3.1), équipé d'une caméra (Olympus Camedia C-500 Zoom), en utilisant le logiciel NIS-Elements Microscope Imaging Software V4.0. Elles ont été traitées numériquement en utilisant le logiciel FIJI/ImageJ.

Microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

Le rouge du Nil (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$) a été mélangé aux lipides dans la solution de chloroforme (voir la préparation de GUV). La calcéine à être encapsulée à l'intérieur des GUV a été ajoutée à la phase aqueuse lors de la préparation de GUV (0.1 mM dans le tampon TRIS 5 mM, MES 5 mM, à pH 8.3, contenant 215 mM de saccharose). La différence de densité entre les solutions de glucose et de sucrose exploitée en microscopie de phase a aussi été employée en microscope de fluorescence pour faciliter l'observation des GUV. Nous avons utilisé un microscope inversé Leica TCS SP5 équipé d'une lentille à immersion dans l'eau (HCX PlanApo CS 63X/1.2) avec un laser à 561 nm et un laser à ions d'argon, à 488 nm. La vitesse de balayage a été fixée à 400 Hz. Les images ont été produites avec le logiciel de Leica et traités numériquement avec le logiciel FIJI/ImageJ. Les images des liposomes avec le rouge du Nil et la calcéine ont été obtenues en utilisant des $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ 561/600-650 nm et $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ 488/508-540 nm respectivement.

3.2 Résultats et discussion

Formation de GUV

Nous démontrons la formation de GUV de PA/Chol par la méthode d'émulsion double à l'aide de deux techniques de microscopie. Tout d'abord, les échantillons ont été examinés par microscopie de contraste de phase (figure 3.1). On peut observer des GUV qui se présentent comme des objets sphériques dont le diamètre varie principalement entre 2 et 10 μm . Ces objets sont transparents, c'est-à-dire qu'il est possible d'observer la texture de fond au travers ceux-ci. Les GUV sont accompagnées de particules noires et plus petites dont le diamètre varie entre 0.5 et 3 μm . Sur la base des images de fluorescence obtenues avec le rouge du Nil (voir plus bas), ces objets sont associés à des gouttelettes de solvant qui n'ont pas été évaporées durant le processus de la formation de GUV. Par microscopie de phase, il est difficile de différencier les petites GUV des gouttes résiduelles de solvant. On peut aussi observer une texture de fond qui est probablement composée de petites particules (un diamètre de moins de 1 μm) qui peuvent être de petites vésicules, des débris de GUV et/ou des gouttelettes résiduelles de solvant.

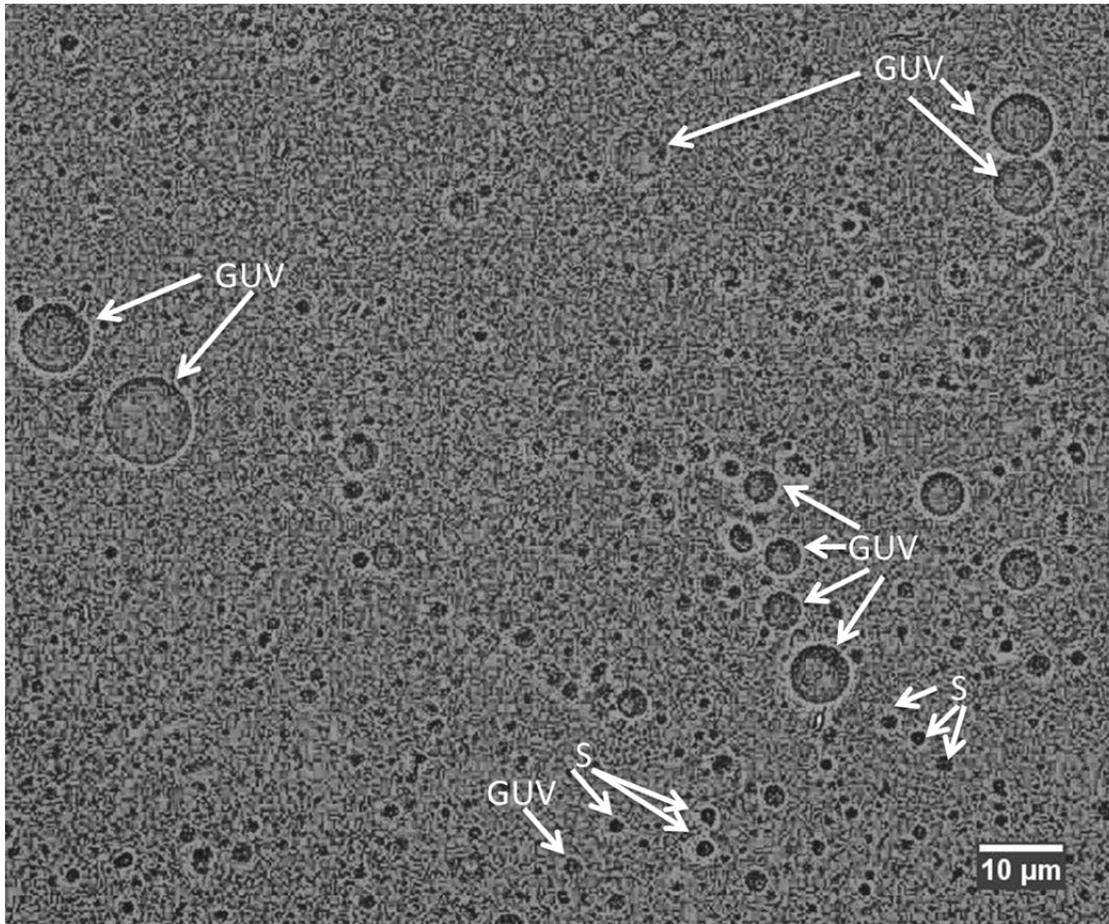


Figure 3.1. Image de GUV de PA/Chol obtenue par microscopie de contraste de phase. Des GUV (GUV) et des gouttelettes de solvant (S) sont identifiées sur l'image.

Dans le but de valider l'identification des GUV par microscopie à contraste de phase, nous avons utilisé la MCBL. Dans un premier temps, afin de nous familiariser avec la technique, nous avons observé des GUV contrôle préparées à partir d'un mélange de POPC/POPG/Chol (30/30/40 mol/mol/mol)(Franzin et al., 1996). La présence de GUV est caractérisée par la fluorescence du rouge du Nil (le canal rouge), un marqueur hydrophobe qui s'insère à l'intérieur de la zone apolaire de la bicouche. Ce

fluorophore définit donc les contours des GUV. On a aussi caractérisé les GUV avec la calcéine (le canal vert), un fluorophore hydrophile encapsulé à l'intérieur des GUV. Ainsi, il est possible d'observer à la fois les parois des GUV et leur volume encapsulé. Les GUV de POPC/POPG/Chol sont présentées à la Figure 3.2. Leur diamètre varie de 1 à 30 μm . Elles sont en grande majorité sphériques. On observe aussi certaines vésicules allongées et des vésicules oligolamellaires. On retrouve une grande variabilité d'intensité de fluorescence de calcéine encapsulée. Dans certaines GUV, l'intensité de fluorescence de la calcéine est très grande. En fait, elle se combine même à la fluorescence rouge associée au rouge du Nil de la paroi des GUV pour donner des pixels jaunes. D'autres GUV semblent vides. Il semble que l'encapsulation du fluorophore ne se soit pas faite d'une manière homogène ou que la perméabilité des GUV serait relativement variable d'une GUV à une autre.

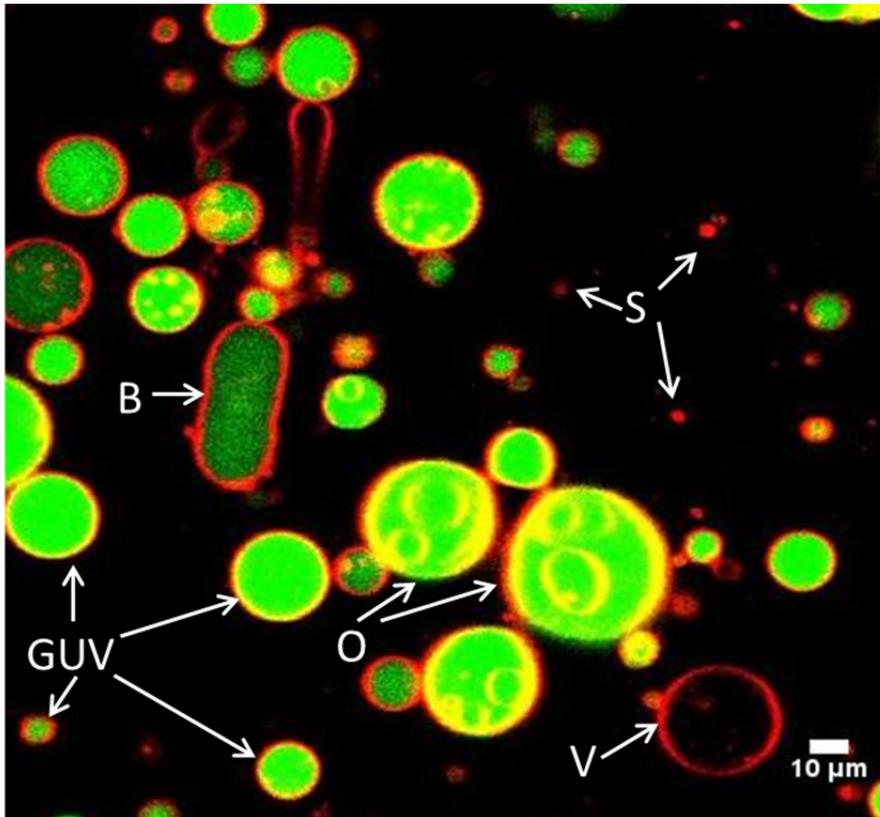


Figure 3.2. Images de MCBL des GUV de POPC/POPG/Chol à pH 8.3 GUV de POPC/POPG/Chol avec calcéine (GUV) et GUV vides (V). GUV allongées (B) et oligolamellaires (O). Gouttelettes de solvant (S).

En utilisant le même protocole que pour les GUV de POPC/POPG/Chol, nous avons caractérisé nos liposomes de PA/Chol. A notre connaissance, la figure 3.3 montre les premiers résultats d'un échantillon de GUV préparées avec un mélange sans phospholipide. Nous observons plusieurs GUV, avec la bicouche marquée au rouge du Nil et l'intérieur marqué à la calcéine. Leur diamètre se situe entre 2 et 8 μm , de manière cohérente avec les images de microscopie en contraste de phase. Elles sont

stables et peuvent être gardées à la température de la pièce pour 15 jours sans un grand changement apparent de morphologie. On peut observer quelques vésicules multilamellaires. On retrouve aussi des particules complètement marquées au rouge du Nil; ces fragments sont vraisemblablement complètement hydrophobes et devraient correspondre à des gouttelettes résiduelles de solvant.

Les micrographies de fluorescence présentées dans la figure 3.4 montrent la co-localisation des deux sondes pour une GUV du mélange PA/Chol et une GUV contrôle du mélange POPC/POPG/Chol. La présence de la GUV est caractérisée par la fluorescence du rouge du Nil (le canal rouge dans la colonne de gauche) et de la calcéine (le canal vert montré dans la colonne de droite). La colonne du centre représente la combinaison des images obtenues à partir des 2 sondes fluorescentes. Ces images confirment solidement la formation de GUV non phospholipidique avec le mélange PA/Chol.

Dans les images obtenues par MCBL, la calcéine à l'intérieur des GUV de PA/Chol montre un aspect granuleux, observable aussi pour les GUV de POPC/POPG/Chol qui semblent avoir une concentration intermédiaire de calcéine. On observe aussi que la paroi des GUV de PA/Chol, marquée au rouge du Nil, montre une forme de croissant. Ces croissants ont toujours la même orientation pour toutes les GUV d'une image. Cette observation suggère que ce phénomène est dû à un artefact optique

associé au balayage par le laser. Présentement, l'origine de ce phénomène est inconnue.

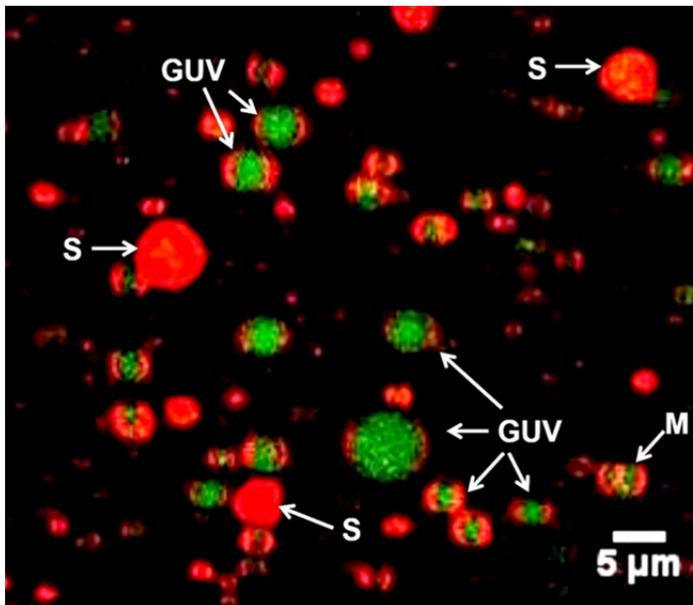


Figure 3.3 Image de MCBL d'un échantillon de GUV préparées avec le mélange PA/Chol, à pH 8.3. Rouge du Nil (le canal rouge) et calcéine (le canal vert), Sur l'image ont été identifiées quelques GUV (GUV), vésicules multilamellaires (M) et gouttelettes de solvant (S).

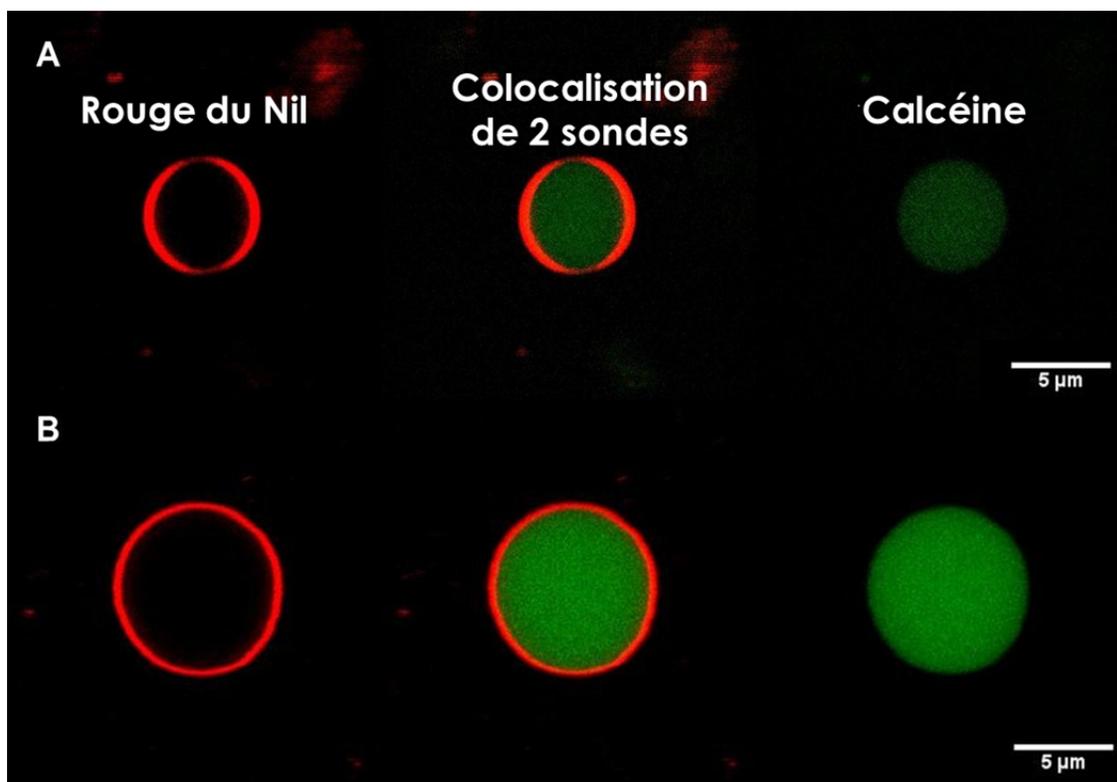


Figure 3.4. Images de MCBL **A)** GUV de PA/Chol et **B)** de POPC/POPG/Chol.

Ces travaux préliminaires nous ont permis de démontrer qu'il est possible de former des GUV non phospholipidiques à partir d'un mélange de PA/Chol. Les LUV préparées avec ce mélange ont montré une imperméabilité remarquable (Bastiat et al., 2007, Phoeung et al., 2009, Cui et al., 2010, Cui et al., 2010, Phoeung et al., 2010). Il est attendu que cette propriété soit partagée par les GUV. De même, ces molécules montrent une résistance chimique plus grande que les phospholipides dans des conditions extrêmes. Par exemple, les liens ester des lipides s'hydrolysent rapidement en milieu basique et les GUV de PA/Chol devraient se montrer plus résistantes dans ces conditions. Les travaux récents de Nicolas Cottenye, un

chercheur postdoctoral dans le groupe Lafleur, confirment la formation des GUV de PA/Chol à pH 8.4 (figure 3.5). Des modifications au niveau du protocole de formation minimisent la présence de gouttelettes de solvant résiduel. De plus, l'utilisation de la microscopie d'épifluorescence permet d'obtenir des images de meilleures qualités pour des GUV marquées à la calcéine (contenu) et au rouge du Nil (paroi).

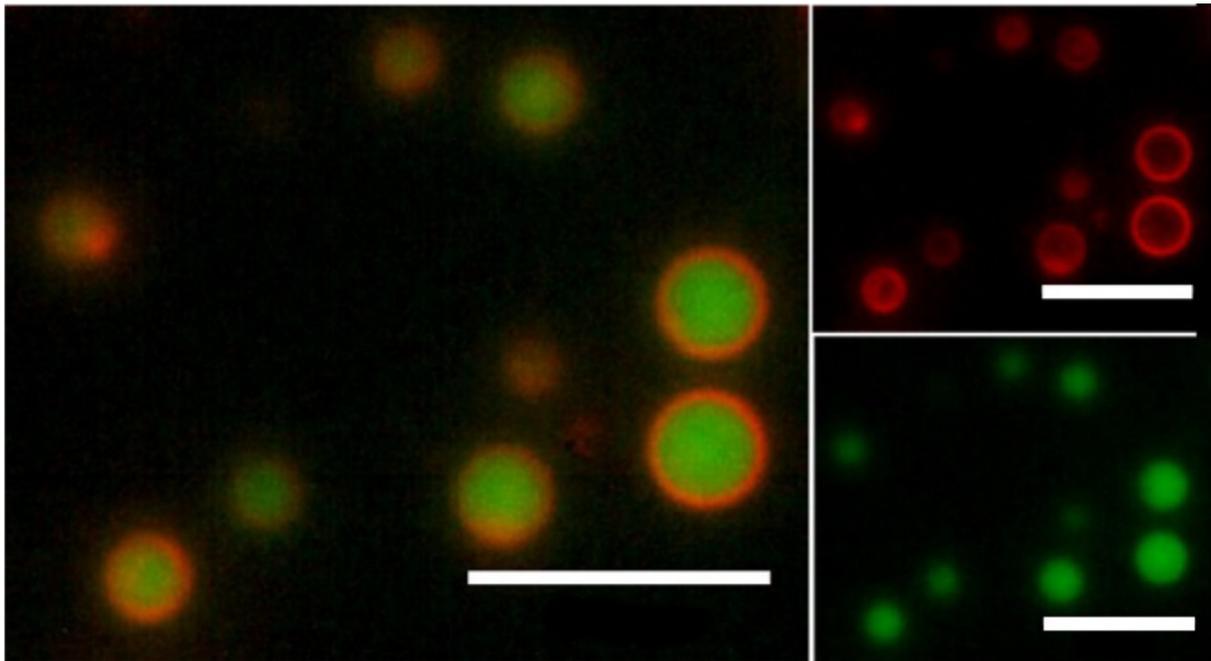


Figure 3.5. Images d'épifluorescence de GUV de PA/Chol à pH 8.4. Le canal rouge correspond aux parois marquées avec le rouge du Nil et le canal vert, à la calcéine encapsulée à l'intérieur des vésicules. L'image à gauche est obtenue par la superposition des deux images de droite. Les barres d'échelle correspondent à 10 μm .

Sensibilité au pH

Il est établi que les bicouches de PA/Chol sont sensibles au pH (Paré et al., 2001, Ouimet et al., 2003, Bastiat et al., 2007, Cui et al., 2010, Phoeung et al., 2010). Nous avons examiné si cette propriété est aussi observée pour les GUV préparées à partir de ce mélange. Au départ, les GUV sont formées à pH 8.3, un pH qui assure la déprotonation du groupement carboxylique (Paré et al., 2001, Ouimet et al., 2003, Bastiat et al., 2007). Dans ce cas, les deux composantes se mélangent de manière à réduire les répulsions électrostatiques entre les PA déprotonés, ce qui conduit à la formation d'une bicouche fluide stable. Premièrement, nous avons étudié l'effet de la diminution de pH sur la morphologie des GUV par microscopie de contraste de phase (figure 3.5). Des images ont été enregistrées lors de la variation progressive du pH induite par des additions d'aliquotes de HCl 0.05 M. Deux minutes après chacune des additions d'acide, une image était enregistrée. Jusqu'à pH 5.6, la GUV de PA/Chol ne subit aucune variation significative de la morphologie; elle demeure sphérique et la taille semble à peu près constante. À pH 4.6, on observe, sur un temps d'environ 2 minutes, la disparition de la vésicule.

Une analyse similaire a été effectuée par MCBL (figure 3.7), ce qui nous permet d'examiner la paroi (avec le rouge du Nil) ainsi que le volume encapsulé (grâce à la calcéine). On observe une évolution similaire à celle obtenue par microscopie à contraste de phase. Entre pH 8.3 et 5.6, la GUV demeure essentiellement inchangée. La microscopie de fluorescence nous permet de plus d'observer qu'il n'y pas de changement significatif de l'intensité de fluorescence de la calcéine

encapsulée à l'intérieur de la GUV. Les fluctuations qui sont observées sont essentiellement dues aux mouvements de la GUV lors de l'addition d'HCl et de l'ajustement légèrement différent du plan focal. Ces résultats indiquent que la GUV demeure intacte et qu'il n'y pas de libération significatif de la sonde lorsqu'on abaisse le pH dans cette gamme de pH. Cependant, entre pH 5.6 et 4.6, il y a une déstabilisation rapide de la GUV entraînant une libération complète de la calcéine. Une fois libérée, la calcéine se dilue rapidement dans le tampon et sa fluorescence disparaît. En parallèle, la fluorescence du rouge du Nil n'est plus observable.

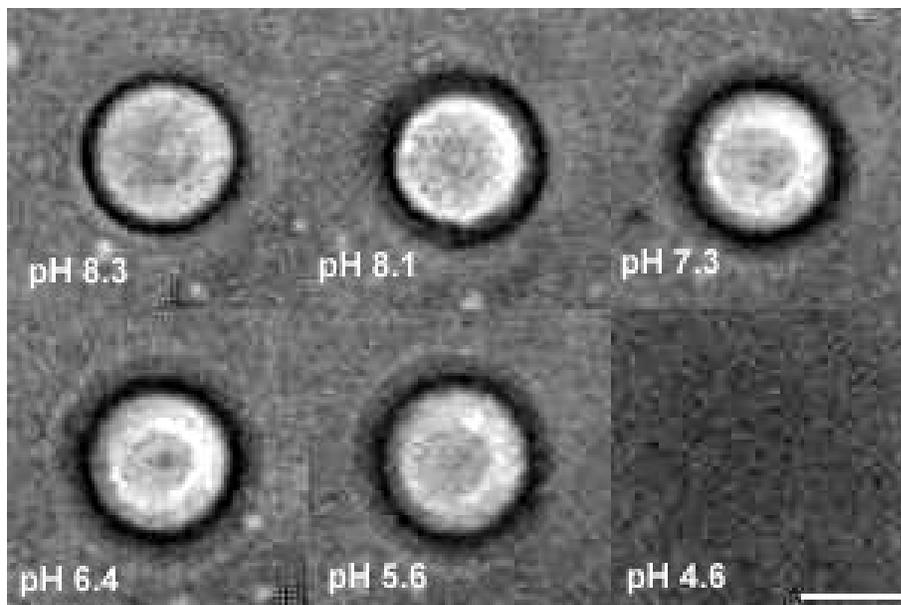


Figure 3.6. Comportement d'une GUV de PA/Chol en fonction du pH observé par microscopie de contraste de phase. La barre d'échelle représente 10 μm .

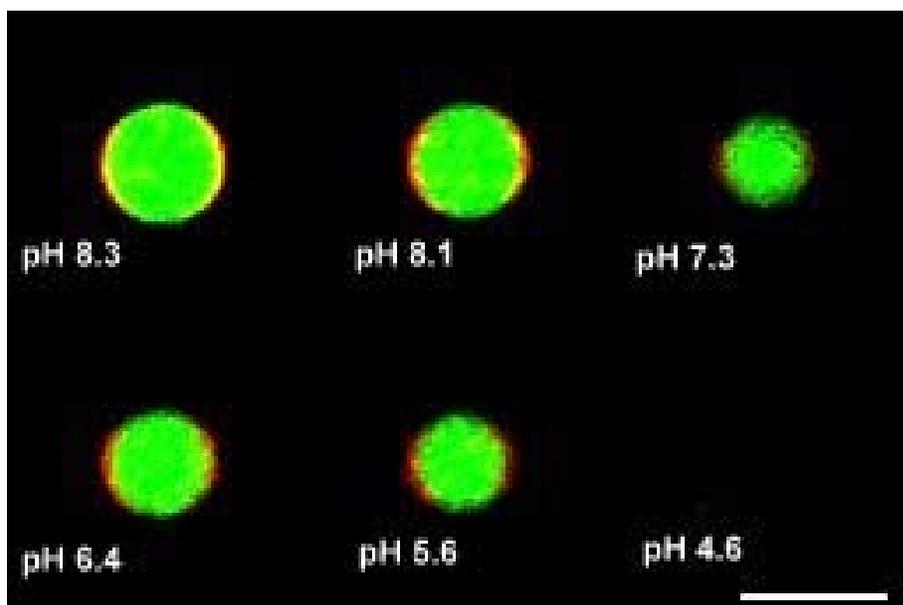


Figure 3.7. Images de MCBL de variation du pH pour une GUV de PA / Chol. La membrane de la GUV est marquée avec le rouge du Nile en rouge et le canal vert correspond à la calcéine dans l'intérieur de la GUV. La barre d'échelle représente 10 μm .

Ces résultats indiquent clairement que les GUV de PA/Chol sont sensibles au pH et cette conclusion est cohérente avec le comportement de LUV du mélange précédemment décrit par notre groupe de recherche (Paré et al., 2001, Bastiat et al., 2007).

3.3. Conclusion

Nos travaux montrent que des GUV de PA/Chol peuvent être obtenues en utilisant la méthode de l'émulsion double. Leur diamètre de la majorité des GUV formées se situe entre 2 et 10 μm . Les GUV de PA/Chol sont stables à la température de la pièce et sensibles au pH, un comportement similaire à celui observé pour les LUV de PA/Chol. On peut obtenir des bicouches fluidiques à partir de différents systèmes d'amphiphiles monoalkylés avec stérol et les LUV sont dérivées de ces systèmes (Cui et al., 2010, Cui et al., 2010, Cui et al., 2012). La formation réussie de GUV de PA / Chol présentée ici indique la possibilité d'élaborer une nouvelle plateforme polyvalente de GUV auto-assemblées, préparées à partir de molécules non phospholipidiques avec différents avantages comme, par exemple, une bonne stabilité chimique, une faible perméabilité, la possibilité de changer la charge de surface et une préparation à partir de composants peu coûteux et biocompatibles.

A notre connaissance, cette réalisation est une double première car il n'y a pas de travaux qui montrent la formation de GUV libres non phospholipidiques préparées à partir d'un amphiphile monoalkylé, ni de GUV sensibles au pH. Il est possible de rendre les liposomes sensibles à d'autres stimuli, tels que la lumière et certains ions, et il sera intéressant d'examiner si ces propriétés, introduites dans les nanovecteurs de façon rationnelle et prévisible par le choix de la composition lipidique, pourront aussi être associées aux GUV non phospholipidiques dont le développement a été amorcé dans le cadre du présent travail.

Chapitre 4

Conclusion Générale

Au cours de ce projet, nous avons montré les propriétés de perméabilité réduite des liposomes formés par le mélange d'un amphiphile monoalkylé et de stérol par rapport à aux liposomes conventionnels phospholipidiques. Cette perméabilité est due à la haute teneur en stérol qui induit un empilement compact des amphiphile et des stérols. Les amphiphiles à chaîne unique peuvent s'insérer dans les interstices entre les molécules de stérol («gap fillers») conduisant à des interactions inter-stérol réduites qui introduisent un caractère fluide dans ces bicouches (Cui et al., 2014). Du point de vue de l'utilisation des nanovecteurs dans l'industrie pharmaceutique, la perméabilité réduite est intéressante car elle permet un entreposage et une circulation de longue durée dans l'hôte avant de cibler des cellules cancérigènes (Park 2002, Ferrari 2005). Ces stérosomes peuvent potentiellement améliorer l'activité thérapeutique d'un agent par l'augmentation du cargo dans les tumeurs. . Par exemple, la vincristine est un médicament anticancer qui est relativement difficile à retenir à l'intérieur de liposomes. Par exemple, la vincristine fuie beaucoup plus rapidement que la doxorubicine à l'extérieur de GUV avec la même composition en lipides (Johnston et al., 2007). Les formulations développées dans le cadre de ce mémoire pourraient présenter des avantages quant à l'encapsulation de cette drogue et d'autres qui présentent des défis d'encapsulation. De plus, la perméabilité réduite est importante parce qu'elle offre plus de protection aux ingrédients pharmaceutiques actifs (IPA) contre des agents de dégradation qui se trouvent dans le milieu d'action

La protection d'un agent est utilisée dans l'industrie des aliments. Il s'agit d'un véritable défi d'encapsuler des ingrédients alimentaires solubles dans l'eau pour les protéger contre la détérioration pendant la durée de conservation du produit alimentaire. Par exemple, la vitamine C est fortement réactive et elle a une mauvaise stabilité en solution. La présence d'oxygène, de radicaux libres, d'enzymes, d'ions métalliques comme le fer (III) et un pH neutre ou basique sont les principales causes de détérioration de l'acide ascorbique dans les produits alimentaires. Pour le protéger de milieux agressifs, l'encapsulation dans des liposomes à perméabilité réduite est une approche distinctive. Contrairement à l'industrie pharmaceutique, qui peut tolérer des coûts élevés, le prix est un élément important pour les applications alimentaires et l'utilisation de molécules biocompatibles et bon marché comme celles utilisées dans les formulations étudiées dans le mémoire présente un avantage économique évident.

Les GUV développées dans ce mémoire pourront aussi être utilisées pour mieux comprendre la micromécanique des films auto-associés très minces. La grande taille des GUV permet la manipulation de vésicules individuelles et l'observation directe, en temps réel, de la progression de transformations associées à des réactions chimiques et physiques. Par exemple, Wick et al. (1996) ont étudié l'impact de l'hydrolyse enzymatique des composantes sur la stabilité de GUV afin de mieux comprendre le rôle de ce processus sur la cellule. Ils ont micro-injecté une solution de phospholipase A2 de venin de serpent à des GUV et l'hydrolyse enzymatique des molécules de lipide de la bicouche a été observée au fil du temps par la

transformation de GUV en temps réel par microscopie optique. De manière inattendue, l'addition de l'enzyme à l'extérieur d'une GUV a provoqué son éclatement, tandis que l'injection à l'échelle de femtolitre de l'enzyme à l'intérieur de la GUV a entraîné une diminution lente et constante dans sa taille, jusqu'à ce qu'elle finisse pour disparaître (Wick et al., 1996). Nous croyons que les GUV dont la composition chimique est très simple, comme celles étudiées dans le cadre du présent travail, contribueront à établir une meilleure compréhension des relations qui unissent les propriétés micromécaniques des liposomes et leur morphologie.

Bibliographie

- Abbas, S., C. Da Wei, K. Hayat et X. Zhang (2012). "Ascorbic acid: Microencapsulation techniques and trends - A review." *Food Reviews International* 28: 343-374.
- Almeida, P. F. F., W. L. C. Vaz et T. E. Thompson (1992). "Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis." *Biochemistry* 31: 6739-6747.
- Ambroggio, E. E., F. Separovic, J. H. Bowie, G. D. Fidelio et L. A. Bagatolli (2005). "Direct visualization of membrane leakage induced by the antibiotic peptides: Maculatin, citropin, and aurein." *Biophysical Journal* 89: 1874-1881.
- Angelova, M. et D. S. Dimitrov (1988). "A mechanism of liposome electroformation". *Trends in Colloid and Interface Science II*. V. Degiorgio, Steinkopff. 76: 59-67.
- Angelova, M. I., R. Mutafchieva, R. Dimova et B. Tenchov (1999). "Shape transformations of giant unilamellar vesicles induced by ethanol and temperature variations." *Physicochemical and Engineering Aspects* 149: 201-205.
- Arseneault, M. et M. Lafleur (2007). "Cholesterol sulphate and Ca²⁺ modulate the mixing properties of lipids in stratum corneum model mixtures." *Biophysical Journal* 92: 99-114.
- Bach, D. et E. Wachtel (2003). "Phospholipid/cholesterol model membranes: formation of cholesterol crystallites." *Biochimica et Biophysica Acta* 1610: 187-197.
- Bagatolli, L. (2009). "Membranes and fluorescence microscopy". *Reviews in fluorescence 2007*, Springer New York. 4: 33-51.
- Bagatolli, L. A., T. Parasassi et E. Gratton (2000). "Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods - A two photon fluorescence microscopy study." *Chemistry and Physics of Lipids* 105: 135-147.
- Ball, G. F. M. (2005). "Vitamins in foods: Analysis, bioavailability, and stability", éditeurs: Taylor & Francis: 289 - 305.

Bandekar, A. et S. Sofou (2012). "Floret-shaped solid domains on giant fluid lipid vesicles induced by pH." *Langmuir* 28: 4113-4122.

Barenholz, Y. (2002). "Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts"." *Progress in Lipid Research* 41: 1-5.

Bastiat, G. et M. Lafleur (2007). "Phase behavior of palmitic acid/cholesterol/cholesterol sulfate mixtures and properties of the derived liposomes." *Journal of Physical Chemistry B* 111: 10929-10937.

Bastiat, G., P. Oliger, G. Karlsson, K. Edwards et M. Lafleur (2007). "Development of non-phospholipid liposomes containing a high cholesterol concentration." *Langmuir* 23: 7695-7699.

Besada, A. (1987). "A facile and sensitive spectrophotometric determination of ascorbic acid." *Talanta* 34: 731-732.

Biegel, C. M. et J. M. Gould (1981). "Kinetics of hydrogen-ion diffusion across phospholipid vesicle membranes." *Biochemistry* 20: 3474-3479.

Bobik, A., A. Grooms, P. J. Little, E. J. Cragoe et S. Grinpukel (1991). "Ethylisopropylamiloride-sensitive pH control mechanisms modulate vascular smooth-muscle cell growth." *American Journal of Physiology* 260: C581-C588.

Bonting, S. L., P. J. van Breugel et F. J. Daemen (1977). "Influence of the lipid environment of the properties of rhodopsin in the photoreceptor membrane." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 83: 175-189.

Brunner, J., D. E. Graham, H. Hauser et G. Semenza (1980). "Ion and sugar permeabilities of lecithin bilayers - Comparison of curved and planar bilayers." *Journal of Membrane Biology* 57: 133-141.

Bucher, P., A. Fischer, P. L. Luisi, T. Oberholzer et P. Walde (1998). "Giant vesicles as biochemical compartments: The use of microinjection techniques." *Langmuir* 14: 2712-2721.

Buettner, G. R. (1993). "The pecking order of free-radicals and antioxidants - Lipid-peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300: 535-543.

Buettner, G. R. et B. A. Jurkiewicz (1996). "Catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid." *Radiation Research* 145: 532-541.

Cafiso, D. S. et W. L. Hubbell (1983). "Electrogenic H⁺/OH⁻ movement across phospholipid vesicles measured by spin-labeled hydrophobic ions." *Biophysical Journal* 44: 49-57.

Claessens, M. M. A. E., F. A. M. Leermakers, F. A. Hoekstra et M. A. C. Stuart (2008). "Osmotic shrinkage and reswelling of giant vesicles composed of dioleoylphosphatidylglycerol and cholesterol." *Biochimica et Biophysica Acta* 1778: 890-895.

Clement, N. R. et J. M. Gould (1981). "Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen-ion concentration in phospholipid-vesicles." *Biochemistry* 20: 1534-1538.

Coates, P. M. (2010). "Encyclopedia of dietary supplements", Informa Healthcare.

Corvera, E., O. G. Mouritsen, M. A. Singer et M. J. Zuckermann (1992). "The permeability and the effect of acyl-chain length for phospholipid bilayers containing cholesterol: theory and experiment." *Biophysical Journal* 1107: 261-270.

Cui, Z.-K., G. Bastiat, C. Jin, A. Keyvanloo et M. Lafleur (2010). "Influence of the nature of the sterol on the behavior of palmitic acid/sterol mixtures and their derived liposomes." *Biochimica et Biophysica Acta* 1798: 1144-1152.

Cui, Z.-K., G. Bastiat et M. Lafleur (2010). "Formation of fluid lamellar phase and large unilamellar vesicles with octadecyl methyl sulfoxide/cholesterol mixtures." *Langmuir* 26: 12733-12739.

Cui, Z.-K., A. Bouisse, N. Cottenye et M. Lafleur (2012). "Formation of pH-sensitive cationic non phospholipid liposomes with monoalkylated primary amine and cholesterol." *Langmuir* 28: 13668-13674.

Cui, Z.-K. et M. Lafleur (2014). "Lamellar self-assemblies of single-chain amphiphiles and sterols and their derived liposomes: Distinct compositions and distinct properties." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 114: 177-185.

Cullis, P. R., D. B. Fenske et M. J. Hope (**1996**). "Chapter 1 Physical properties and functional roles of lipids in membranes". *New Comprehensive Biochemistry*. E. V. éditeurs: Dennis and E. V. Jean, Elsevier. Volume 31: 1-33.

Cullis, P. R., M. J. Hope et C. P. S. Tilcock (**1986**). "Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes." *Chemistry and Physics of Lipids* 40: 127-144.

Davey, M. W., M. Van Montagu, D. Inze, M. Sanmartin, A. Kanellis, N. Smirnoff, I. J. J. Benzie, J. J. Strain, D. Favell et J. Fletcher (**2000**). "Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 825-860.

Deamer, D. W. (**1987**). "Proton permeation of lipid bilayers." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 19: 457-479.

Deamer, D. W. et J. W. Nichols (**1983**). "Proton-hydroxide permeability of liposomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 165-168.

Deamer, D. W. et J. W. Nichols (**1989**). "Proton flux mechanism in model and biological membranes." *Journal of Membrane Biology* 107: 91-103.

Decoursey, T. E. (**2003**). "Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways." *Physiological Reviews* 83: 475-579.

Dimova, R., S. Aranda, N. Bezlyepkina, V. Nikolov, K. A. Riske et R. Lipowsky (**2006**). "A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy." *Journal of Physics-Condensed Matter* 18: S1151-S1176.

Dubey, V., D. Mishra, M. Nahar et N. K. Jain (**2007**). "Vesicles as tools for the modulation of skin permeability." *Expert Opinion on Drug Delivery* 4: 579-593.

Eberlin, L. S., A. L. Dill, A. B. Costa, D. R. Iffa, L. Cheng, T. Masterson, M. Koch, T. L. Ratliff et R. G. Cooks (**2010**). "Cholesterol sulfate imaging in human prostate cancer tissue by desorption electrospray ionization mass spectrometry." *Analytical Chemistry* 82: 3430-3434.

Faure, C. et E. J. Dufourc (**1997**). "The thickness of cholesterol sulfate-containing membranes depends upon hydration." *Biochimica et Biophysica Acta* 1330: 248-252.

Faure, C., J.-F. Tranchant et E. J. Dufourc (1996). "Comparative effects of cholesterol and cholesterol sulfate on hydration and ordering of dimyristoylphosphatidylcholine membranes." *Biophysical Journal* 70: 1380-1390.

Ferrari, M. (2005). "Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges." *Nature Reviews Cancer* 5: 161-171.

Filippov, A., G. Oradd et G. Lindblom (2003). "The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers." *Biophysical Journal* 84: 3079-3086.

Filippov, A. V., M. A. Rudakova, G. Oradd et J. Lindblom (2007). "Lateral diffusion of saturated phosphatidylcholines in cholesterol-containing bilayers." *Biofizika* 52: 476-485.

Finkelstein, A. et A. Cass (1967). "Effect of cholesterol on the water permeability of thin lipid membranes." *Nature* 216: 717-718.

Fischer, A., A. Franco et T. Oberholzer (2002). "Giant vesicles as microreactors for enzymatic mRNA synthesis." *Chembiochem* 3: 409-417.

Franzin, C. M. et P. M. MacDonald (1996). "²H NMR detection of transmembrane potential-driven tetraphenylphosphonium transbilayer redistribution." *Biochemistry* 35: 851-858.

Gerson, D. F. et A. C. Burton (1977). "The relation of cycling of intracellular pH to mitosis in the acellular slime mould *Physarum polycephalum*." *Journal of Cellular Physiology* 91: 297-303.

Gibbs, B. F., S. Kermasha, I. Alli et C. N. Mulligan (1999). "Encapsulation in the food industry: a review." *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 50: 213-224.

Giuliano, K. A. et R. J. Gillies (1987). "Determination of intracellular pH of BALB/c-3T3 cells using the fluorescence of pyranine." *Analytical Biochemistry* 167: 362-371.

Gryniewicz, G., M. Poenie et R. Y. Tsien (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *The Journal of Biological Chemistry* 260: 3440-3450.

Guenin, E. P. et J. L. Zatz (1994). "Effect of salicylic acid encapsulation by phospholipid-vesicles on transport through an inert membrane." *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 45: 229-238.

Gutknecht, J. (1987). "Proton conductance through phospholipid bilayers: water wires or weak acids?" *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 19: 427-442.

Gutknecht, J. (1987). "Proton/hydroxide conductance and permeability through phospholipid bilayer membranes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 6443-6446.

Haines, T. H. (2001). "Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers?" *Progress in Lipid Research* 40: 299-324.

Hamilton, R. T. et E. W. Kaler (1990). "Alkali-metal ion -transport through thin bilayers " *Journal of Physical Chemistry* 94: 2560-2566.

Hamilton, R. T. et E. W. Kaler (1990). "Facilitated ion-transport through thin bilayers " *Journal of Membrane Science* 54: 259-269.

Han, J. et K. Burgess (2010). "Fluorescent Indicators for Intracellular pH." *Chemical Reviews* 110: 2709-2728.

Harroun, T. A., J. Katsaras et S. R. Wassall (2006). "Cholesterol hydroxyl group is found to reside in the center of a polyunsaturated lipid membrane." *Biochemistry* 45: 1227-1233.

Hauser, H., D. Oldani et M. C. Phillips (1973). "Mechanism of ion escape from phosphatidylcholine and phosphatidylserine single bilayer vesicles." *Biochemistry* 12: 4507-4517.

Hotani, H., F. Nomura et Y. Suzuki (1999). "Giant liposomes: From membrane dynamics to cell morphogenesis." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 4: 358-368.

Hunt, C. A. et S. Tsang (1981). "Alpha-tocopherol retards autoxidation and prolongs the shelf-life of liposomes " *International Journal of Pharmaceutics* 8: 101-110.

Israelachvili, J. (1991). "Intermolecular and surface forces". *Intermolecular and surface forces, 2th edition*. J. Israelachvili. London, Academic Press inc.

Johnston, M. J. W., S. C. Semple, S. K. Klimuk, S. Ansell, N. Maurer et P. R. Cullis (2007). "Characterization of the drug retention and pharmacokinetic properties of liposomal nanoparticles containing dihydrosphingomyelin." *Biochimica et Biophysica Acta* 1768: 1121-1127.

Kahya, N., D. A. Wiersma et B. Poolman (2002). "Morphology and fine structure of membranes upon osmotic upshifts." *Journal of Fluorescence* 12: 193-196.

Kamp, F. et J. A. Hamilton (1992). "pH gradients across phospholipid-membranes caused by fast flip-flop of unionized fatty-acids." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 11367-11370.

Kano, K. et J. H. Fendler (1978). "Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles." *Biochimica et Biophysica Acta* 509: 289-299.

Karant, H. et R. S. R. Murthy (2007). "pH-sensitive liposomes - principle and application in cancer therapy." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59: 469-483.

Kato, K., P. Walde, H. Mitsui et N. Higashi (2003). "Enzymatic activity and stability of D-fructose dehydrogenase and sarcosine dehydrogenase immobilized onto giant vesicles." *Biotechnology and Bioengineering* 84: 415-423.

Kelusky, E. C., E. J. Dufourc et I. C. P. Smith (1983). "Direct observation of molecular ordering of cholesterol in human erythrocyte membranes." *Biochimica et Biophysica Acta* 735: 302-304.

Kessel, A., N. Ben-Tal et S. May (2001). "Interactions of cholesterol with lipid bilayers : The preferred configuration and fluctuations." *Biophysical Journal* 81: 643-658.

Killian, J. A. (1998). "Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes." *Biochimica et Biophysica Acta* 1376: 401-416.

Kirby, C. et G. Gregoriadis (1984). "Dehydration-rehydration vesicles - A simple method for high-yield drug entrapment in liposomes " *Bio-Technology* 2: 979-984.

Kirby, C. J., C. J. Whittle, N. Rigby, D. T. Coxon et B. A. Law (1991). "Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes." *International Journal of Food Science and Technology* 26: 437-449.

Kizildereli, N., A. Gelir, O. Guney et Y. Yilmaz (2010). "Theoretical confirmation of in situ monitoring of monomer conversion during acrylamide polymerization via pyranine flouorprobe." *Journal of Applied Polymer Science* 115: 2455-2459.

Knop, K., R. Hoogenboom, D. Fischer et U. S. Schubert (2010). "Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives." *Angewandte Chemie-International Edition* 49: 6288-6308.

Ko, J. Y., S. M. Choi, Y. M. Rhee, J. L. Beauchamp et H. I. Kim (2012). "Studying interfacial reactions of cholesterol sulfate in an unsaturated phosphatidylglycerol layer with ozone using field induced droplet ionization mass spectrometry." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 23: 141-152.

Krishnamoorthy, G. et P. C. Hinkle (1984). "Non-ohmic proton conductance of mitochondria and liposomes." *Biochemistry* 23: 1640-1645.

Krishnamoorthy, I. et G. Krishnamoorthy (2001). "Probing the link between proton transport and water content in lipid membranes." *Journal of Physical Chemistry B* 105: 1484-1488.

Kurihara, K., M. Tamura, K.-i. Shohda, T. Toyota, K. Suzuki et T. Sugawara (2011). "Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA." *Nature Chemistry* 3: 775-781.

Kuroda, O., H. Seto, T. Narita, M. Yamanaka et Y. Oishi (2011). "Liposome deformation by imbalance of pH and ionic strength across the membrane". *Trends in Colloid and Interface Science XXIV*. V. Starov and K. Prochazka. 138: 49-53.

Kuyper, C. L., J. S. Kuo, S. A. Mutch et D. T. Chiu (2006). "Proton permeation into single vesicles occurs via a sequential two-step mechanism and is heterogeneous." *Journal of the American Chemical Society* 128: 3233-3240.

Lande, M. B., J. M. Donovan et M. L. Zeidel (1995). "The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia and protons." *Journal of General Physiology* 106: 67-84.

Langlais, J., M. Zollinger, L. Plante, A. Chapdelaine, G. Bleau et K. D. Roberts (1981). "Localization of cholesteryl sulfate in human-spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation " *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 78: 7266-7270.

Lee, A. G. (2003). "Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective." *Biochimica et Biophysica Acta* 1612: 1-40.

Leontiadou, H., A. E. Mark et S.-J. Marrink (2007). "Ion transport across transmembrane pores." *Biophysical Journal* 92: 4209-4215.

Levine, M., K. R. Dhariwal, P. W. Washko, J. D. Butler, R. W. Welch, Y. H. Wang et P. Bergsten (1991). "Ascorbic acid and in situ kinetics - A new approach to vitamin requirements " *American Journal of Clinical Nutrition* 54: S1157-S1162.

Liao, M. L. et P. A. Seib (1988). "Chemistry of L-ascorbic-acid related to foods." *Food Chemistry* 30: 289-312.

Liebler, D. C., D. S. Kling et D. J. Reed (1986). "Antioxidant protection of phospholipid-bilayers by alpha-tocopherol - Control of alpha-tocopherol status and lipid-peroxidation by ascorbic-acid and glutathione " *Journal of Biological Chemistry* 261: 2114-2119.

Luykx, D. M. A. M., R. J. B. Peters, S. M. van Ruth et H. Bouwmeester (2008). "A review of analytical methods for the identification and characterization of nano delivery systems in food." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 8231-8247.

Mahoney, J. R. et E. Graf (1986). "Role of alpha-tocopherol, ascorbic-acid, citric-acid and EDTA as antioxidants in model systems." *Journal of Food Science* 51: 1293-1296.

Mannock, D. A., R. N. A. H. Lewis, T. P. W. McMullen et R. N. McElhaney (2010). "The effect of variations in phospholipid and sterol structure on the nature of lipid-sterol interactions in lipid bilayer model membranes." *Chemistry and Physics of Lipids* 163: 403-448.

Mayer, L. D., M. B. Bally et P. R. Cullis (1990). "Strategies for optimizing liposomal doxorubicin." *Journal of Liposome Research* 1: 463-480.

McMullen, T. P. W., R. N. A. H. Lewis et R. N. McElhaney (1993). "Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines." *Biochemistry* 32: 516-522.

McMullen, T. P. W. et R. N. McElhaney (1995). "New aspects of the interaction of cholesterol with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as revealed by high-

sensitivity differential scanning calorimetry." *Biochimica et Biophysica Acta* 1234: 90-98.

Menger, F. M. et J. S. Keiper (1998). "Chemistry and physics of plant vesicles as biomembrane models." *Current Opinion in Chemical Biology* 2: 726-732.

Menger, F. M. et S. J. Lee (1995). "Induced morphological-changes in synthetic giant vesicles - Growth, fusion, undulation, excretion, wounding and healing." *Langmuir* 11: 3685-3689.

Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism " *Nature* 191: 144-148.

Mitchell, P. (1972). "Chemiosmotic coupling in energy transduction - Logical development of biochemical knowledge." *Journal of Bioenergetics* 3: 5-24.

Morigaki, K. et P. Walde (2002). "Giant vesicle formation from oleic acid/sodium oleate on glass surfaces induced by adsorbed hydrocarbon molecules." *Langmuir* 18: 10509-10511.

Moscho, A., O. Orwar, D. T. Chiu, B. P. Modi et R. N. Zare (1996). "Rapid preparation of giant unilamellar vesicles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 11443-11447.

Mouritsen, O. G. (2005). "Life - As Matter of Fat. The emerging Science of Lipidomics", éditeurs: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Mouritsen, O. G. (2011). "Lipidology and lipidomics-quo vadis? A new era for the physical chemistry of lipids." *Physical Chemistry Chemical Physics* 13: 19195-19205.

Mouritsen, O. G. et M. Bloom (1984). "Mattress model of lipid-protein interactions in membranes." *Biophysical Journal* 46: 141-153.

Mozafari, M. R., J. Flanagan, L. Matia-Merino, A. Awati, A. Omri, Z. E. Suntres et H. Singh (2006). "Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 2038-2045.

Muskiet, F. A. J., G. Jansen, B. G. Wolthers, A. Marinkovicilsen et P. C. V. Vader (1983). "Gas-chromatographic determination of cholesterol sulfate in plasma and

erythrocytes, for the diagnosis of recessive X-linked ichthyosis " *Clinical Chemistry* 29: 1404-1407.

Nappini, S., T. Al Kayal, D. Berti, B. Norden et P. Baglioni (2011). "Magnetically triggered release from giant unilamellar vesicles: Visualization by means of confocal microscopy." *Journal of Physical Chemistry Letters* 2: 713-718.

Nayar, R., M. J. Hope et P. R. Cullis (1989). "Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique." *Biochimica et Biophysica Acta* 986: 200-206.

Nichols, J. W. et R. F. Abercrombie (2010). "A view of hydrogen/hydroxide flux across lipid membranes." *Journal of Membrane Biology* 237: 21-30.

Nichols, J. W., M. W. Hill, A. D. Bangham et D. W. Deamer (1980). "Measurement of net proton-hydroxyl permeability of large unilamellar liposomes with the fluorescent pH probe, 9-aminoacridine." *Biochimica et Biophysica Acta* 596: 393-403.

Niki, E. (1991). "Action of ascorbic-acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals " *American Journal of Clinical Nutrition* 54: S1119-S1124.

Nohynek, G. J., J. Lademann, C. Ribaud et M. S. Roberts (2007). "Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety." *Critical Reviews in Toxicology* 37: 251-277.

Noireaux, V. et A. Libchaber (2004). "A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 17669-17674.

Norlén, L., I. Nicander, A. Lundsjö, T. Cronholm et B. Forslind (1998). "A new HPLC-based method for the quantitative analysis in inner stratum corneum lipids with a special preference to the free fatty acid fraction." *Archives of Dermatological Research* 290: 508-516.

Nozaki, Y. et C. Tanford (1981). "Proton and hydroxide ion permeability of phospholipid vesicles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 4324-4328.

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

Olson, J. A. et R. E. Hodges (1987). "Recommended dietary intakes (RDI) of Vitamin-C in humans." *American Journal of Clinical Nutrition* 45: 693-703.

Ouimet, J., S. Croft, C. Pare, J. Katsaras et M. Lafleur (2003). "Modulation of the polymorphism of the palmitic acid/cholesterol system by the pH." *Langmuir* 19: 1089-1097.

Ouimet, J. et M. Lafleur (2004). "Hydrophobic match between cholesterol and saturated fatty acid is required for the formation of lamellar liquid ordered phases." *Langmuir* 20: 7474-7481.

Padayatty, S. J., A. Katz, Y. H. Wang, P. Eck, O. Kwon, J. H. Lee, S. L. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S. K. Dutta et M. Levine (2003). "Vitamin-C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention." *Journal of the American College of Nutrition* 22: 18-35.

Papahadj.D (1971). "Na⁺-K⁺ discrimination by pure phospholipid membranes." *Biochimica et Biophysica Acta* 241: 254-&.

Papahadj.D, S. Nir et S. Ohki (1972). "Permeability properties of phospholipid membranes - Effect of cholesterol and temperature." *Biochimica et Biophysica Acta* 266: 561-583.

Paré, C. et M. Lafleur (2001). "Formation of liquid ordered lamellar phases in the palmitic acid/cholesterol system." *Langmuir* 17: 5587-5594.

Park, J. W. (2002). "Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment." *Breast cancer research* 4: 95-99.

Paula, S., A. G. Volkov, A. N. VanHoek, T. H. Haines et D. W. Deamer (1996). "Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness." *Biophysical Journal* 70: 339-348.

Perkins, W. R. et D. S. Cafiso (1986). "An electrical and structural characterization of H⁺/OH⁻ currents in phospholipid vesicles." *Biochemistry* 25: 2270-2276.

Phoeung, T., P. Aubron, G. Rydzek et M. Lafleur (2010). "pH-triggered release from nonphospholipid LUV modulated by the pKa of the included fatty acid." *Langmuir* 26: 12769-12776.

Phoeung, T., L. M. Huber et M. Lafleur (2009). "Cationic detergent/sterol mixtures can form fluid lamellar phases and stable unilamellar vesicles." *Langmuir* 25: 5778-5784.

Pohl, W. G. (1982). "Kinetics of proton-hydroxyl transport across lecithin vesicle membranes as measured with a lipid pH-indicator." *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C: Biosciences* 37: 120-128.

Quemeneur, F., M. Rinaudo et B. Pepin-Donat (2008). "Influence of molecular weight and pH on adsorption of chitosan at the surface of large and giant vesicles." *Biomacromolecules* 9: 396-402.

Rog, T., M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen et M. Karttunen (2009). "Ordering effects of cholesterol and its analogues." *Biochimica et Biophysica Acta* 1788: 97-121.

Rossignol, M., P. Thomas et C. Grignon (1982). "Proton permeability of liposomes from natural phospholipid mixtures." *Biochimica et Biophysica Acta* 684: 195-199.

Rudel, L. L. et M. D. Morris (1973). "Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde." *Journal of Lipid Research* 14: 364-366.

Saito, H., Y. Kato, M. Le Berre, A. Yamada, T. Inoue, K. Yosikawa et D. Baigl (2009). "Time-resolved tracking of a minimum gene expression system reconstituted in giant liposomes." *Chembiochem* 10: 1640-1643.

Saito, H. et W. Shinoda (2011). "Cholesterol effect on water permeability through DPPC and PSM lipid bilayers: A molecular dynamics study." *Journal of Physical Chemistry B* 115: 15241-15250.

Santé-Canada (2007). Monographie des suppléments de multivitamines/minéraux, Ottawa (ON) : Santé Canada.

Simard, J. R., F. Kamp et J. A. Hamilton (2008). "Measuring the adsorption of fatty acids to phospholipid vesicles by multiple fluorescence probes." *Biophysical Journal* 94: 4493-4503.

Singh, A., P. E. Schoen et M. A. Guedeau-Boudeville (1998). "Temperature dependent membrane phase reorganization in giant vesicles." *Chemistry and Physics of Lipids* 94: 53-61.

Smondryev, A. M. et M. L. Berkowitz (2000). "Molecular dynamics simulation of dipalmitoylphosphatidylcholine membrane with cholesterol sulfate." *Biophysical Journal* 78: 1672-1680.

Stachowiak, J. C., D. L. Richmond, T. H. Li, A. P. Liu, S. H. Parekh et D. A. Fletcher (2008). "Unilamellar vesicle formation and encapsulation by microfluidic jetting." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 4697-4702.

Steskova, A., M. Morochovicova et E. Leskova (2006). "Vitamin C degradation during storage of fortified foods." *Journal of Food and Nutrition Research* 45: 55-61.

Strott, C. A. et Y. Higashi (2003). "Cholesterol sulfate in human physiology: what's it all about?" *Journal of Lipid Research* 44: 1268-1278.

Sugahara, M., M. Uragami et S. L. Regen (2002). "Selective sterol-phospholipid associations in fluid bilayers." *Journal of the American Chemical Society* 124: 4253-4256.

Taylor, T. M., P. M. Davidson, B. D. Bruce et J. Weiss (2005). "Liposomal nanocapsules in science and agriculture " *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 587-605.

Torchilin, V. P. (2005). "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers." *Nature Reviews Drug Discovery* 4: 145-160.

Toyota, T., K. Takakura et T. Sugawara (2004). "Temporal emergence of giant vesicles accompanied by hydrolysis of ammonium amphiphiles with a Schiff-base segment." *Chemistry Letters* 33: 1442-1443.

Trier, S., J. R. Henriksen et T. L. Andresen (2011). "Membrane fusion of pH-sensitive liposomes - a quantitative study using giant unilamellar vesicles." *Soft Matter* 7: 9027-9034.

Tsumoto, K., H. Matsuo, M. Tomita et T. Yoshimura (2009). "Efficient formation of giant liposomes through the gentle hydration of phosphatidylcholine films doped with sugar." *Colloids and Surfaces B* 68: 98-105.

Vandeenen, L. L. M., J. A. F. Opdenkamp, B. Roelofsen et K. W. A. Wirtz (1982). "On membrane phospholipids and protein-lipid association." *Pure and Applied Chemistry* 54: 2443-2454.

Vist, M. R. et J. H. Davis (1990). "Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: ²H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry." *Biochemistry* 29: 451-464.

Walde, P., K. Cosentino, H. Engel et P. Stano (2010). "Giant vesicles: Preparations and applications." *ChemBiochem* 11: 848-865.

Webb, R. J., J. M. East, R. P. Sharma et A. G. Lee (1998). "Hydrophobic mismatch and the incorporation of peptides into lipid bilayers: A possible mechanism for retention in the Golgi." *Biochemistry* 37: 673-679.

Wechtersbach, L., N. Poklar et B. Cigić (2012). "Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices." *LWT Food Science and Technology* 45: 43-49.

Wegrzyn, I., G. D. M. Jeffries, B. Nagel, M. Katterle, S. R. Gerrard, T. Brown, O. Orwar et A. Jesorka (2011). "Membrane protrusion coarsening and nanotubulation within giant unilamellar vesicles." *Journal of the American Chemical Society* 133: 18046-18049.

Wick, R., M. I. Angelova, P. Walde et P. L. Luisi (1996). "Microinjection into giant vesicles and light microscopy investigation of enzyme-mediated vesicle transformations." *Chemistry & Biology* 3: 105-111.

Willoughby, D., R. C. Thomas et C. J. Schwiening (1998). "Comparison of simultaneous pH measurements made with 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulphonic acid (HPTS) and pit-sensitive microelectrodes in snail neurones." *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 436: 615-622.

Wolfbeis, O. S., E. Förlinger, H. Kroneis et H. Marsoner (1983). "Fluorimetric analysis." *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 314: 119-124.

Yeagle, P. L. (1991). "Modulation of membrane-function by cholesterol " *Biochimie* 73: 1303-1310.

Zlatkis, A. et B. Zak (1969). "Study of a new cholesterol reagent." *Analytical Biochemistry* 29: 143-148.