

Université de Montréal

**Études des interactions détergents/lipides dans les
systèmes membranaires**

par

Thida Phoeung

Département de chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Thèse présentée à la Faculté des Études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D.)
en chimie

Décembre 2010

© Thida Phoeung, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée intitulée :

Études des interactions détergents/lipides dans les systèmes membranaires

Présentée par :
Thida Phoeung

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Antonella Badia, président-rapporteur
Michel Lafleur, directeur de recherche
Françoise Winnick, membre du jury
Michèle Auger, examinateur externe
Grégoire Leclair, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les liposomes sont des structures sphériques formés par l'auto-assemblage de molécules amphiphiles sous forme d'une bicouche. Cette bicouche sépare le volume intérieur du liposome du milieu extérieur, de la même manière que les membranes cellulaires. Les liposomes sont donc des modèles de membranes cellulaires et sont formulés pour étudier les processus biologiques qui font intervenir la membrane (transport de molécules à travers la membrane, effets des charges en surface, interactions entre la matrice lipidique et d'autres molécules, etc.). Parce qu'ils peuvent encapsuler une solution aqueuse en leur volume intérieur, ils sont aussi utilisés aujourd'hui comme nanovecteurs de principes actifs.

Nous avons formulé des liposomes non-phospholipidiques riches en stérol que nous avons appelés stérosomes. Ces stérosomes sont composés d'environ 30 % d'amphiphiles monoalkylés et d'environ 70 % de stérols (cholestérol, Chol, et/ou sulfate de cholestérol, Schol). Quand certaines conditions sont respectées, ces mélanges sont capables de former une phase liquide ordonnée (L_o) pour donner, par extrusion, des vésicules unilamellaires. Certaines de ces nouvelles formulations ont été fonctionnalisées de manière à libérer leur contenu en réponse à un stimulus externe. En incorporant des acides gras dérivés de l'acide palmitique possédant différents pKa, nous avons pu contrôler le pH auquel la libération débute. Un modèle mathématique a été proposé afin de cerner les paramètres régissant leur comportement de libération. En incorporant un amphiphile sensible à la lumière (un dérivé de l'azobenzène), les liposomes formés semblent répondre à une radiation lumineuse. Pour ce système, il serait probablement nécessaire de tracer le diagramme de phase du mélange afin de contrôler la photo-libération de l'agent encapsulé. Nous avons aussi formulé des

liposomes contenant un amphiphile cationique (le chlorure de cétypyridinium). En tant que nanovecteurs, ces stérosomes montrent un potentiel intéressant pour la libération passive ou contrôlée de principes actifs. Pour ces systèmes, nous avons développé un modèle pour déterminer l'orientation des différentes molécules dans la bicouche.

La formation de ces nouveaux systèmes a aussi apporté de nouvelles connaissances dans le domaine des interactions détergents-lipides. Aux nombreux effets du cholestérol (Chol) sur les systèmes biologiques, il faut ajouter maintenant que les stérols sont aussi capables de forcer les amphiphiles monoalkylés à former des bicouches. Cette nouvelle propriété peut avoir des répercussions sur notre compréhension du fonctionnement des systèmes biologiques.

Enfin, les amphiphiles monoalkylés peuvent interagir avec la membrane et avoir des répercussions importantes sur son fonctionnement. Par exemple, l'effet antibactérien de détergents est supposé être dû à leur insertion dans la membrane. Cette insertion est régie par l'affinité existant entre le détergent et cette dernière. Dans ce cadre, nous avons voulu développer une nouvelle méthode permettant d'étudier ces affinités. Nous avons choisi la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) pour sa sensibilité. Les hypothèses permettant de déterminer cette constante d'affinité se basent sur l'incapacité du détergent à exalter le signal SERS lorsque le détergent est inséré dans la membrane. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus par titration calorimétrique isotherme (ITC). Les résultats ont montré des différences. Ces différences ont été discutées.

Mots-clés : liposomes, membranes, détergents, acides gras, amphiphiles monoalkylés, cholestérol, stérol, constante d'affinité, libération passive, libération contrôlée, RMN, fluorescence, FTIR, SERS, ITC.

Abstract

Liposomes are spherical structures formed by the self-assembly of amphiphilic molecules to form bilayers. The bilayer separates the interior volume of the liposome from the external milieu, as do cellular membranes. Liposomes are cellular membrane models and are used to study biological processes that occur in relation with the membrane (molecular transport across the membrane, surface charge effects, interactions between the lipid matrix and other molecules, etc.). Because they can encapsulate an aqueous solution in their interior volume, they are also used as nanovectors of active agents.

We have formulated non-phospholipid liposomes enriched in sterol that we have named sterosomes. These sterosomes are composed of approximately 30 % of monoalkylated amphiphiles and around 70 % of sterols (cholesterol, Chol, and/or cholesterol sulfate, Schol). Under certain conditions, these mixtures are able to form a liquid ordered phase (L_o) and unilamellar vesicles by extrusion. Some of these new formulations were functionalized in order to release their content in response to an external stimulus. By incorporating fatty acids (palmitic acid derivatives) with different pKas, we were able to control the pH at which the release starts. A mathematical model has been proposed in order to get insights on the parameters that control their release behavior. By incorporating a light-sensitive amphiphile (an azobezene derivative), liposomes seem to respond to an irradiation. For this system, it is probably necessary to plot the phase diagram of the mixture in order to control the photo-release of the encapsulated agent. We also have formulated liposomes containing a cationic amphiphile (cetylpyridinium chloride). As

nanovectors, these sterosomes show an interesting potential for passive or active agent controlled release. For these systems, a model has been developed in order to study the orientation of the different molecules in the bilayer.

The formation of these new formulations has also contributed to new knowledge in the detergent-lipid interaction field. Added to the numerous known effects of cholesterol (Chol) on biological systems, we must now add that sterols are also able to force monoalkylated amphiphiles to form bilayers. This new property can have an impact on our comprehension of biological system functioning.

Finally, monoalkylated amphiphiles can interact with the membrane and have a negative impact on its functioning. For example, the antibactericidal effect of detergents is supposed to be due to their insertion in the membrane. This insertion is related to the affinity between the detergent and the membrane. Within this field, we wanted to develop a new method to investigate detergent-membrane affinities. We chose surface enhanced Raman Spectroscopy (SERS) due to its sensitivity. Hypotheses allowing the determination of affinity constants are based on the incapability of the detergent to enhance the SERS signal when the detergent is inserted in the membrane. Results were compared to those obtained by isothermal titration calorimetry (ITC). Differences were found and are discussed.

Keywords : liposomes, membranes, detergents, fatty acids, monoalkylated amphiphiles, cholesterol, sterol, affinity constant, passive release, controlled release, NMR, fluorescence, FTIR, SERS, ITC.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations et des symboles.....	xviii
Remerciements.....	xxii
Chapitre 1	1
Introduction	1
1.1 Les liposomes, parmi les nanovecteurs de principes actifs.....	2
1.1.1 Avantages des nanovecteurs.....	2
1.1.2 Les nanovecteurs.....	6
1.1.3 Les liposomes et leur utilisation.....	10
1.2 Généralités sur les liposomes.....	13
1.2.1 Propriétés physico-chimiques des amphiphiles.....	13
1.2.2 Les liposomes et leurs propriétés.....	19
1.3 Les liposomes non-phospholipidiques.....	24
1.3.1 Exemples de liposomes non-phospholipidiques.....	24
1.3.2 Les liposomes non-phospholipidiques riches en stérol.....	27
1.3.3 Nos objectifs.....	31
1.4 Les liposomes, comme modèles de membranes cellulaires.....	34
1.5 Techniques employées.....	36
1.5.1 Caractérisation des phases.....	36
1.5.2 Calcul de la densité de surface.....	42
1.5.3 Détermination de la perméabilité.....	45
1.5.4 Détermination des constantes d'affinité.....	48
1.6 Présentation des chapitres.....	56

1.7 Références.....	58
Chapitre 2	67
pH-triggered release from non-phospholipid LUVs modulated by the pK_a of the included fatty acid	67
2.1 Abstract	68
2.2 Introduction.....	69
2.3 Materials and Methods.....	71
2.4 Results and Discussion	75
2.5 Conclusion	87
2.6 Acknowledgment	88
2.7 References.....	88
Chapitre 3	91
Isomerization behaviour of an amphiphilic monoalkylated azobenzene derivative inserted in non-phospholipid LUVs and preliminary photo-induced release experiments	91
3.1 Abstract	92
3.2 Introduction.....	93
3.3 Materials and Methods.....	95
3.4 Results and Discussion	99
3.5 Conclusion	109
3.6 Acknowledgments.....	111
3.7 References.....	111
Chapitre 4	115
Cationic detergent/sterol mixtures can form fluid lamellar phases and stable unilamellar vesicles	115
4.1 Abstract	116
4.2 Introduction.....	117
4.3 Materials and Methods.....	119

4.4 Results and discussion	122
4.5 Conclusion	136
4.6 Acknowledgments.....	138
4.7 Reference List	138
Chapitre 5	143
SERS et ITC. Essais d'une nouvelle méthode de détermination des constantes d'affinité : cas du CPC sur des membranes de POPC.....	143
5.1 Résumé.....	144
5.2 Introduction.....	145
5.3 Matériels et méthodes	147
5.4 Résultats	151
5.4.1 Expériences SERS.....	151
5.4.2 Résultats obtenus par ITC	159
5.5 Discussion	168
5.6 Conclusion	172
5.7 Références.....	173
Chapitre 6	177
Conclusion.....	177
6.1 Références.....	183

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Quantité maximum de Chol dans des liposomes phospholipidiques (dits conventionnels) avant l'apparition de cristaux de Chol.	28
Tableau 1.2 : Valeurs d'enthalpies de transfert (ΔH_m) en $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ déterminées pour différents détergents sur des membranes de POPC et à des températures variant de 25 à 28 °C.	50
Tableau 1.3 : Valeurs d'enthalpies de transfert (ΔH_m) en $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ déterminées pour différents peptides sur des membranes de POPC et à une température de 25 °C.	51
Tableau 1.4 : Valeurs d'enthalpies de transfert (ΔH_m) en $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ déterminées pour différents peptides sur des membranes de POPC et à une température de 25 °C.	51
Table 3.1 : Values of $t_{1/2}$ calculated for <i>trans</i> to <i>cis</i> and <i>cis</i> to <i>trans</i> isomerizations and for the thermal relaxation of free and bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$	101
Table 3.2 : Values of $t_{1/2}$ calculated for the photo-isomerizations and for the thermal relaxation of 2 different batches of $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ inserted in $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ /Schol bilayers.	106
Table 3.3 : $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ /Schol LUV size measurements for the 3 batches.	108
Table 4.1 : Δv_Q^m observed for various systems including CPB-d ₅	126
Table 4.2 : ² H-NMR parameters associated to cholesterol in CPC/chol-d ₅ (30/70) mixtures, 25 °C.	127

- Tableau 5.1 :** Bilan des résultats obtenus pour la constante d'affinité entre le CPC et le POPC et pour la CMC du CPC à 100 mM NaCl selon le SERS.158
- Tableau 5.2 :** Bilan de la titration entre le CPC et le POPC et de la CMC du CPC déterminées à 100 mM en NaCl selon l'ITC.165
- Tableau 5.3 :** Valeurs des constantes d'affinité K , des enthalpies molaires de transfert ΔH_m , des énergies de Gibbs molaires de transfert ΔG_m , des entropies molaires de transfert ΔS_m , de la composante entropique, des rapports entre l'enthalpie due à la friction de la seringue (dh_{friction}) et l'enthalpie associée au premier pic d'injection ($dh_{i=1}$) et des rapports entre l'enthalpie de dilution (dh_{dil}) et l'enthalpie associée au premier pic d'injection ($dh_{i=1}$) déterminés pour le transfert du CPC depuis l'eau vers la membrane de POPC à différentes concentrations totales en CPC dans la cellule et pour une concentration en NaCl de 10 mM.166

Liste des figures

Figure 1.1 : Schéma de l'effet EPR. À droite et à gauche, la vascularisation des tissus est normale : seules les petites molécules (●) peuvent passer entre les cellules endothéliales et atteindre les tissus normaux. Au centre, la vascularisation des tissus malades (cancer, infections, inflammation) ou des organes tels le foie et la rate, est discontinue : les grosses molécules comme les nanovecteurs (●) peuvent donc passer entre les cellules endothéliales et pénétrer dans les zones malades dans le foie et la rate.3

Figure 1.2 : Représentation de la structure de quelques nanovecteurs. En bleu : parties hydrophiles. En jaune-orange : parties hydrophobes. Disques rouges : médicament hydrophile ou hydrophobe. A) Nanoémulsions : le médicament hydrophobe est solubilisé dans la phase dispersée hydrophobe. B) Micelles polymériques : le médicament hydrophobe est solubilisé dans la partie hydrophobe du polymère. C) Dendrimères : le médicament peut être branché en périphérie ou dans le cœur du dendrimère. D) Liposomes : le médicament hydrophile est solubilisé dans la phase aqueuse à l'intérieur du liposome.9

Figure 1.3 : Structures de différents amphiphiles. En bleu, sont encerclées les parties hydrophiles. Les parties hydrophobes sont représentées dans les rectangles orange. A) Un phospholipide : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine, POPC. B) Des acides gras. De gauche à droite : acide palmitique, PA, acide α -hydroxypalmitique, α OH-PA, et acide α -fluoropalmitique, α F-PA. C) Des QACs. De gauche à droite : chlorure de cétypyridinium, CPC, et bromure de décyl-azobenzyl-triéthylammonium,

- AzoC₁₀N⁺. D) Des stérols. De gauche à droite : cholestérol, Chol, et sulfate de cholestérol, Schol.14
- Figure 1.4** : Schéma d'une micelle (à gauche) et d'une bicouche (à droite).15
- Figure 1.5** : Représentation des phases gel (avec des chaînes tiltées), L_o et L_d.17
- Figure 1.6** : Schémas des différents types de liposomes.20
- Figure 1.7** : A) Structure chimique du groupement Azo : en haut, la forme *trans*. En bas, les formes *cis*. B) Spectre UV-Vis de l'Azo libre dans une solution de CHCl₃. En trait plein noir, spectre de la forme *trans*. En pointillés rouges, spectre de la forme *cis*. Lorsqu'une irradiation à 350 nm est appliquée, la bande à 350 nm diminue (disparition de la forme *trans*) et celles à 320 et 450 nm augmentent (apparition de la forme *cis*).33
- Figure 1.8** : Schéma décrivant l'allure des spectres RMN ²H. A) Cas des phases solides où L'orientation des liens C-D suit une distribution aléatoire et les réorientations des liens C-D sont lentes. La valeur maximum observée pour $\Delta\nu_{Qi}$ est égale à $\frac{3}{2}A_Q$. B) Cas des bicouches. Lien C-D (●—●). L'angle χ_i est décomposé en 3 angles : θ_i , α et Φ_j . Comme les fluctuations associées aux angles α et Φ sont rapides, les interactions quadripolaires sont partiellement moyennées. Le spectre résultant est de symétrie axiale. C) Cas d'un système où les réorientations du lien C-D sont isotropes et rapides.40
- Figure 1.9** : Schéma de la double-couche diffuse prédite par la théorie de Gouy-Chapman (en haut). Allure du potentiel électrostatique $\varphi(x)$ associé à la densité de charge de surface en fonction de la distance à la surface (en bas). Dans ce schéma, la surface est chargée négativement. Les cations sont donc concentrés à proximité de la surface alors que les anions sont repoussés loin de cette

surface. La surface étant négative, le potentiel associé est donc négatif par rapport au potentiel du cœur de la solution.43

Figure 1.10 : Structure chimique des sondes fluorescentes. En haut, la calcéine. En bas, l'ANTS à gauche et le DPX à droite.46

Figure 2.1 : Chemical structure of PA derivatives and their monomeric form pK_a71

Figure 2.2 : Kinetics of the ANTS/DPX release from PA/Chol (30/70) LUVs prepared at pH 7.4. The external pH was adjusted at $t = 0$ s to 4.5 (line), 7.4 (dotted line) or 9 (thick line).76

Figure 2.3 : Kinetics of ANTS/DPX release from LUVs prepared with PA/Chol (■), α OH-PA/Chol (▲) and α F-PA/Chol (●) 30/70 mixtures. The measurements were carried out at pH (a) 7.4, and (b) 4.5. The data points identified with * and ** correspond to duplicates, and single measurements, respectively.77

Figure 2.4 : pH-triggered ANTS/DPX release from PA/Chol (■); α OH-PA/Chol (▲); α F-PA/Chol (●) LUVs. The encapsulation levels are reported after (a) a 24-h, and (b) a 1-month incubation. The time was set to 0 when the external pH was changed.78

Figure 2.5 : Kinetics of calcein release from LUVs prepared with PA/Schol (□), and α OH-PA/Schol (Δ) 30/70 mixtures. The measurements were carried out at pH (a) 5.5, and (b) 8.0.79

Figure 2.6 : pH-triggered calcein release from PA/Schol (□) and α OH-PA/Schol (Δ) LUVs (a) immediately after the pH change and (b) after a 24-h incubation period. .80

Figure 2.7 : Variations of the LUVs hydrodynamic diameter (nm) as a function of pH for the (a) cholesterol-containing systems: PA/Chol (black), α OH-PA/Chol

(hatched) and α F-PA/Chol (gray) and (b) Schol-containing systems: PA/Schol (black) and α OH-PA/Schol (hatched). The measurements were carried out 2 days after the isolation of the fluorophore-loaded LUVs followed by the change of the external pH.81

Figure 2.8 : Correlation between the fatty acid pK_a and the extent of fluorophore release for cholesterol-containing systems (pH 4.5) (■) and Schol-containing systems (pH 8) (Δ). The reported release was measured 24 h after the change of the external pH.82

Figure 2.9 : Variations of the encapsulation level, 24 h after the adjustment of the external pH, as a function of the percentage of deprotonation of the LUVs: PA/Chol (■), PA/Schol (\square), α OH-PA/Chol (\blacktriangle), α OH-PA/Schol (Δ), and α F-PA/Chol (\bullet).85

Figure 2.10 : Influence of the external pH on the calcein release from PA/Chol_{0.25}/Schol_{0.75} LUVs. The encapsulated levels were measured 24 h (■) and 147 days (\blacktriangle) after the change of the external pH.86

Figure 3.1 : Chemical structure of AzoC₁₀N⁺.95

Figure 3.2 : UV-Vis spectra of AzoC₁₀N⁺. Black line are the spectra obtained at $t = 0$ (before irradiation). Turquoise line are the spectra obtained at $t = \infty$ (at the end of the irradiation process). Arrows showed the direction of the intensity changes upon the irradiation at 350 nm. A) AzoC₁₀N⁺ in the free form. B) AzoC₁₀N⁺ inserted in the bilayer.100

Figure 3.3 : Kinetics of the isomerization of free AzoC₁₀N⁺ (\blacktriangle) and bilayer-inserted-AzoC₁₀N⁺ (batch 1) (\blacksquare). Red lines (\square) are the fitted curves. A) Irradiation at 350 nm to induce the *trans-cis* isomerization. B) Irradiation at 450 nm to

induce the *cis-trans* isomerization. C) 350-450-nm photo-cyclization.
 D) Thermal relaxation after an 350-nm irradiation.102

Figure 3.4 : Isomerization behaviour of the 3 batches of AzoC₁₀N⁺/Schol mixtures. Batch 1 (▲); Batch 2 (■); Batch 3 (●); Red lines (□) are the fitted curves calculated according to Eq. 3.3 for *trans-cis* isomerization and to Eq. 3.4 for *cis-trans* isomerization. A) *Trans* to *cis* isomerization induced by 350-nm irradiation. B) *Cis* to *trans* isomerization induced by 450-nm irradiation. C) Thermal relaxation.105

Figure 3.5 : Release behaviour of 3 batches of AzoC₁₀N⁺/Schol. AzoC₁₀N⁺/Schol batch 1 (■); AzoC₁₀N⁺/Schol batch 2 (●); AzoC₁₀N⁺/Schol batch 3 (▲); PA/Schol (◆). A) Photo-induced release by 350-nm irradiation. B) Passive release of AzoC₁₀N⁺/Schol batches.107

Figure 3.6 : ¹H NMR spectra of AzoC₁₀N⁺/Schol batch 3. A) AzoC₁₀N⁺ peaks. The red rectangles show the AzoC₁₀N⁺ peaks that were integrated. B) Schol peak.109

Figure 4.1 : Influence of the sterol on the CPC alkyl chains as probed by the ν_{CH_2} position: CPC in buffer (■), CPC/chol (▲) and CPC/Schol suspension (●), pH 7.4. .123

Figure 4.2 : ²H-NMR spectrum of (A) solid CPB-d₅, (B) CPB-d₅ micelles, (C) CPB-d₅/Schol (30/70) and (D) CPB-d₅/chol (30/70) suspensions, at 25 °C, pH 7.4.124

Figure 4.3 : ²H-NMR spectrum and the corresponding dePaked spectrum of the CPB-d₅/chol (30/70) suspension at 25 (A and B) and 55 °C (C and D) and CPB-d₅/Schol (30/70) suspension at 25 (E and F) and 55 °C (G and H).125

- Figure 4.4 :** ^2H -NMR spectrum of CPC/chol- d_5 (30/70) suspension (A) and its dePaked spectrum (B), pH 7.4, 25 °C.127
- Figure 4.5 :** Schematic representation of the different angles associated to the motions leading to the averaging of the quadrupolar interactions. Definition of Φ , α and θ (A). Rotation around the y axis defining β (B), subsequently around \hat{s} , defining γ (C). Initially, the pyridinium cycle is located in the (y,z) plane.129
- Figure 4.6 :** Representation of the (γ,β) solutions for CPB- d_5 /chol (30/70) (A), and CPB- d_5 /Schol (30/70) (B) mixtures, 25 °C and pH 7.4. The contours define the solutions reproducing the experimental $\Delta\nu_{\text{Q}}^{\text{m}}$ values within $\pm 1\%$ (inner contour) and $\pm 2.5\%$ (outer contour).132
- Figure 4.7 :** Evolution of the different $\Delta\nu_{\text{Q}}^{\text{m}}$ values as a function of temperature for the CPB- d_5 /chol (A), and CPB- d_5 /Schol (B) mixtures.133
- Figure 4.8 :** Passive release of calcein from CPC/Schol LUVs at ambient temperature, pH 7.4 (■), and pH 5.5 (▲); n = 3.135
- Figure 4.9 :** Effect of the external pH on the permeability of CPC/Schol LUVs. The trapping levels were measured the first day of the external-pH change (■) and after 6 months (▲); n = 3.135
- Figure 5.1 :** Spectres (a) Raman du DPC à 0.12 M, (b) SERS du DPC à 1.4 μM et (c) SERS du CPC à 5 μM . Les intensités sont normalisées de manière à ce que la bande centrée vers 1028 cm^{-1} soit de même hauteur. Les spectres (a) et (b) ont été enregistrés par E. Auvrouin.152

Figure 5.2 : Effet du sel sur l'intensité de la bande SERS à 1028 cm^{-1} . Le signal SERS atteint un maximum entre 50 et 100 mM en NaCl. Ces données ont été réalisées par A. Percot sur le DPC à $5\text{ }\mu\text{M}$153

Figure 5.3 : A) Variation de l'intensité normalisée (par rapport à l'intensité à $500\text{ }\mu\text{M}$) de la bande centrée autour de 1028 cm^{-1} avec la concentration en CPC à 100 mM en NaCl. B) Agrandissement de la partie encadrée en A). Les régimes I, II et III sont directement identifiés sur les figures. $n = 2$ sauf les points assignés d'un * correspondant à $n = 1$. C) Variation de l'intensité normalisée (par rapport à l'intensité à $183\text{ }\mu\text{M}$) de la bande centrée autour de 1028 cm^{-1} avec la concentration en CPC à 10 mM en NaCl. D) Agrandissement de la partie encadrée en C). Les régimes I, II et III sont directement identifiés sur les figures. Les points assignés d'un * correspondent à $n = 1$155

Figure 5.4 : Diminution de l'intensité de la bande centrée autour de 1028 cm^{-1} lorsque la concentration en lipides augmente. A) Spectres SERS du CPC après ajout de différentes concentrations en POPC. Pour plus de clarté, les spectres ont été décalés. B) I_{1028} en fonction de la concentration en POPC.157

Figure 5.5 : Détermination de la constante d'affinité CPC/POPC par SERS. La droite est donnée par l'équation 5.5 de pente K_{SERS} . $[\text{CPC}] = 5\text{ }\mu\text{M}$, $[\text{NaCl}] = 100\text{ mM}$. K_{SERS} est évaluée à 550 mM^{-1}159

Figure 5.6 : Expérience ITC pour la détermination de la CMC du CPC à 100 mM en NaCl. La concentration de CPC dans la seringue est de 5 mM et 3 μL de cette solution sont injectés dans la cellule qui contient initialement le tampon. A) Titrage isotherme. B) Valeurs d'enthalpie enregistrées (par mole d'injectant) en fonction de la concentration de CPC dans la cellule après chaque injection. Le point d'inflexion donne la CMC. C) Dérivée première de cette courbe dont le maximum donne la CMC qui est évaluée à $67.9\text{ }\mu\text{M}$160

Figure 5.7 : Expérience ITC typique pour la détermination de la constante d'affinité K du CPC ($40 \mu\text{M}$ dans la cellule) pour une membrane de POPC (100 mM en NaCl). A) Titration isotherme tel qu'enregistré. Puissance délivrée en fonction du temps. Les derniers pics représentent l'enthalpie de dilution. B) Enthalpie h_i (après soustraction de l'enthalpie de dilution) en fonction de la concentration en lipides injectés. C) Détermination de la constante K selon l'équation 5.4. ΔH_m a été optimisé afin d'obtenir une droite; sa pente représente K162

Figure 5.8 : Constante d'affinité K_{ITC} en fonction de la concentration totale en CPC.167

Liste des abréviations et des symboles

α	angle entre \hat{a} et r
α F-PA	acide 2-fluoropalmitique
α OH-PA	acide 2-hydroxypalmitique
ΔG_m	énergie libre molaire de transfert
ΔH_m	enthalpie molaire de transfert
ΔS_m	entropie molaire de transfert
Δv_Q	éclatement quadripolaire
δ	déplacement chimique
θ	angle entre r et H_0
$v_{s,C-H}$	mode d'élongation symétrique des liaisons C-H
σ	densité de charge à la surface de la membrane
Φ_j	angle entre le lien C-D et \hat{a}
φ_0	potentiel électrostatique à la surface de la membrane
χ	angle entre H_0 et le lien C-D
\hat{a}	axe long de la molécule
A_i	surface moléculaire occupée par la molécule i
ANTS	8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique de disodium
A_Q	constante de couplage quadripolaire statique
$AzoC_{10}N^+$	bromure de décyl-azobenzyl- triéthylammonium
calcéine	3,6-dihydroxy-2,3-bis[N,N'-di(carboxyméthyl)-aminométhyl]fluoran
C_{bulk}	concentration d'un ion au cœur de la solution
$C_{d,m}$	concentration de détergent dans la membrane

$C_{d,tot}$	concentration totale en détergent
$C_{d,w}$	concentration de détergent dans l'eau
Chol	cholestérol
C_{int}	concentration à l'interface d'un ion
C_L	concentration de lipide
CMC	concentration micellaire critique
CPC	chlorure de cétypyridinium
dh_{dil}	enthalpie de dilution
DPX	p-xylène-bis-pyridinium
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
FTIR	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
H_0	champ magnétique externe
I_{1028}	intensité raman de la bande à 1028 cm^{-1}
I_b	fluorescence résiduelle de la sonde encapsulée à $t = 0$
ITC	titration calorimétrique isotherme
I_F	intensité de fluorescence de la sonde à un temps t
I_{T0}	intensité de fluorescence de la sonde après ajout de Triton X-100 à $t = 0$
I_T	intensité de fluorescence après ajout de Triton X-100 en un temps t
K	constante de partage, d'affinité
k	constante de vitesse de réaction
L_α	phase liquide-cristalline désordonnée
L_β	phase gel
L_d	phase liquide-cristalline désordonnée
L_o	phase liquide ordonnée

LUVs	larges vésicules unilamellaires
lyso-PPC	lyso-palmitoylphosphatidylcholine
MES	acide 2-[<i>N</i> -morpholino]éthanesulfonique
NAEs	<i>N</i> -acétyléthanolamines
PA	acide palmitique
POPC	1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
QAC	composé d'ammonium quaternaire
QELS	diffusion de la lumière quasi-élastique
\hat{r}	orientation privilégiée de la molécule
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
\hat{s}	segment passant par les atomes N et D ₁ (position para) du cycle pyridinium
Schol	sulfate de cholestérol
S _{C-D}	paramètre d'ordre orientationnel
SDS	dodécylsulfate de sodium
SERS	Raman exalté de surface
S _{mol}	paramètre d'ordre moléculaire
t	temps
t _½	temps au du bout duquel la concentration tombe à la moitié de sa valeur initiale
T _m	température de fusion des chaînes alkyl
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Triton X-100	polyéthylène glycol p-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)-phényl éther
x _i	fraction molaire de la molécule i
z _i	charge de la molécule i

*À mon chéri, à mes parents, à ma famille et à
ma belle-famille,*

Remerciements

Avant tout, et pour me démarquer des étudiants qui ont remercié leur directeur de recherche, je tiens à remercier Michel Lafleur. Je le remercie de m'avoir intégré dans son groupe afin de mener à bien ce projet de recherche inscrit dans un domaine aussi intéressant que les liposomes. Je le remercie de prendre le temps de nous écouter et de nous aider dans nos projets, de rester disponible même quand il n'a pas le temps et d'être très efficace, surtout pour les corrections ... Et je le remercie de sa gentillesse, de sa patience et d'égayer nos journées avec son rire si communicatif. Michel, merci.

Un très très grand merci à un être qui m'est très cher, ma moitié, Joe. Merci d'avoir su endurer tout ce que tu as enduré. Merci de m'avoir accompagnée, physiquement jusqu'au Québec et mentalement, tout le long de mes longues années d'études. Merci de t'être occupé de moi et de tout le reste (animaux, ménage, cuisine, etc.) durant mes périodes de révision ou de rédaction. Merci de m'avoir supportée, soutenue et encouragée, même quand j'étais insupportable. Et surtout, très grand merci de t'être occupé de ce travail très laborieux qu'est l'entrée des données bibliographiques. Très grand merci à toi d'avoir été si patient.

Je remercie également Pauline Aubron, Gauthier Rydzeck, Liliana Morfin et Léa Espanol, stagiaires au sein de notre groupe, que j'ai eu à superviser. Merci de votre efficacité et de votre autonomie et surtout d'avoir ramené de la fraîcheur, de France et du Mexique. Cela a été un plaisir de travailler avec vous et cela sera un plaisir de vous revoir.

Un grand merci aussi aux membres permanents de l'Université de Montréal, dont les secrétaires qui répondent au prénom de Lyne ou Line, les membres de l'atelier mécanique et les membres du département de RMN (surtout Cédric Malveau). Merci de votre gentillesse, de votre bonne humeur, de votre disponibilité, de votre efficacité et de votre aide.

Je remercie aussi les membres du couloir C-600, du groupe Lafleur et du groupe Reber, anciens et actuels, de leur aide et de leur soutien, ainsi que de leur bonne humeur qui ont égayé la vie du laboratoire et surtout le temps des repas ... Merci de tous les débats qu'on a eu, aussi passionnés qu'enrichissants, sur tous les sujets possibles et imaginables, et même inimaginables!

Je tiens aussi à remercier mes amis que j'ai rencontrés ici, d'avoir fait semblant de vous intéresser à mon projet. Je les remercie surtout des soirées et week-ends qu'on a passés ensemble et des débats qu'on a eus (et oui, encore). Merci à vous tous de m'avoir fait découvrir le Québec, ses coutumes et ses traditions.

Enfin, un grand merci à l'Université de Montréal, de m'avoir acceptée et accueillie, de sorte que je puisse découvrir le Québec et son climat ...!

Chapitre 1

Introduction

Ce projet de thèse a pour but d'étudier les interactions entre des détergents et des lipides dans les systèmes membranaires. D'une part, nous montrons que les mélanges détergents/stérols à haute concentration en stérols peuvent mener à la formation de systèmes liposomaux dont les propriétés en font des vecteurs potentiels dans le domaine de la libération de médicaments et autres principes actifs. Dans ce cadre, des liposomes riches en stérol ont été formés et leurs propriétés ont été caractérisées. Ces nouvelles formulations possèdent des propriétés intéressantes telles que contenir des amphiphiles cationiques, être sensibles au pH et à la lumière. D'autre part, les interactions entre un détergent et une membrane lipidique modèle ont aussi été étudiées. Dans ce cadre, nous avons tenté de développer une méthode permettant d'étudier de telles interactions.

Afin de cerner l'apport de cette thèse parmi les travaux effectués dans le domaine de la libération d'agents actifs, il est utile de citer quelques nanovecteurs qui ont été développés dans le but de remplir les objectifs médicaux et industriels associés à chaque application. Dans le cas des formulations liposomales, leur emploi du point de vue médical et industriel est présenté à titre d'information. Les propriétés physico-chimiques des liposomes les plus importantes sont aussi décrites, incluant notamment l'effet des stérols sur ces systèmes et les méthodes menant à leur formation. Parmi les formulations liposomales, certaines sont non-phospholipidiques et riches en stérols. Une revue de littérature de ces systèmes est présentée.

Un autre aspect des liposomes a aussi été exploré durant ce projet : les liposomes comme modèles de membranes cellulaires. Du fait que les liposomes soient constitués des mêmes molécules que celles formant les membranes cellulaires plasmiques, ils sont un bon modèle pour les membranes. Ainsi, ils ont permis d'étudier les mécanismes d'action de

biocides sur les bactéries.¹⁻³ Parmi les biocides, certains sont des détergents dont l'action supposée se situe au niveau de leur insertion dans la membrane. Cependant, l'association des détergents aux membranes est difficile à caractériser. Ainsi, nous avons tenté de développer une nouvelle méthode pour déterminer la constante d'affinité entre un détergent et une membrane modèle.

1.1 Les liposomes, parmi les nanovecteurs de principes actifs

Un nanovecteur est une particule capable de guider un principe actif attaché, incorporé ou encapsulé dans la particule vers une zone cible (par exemple, une zone cancéreuse ou un site d'infection). Sa taille peut varier de quelques nanomètres à quelques centaines de nanomètres. La forme du nanovecteur et sa nature chimique ou physique sont très variées.

1.1.1 Avantages des nanovecteurs

Beaucoup de molécules bioactives impliquent des effets secondaires et ont un seuil de toxicité.⁴ Par rapport au médicament libre, l'utilisation d'un nanovecteur pour guider l'agent actif dans le corps peut présenter beaucoup d'avantages.

Un rôle principal est de protéger l'agent actif du milieu extérieur. Les agents actifs peuvent être protégés des attaques du système immunitaire ou éventuellement de certaines conditions extrêmes, comme les milieux acides. Ils peuvent aussi servir de matrice pour solubiliser un médicament hydrophobe.⁵ Par exemple, les médicaments anti-cancer sont souvent lipophiles et se solubilisent donc mal dans l'eau.

Un autre avantage est la modification de la biodistribution du médicament dans le corps. Il a été remarqué que certains sites pathologiques, notamment les zones cancéreuses, infectées ou enflammées, présentaient une microvascularisation discontinue, ou encore plus perméable (fig. 1.1).⁵ Dans ces zones, l'arrangement des cellules endothéliales n'est pas ordonné et crée des trous entre les cellules. Des organes, comme la rate et le foie, présentent aussi une vascularisation discontinue. Pour ces organes, la discontinuité de la

vascularisation en fait des sites d'élimination des corps étrangers. Cet arrangement discontinu des cellules endothéliales permet à des macromolécules de quitter le vaisseau sanguin et de pénétrer dans la zone malade alors qu'elles ne peuvent pénétrer dans les tissus normaux. De manière similaire, elles s'accumulent aussi dans la rate et le foie. De ce fait, leur accumulation est plus élevée dans ces zones par rapport aux tissus normaux. Ce phénomène a été appelé l'effet de perméabilité et de rétention augmenté (Enhanced Permeability and Retention, EPR) (fig. 1.1).⁵

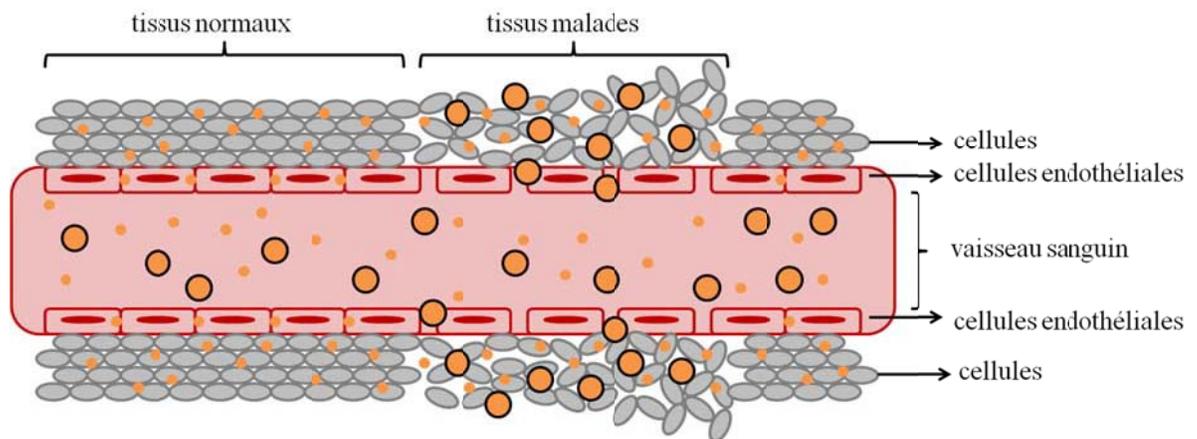


Figure 1.1 : Schéma de l'effet EPR. À droite et à gauche, la vascularisation des tissus est normale : seules les petites molécules (●) peuvent passer entre les cellules endothéliales et atteindre les tissus normaux. Au centre, la vascularisation des tissus malades (cancer, infections, inflammation) ou des organes tels le foie et la rate, est discontinue : les grosses molécules comme les nanovecteurs (●) peuvent donc passer entre les cellules endothéliales et pénétrer dans les zones malades dans le foie et la rate.

Grâce à l'effet EPR, les nanovecteurs permettent de diminuer la toxicité du médicament et ses effets secondaires associés en évitant les tissus normaux. Par ailleurs, comme ils s'accumulent dans les tissus malades, ils augmentent la concentration du médicament dans ces zones. Les effets thérapeutiques sont donc améliorés et ceci permet

éventuellement d'administrer des doses moins importantes de médicaments. Les nanovecteurs permettent aussi d'adopter des stratégies différentes pour lutter contre un type de maladie. Une stratégie adoptée est la libération passive d'agents actifs de par laquelle les nanovecteurs tirent avantage de l'effet EPR. Les nanovecteurs d'un diamètre équivalent ou inférieur à la taille des trous formés par les cellules endothéliales peuvent quitter le système sanguin, pénétrer et tout simplement s'accumuler dans la zone malade pour y libérer l'agent actif de manière passive.

Cette stratégie est aussi adaptable pour les infections intracellulaires comme celles associées au candidiasis, au leishmaniasis ou à la listeria car les nanovecteurs s'accumulent, par effet EPR, dans la rate et le foie qui font partie du système réticuloendothélial (RES).^{4,6} En effet, les macrophages sont produits dans le RES et ces bactéries s'attaquent et se reproduisent à l'intérieur des macrophages. Due à leur localisation intracellulaire, elles deviennent inaccessibles aux agents thérapeutiques par les voies d'administration usuelles et au système immunitaire. Les nanovecteurs peuvent se faire internaliser dans les macrophages et montrer un potentiel pour lutter contre ces infections.

Une autre stratégie est la libération contrôlée de l'agent actif où l'application d'un stimulus externe provoque une libération accrue de l'agent encapsulé dans la zone désirée. À ce jour, plusieurs stimuli sont utilisés. Certains stimuli sont reliés à des différences de l'environnement biologique. Par exemple, certaines zones malades sécrètent des enzymes spécifiques dans le milieu extracellulaire.⁵ L'incorporation de molécules sensibles à ces enzymes est donc un moyen de provoquer la libération de l'agent actif dans la zone malade. Les différences de pH sont aussi utilisées comme stimuli.^{4,5,7-9} En effet, le pH autour des zones malades est parfois plus faible que le milieu environnant. C'est le cas des zones cancéreuses (pH autour de 6) et des sites d'infection et d'inflammation. D'autre part, le pH dans les endosomes et les lysosomes est aussi plus faible que le milieu cytosolique (une cellule peut internaliser des corps étrangers par le biais des endosomes et lysosomes :

c'est le phénomène d'endocytose). Ces différences de pH peuvent être utilisées pour provoquer la libération d'un nanovecteur sensible au pH.

Des formulations utilisent le phénomène d'internalisation pour libérer le médicament à l'intérieur de la cellule. L'incorporation d'anti-corps sur le nanovecteur peut provoquer l'endocytose.⁵ Le but de telles formulations est d'augmenter la biodisponibilité du médicament à l'intérieur de la cellule. Les amphiphiles cationiques ont aussi une certaine tendance à se faire internaliser car leur charge positive peut interagir avec les charges négatives portées par la membrane cellulaire.¹⁰ De plus, ils peuvent se complexer avec des gènes, protéines ou peptides. Ces charges positives peuvent aussi déstabiliser l'endosome. Ainsi, les formulations contenant des amphiphiles cationiques sont très utilisées en thérapie génique. La capacité d'oxydo-réduction du milieu intracellulaire est un autre exemple de stimulus utilisé pour libérer le médicament.^{4,5} Le glutathion (GSH) est un tripeptide permettant les échanges d'électrons à l'intérieur des cellules. Les liens disulfides S-S peuvent être réduits en lien thiol S-H. Sa concentration dans les cellules est supérieure au contenu extracellulaire, conduisant à un milieu intracellulaire très réducteur (dans les cellules cancéreuses, elle y est 100 à 1000 fois supérieure). Le nanovecteur pénètre dans la cellule. L'insertion de molécules portant un groupement S-S dans un nanovecteur peut faire en sorte que les liens S-S peuvent être clivés. Ceci déstabilise la formulation qui, ainsi, peut libérer son contenu dans la cellule.

Un autre stimulus est la température des tissus.^{4,5} Certaines maladies provoquent une hyperthermie. Les formulations développées dans ce but doivent rester stables à 37 °C et libérer aux alentours de 39-42 °C. En général, les formulations développées libèrent leur contenu à cause d'un changement de phase. Par contre, cette fenêtre restreinte de température est parfois difficile à atteindre. Le changement de température peut aussi être provoqué depuis l'extérieur.⁴ Par exemple, l'application de fréquences de l'ordre de 100-120 kHz peut élever la température locale jusqu'à 40-45 °C.

D'autres stimuli externes au corps peuvent être appliqués pour provoquer la libération de l'agent actif. Dans ce cadre, la lumière UV-Vis est un des moyens utilisés.^{5,11-}

¹⁵ Les formulations se basent sur des changements réversibles ou irréversibles du composé sensible à la lumière (photo-isomérisation, photo-oxydoréduction, photo-polymérisation, etc.). L'avantage des ondes UV-Vis est leur modulabilité dans la fréquence et dans la durée des impulsions. Par contre, la profondeur de pénétration de ces fréquences à travers les tissus est faible. D'autre part, beaucoup de molécules biologiques absorbent dans l'UV et peuvent être altérées par cette radiation.

L'application d'ultrasons semble être une autre alternative.^{4,16} L'utilisation de nanovecteurs contenant des agents sensibles aux ultrasons (des microbulles de gaz la plupart du temps) permet de provoquer la libération dans la zone ciblée. Une libération peut aussi être provoquée même sans agent. Par exemple, l'absorption d'ultrasons peut provoquer une transition de phase du nanovecteur conduisant à la libération de l'agent encapsulé. Un avantage de cette approche est que les ultrasons ont une bonne profondeur de pénétration dans les tissus.

Enfin, un autre stimulus externe est l'application d'un champ magnétique capable de guider l'élément dans une certaine zone.⁴ Les nanovecteurs contenant des éléments magnétiques (comme des oxydes de fer) s'accumulent dans la zone soumise au champ magnétique.

1.1.2 Les nanovecteurs

Les nanoparticules sont une classe de nanovecteurs. Une représentation des nanovecteurs est donnée dans la figure 1.2. L'utilisation de nanoparticules dans le domaine médical a été initiée par Speiser *et al.* en 1978.¹⁷ Ces premières nanoparticules formées par Speiser étaient composées de gélatine avec des tailles de 200 à 500 nm. De manière générale, le cœur des nanoparticules est hydrophobe et solubilise donc très bien les médicaments hydrophobes.^{18,19} Aujourd'hui, 2 classes de nanoparticules sont répertoriées : les nanoparticules à cœur solide, et les nanoparticules sous forme de nanoémulsions, à cœur liquide.¹⁸ Les nanoémulsions sont un mélange de 2 liquides non miscibles, l'un (constituant la phase dispersée) étant dispersé dans l'autre (constituant la phase continue,

dans notre cas, l'eau). Les nanoémulsions ont tendance à s'agréger. Un émulsifiant permet de les stabiliser. Les nanoparticules solides sont de plusieurs types.^{18,19} Par exemple, elles peuvent être formées de polymères insolubles. Si le polymère est biodégradable, la dégradation du polymère provoque la libération du médicament. Si le polymère n'est pas biodégradable, le médicament diffuse tout simplement à travers la matrice polymérique. Ce sont en général des petites particules qui présentent une grande surface, ce qui permet de modifier les propriétés de surface pour, par exemple, les rendre sensibles à des stimuli externes.

Les micelles polymériques (à base de polymères amphiphiles) sont un autre type de nanovecteurs. Ce sont des agrégats de co-polymères blocs dont les parties hydrophiles sont dirigées vers la phase aqueuse et les parties hydrophobes forment le cœur de la micelle.^{4,18} Ainsi, elles forment aussi une bonne matrice hydrophobe pour les médicaments hydrophobes. Il est aussi possible d'attacher des molécules répondant à des stimuli ou des agents thérapeutiques hydrophiles à la surface de la micelle. Les micelles polymériques sont de petite taille (20 à 100 nm de diamètre), et de par leur taille, s'accumulent facilement dans les zones malades (par effet EPR).

Les dendrimères sont une autre classe de nanovecteurs. Les premiers dendrimères ont été synthétisés par Tomalia en 1985.^{4,20} Newkome *et al.* ont aussi contribué à la synthèse et la caractérisation de ces systèmes.^{21,22} Les dendrimères sont des molécules d'une architecture très bien définie donc monodisperses. Ils sont solubles, de petite taille (quelques nm) et présentent une grande surface fonctionnalisable. Ainsi, plusieurs propriétés peuvent leur être attribuées en incorporant différents groupements fonctionnels au cœur, sur les branches ou en périphérie du dendrimère.

Enfin, une dernière classe de nanovecteurs est celle des liposomes, classe à laquelle nous nous intéressons. Les liposomes sont des vésicules formées d'une bicouche de lipides qui sépare le milieu extérieur (solution aqueuse) du milieu intérieur (qui est aussi une phase aqueuse). L'intérieur de la bicouche est hydrophobe. Ainsi, les liposomes peuvent contenir et protéger des molécules hydrophiles dans leur volume intérieur ou des molécules hydrophobes dans leur bicouche. Les liposomes dits conventionnels sont ceux dont la

bicouche est formée de phospholipides. Bien que beaucoup de travaux aient été réalisés sur les lipides sous forme de films ou de suspensions depuis 1846 (date à laquelle la lécithine a été découverte par Goble),²³ leur véritable nature a été découverte en 1964 par Alec D. Bangham.^{23,24} Depuis 1912, des études ont été menées sur les comportements et caractéristiques des lipides. Dans les années 1950, Saunders *et al.* ont préparé des suspensions hydratées de lipides, les ont passées aux ultrasons et ont noté l'obtention d'une solution plus limpide et de particules d'une taille de 30 nm. Sans le savoir, Saunders *et al.* venaient de préparer des liposomes. De même, Bangham, en 1961, présenta une méthode de préparation d'« émulsions de lipides » par hydratation d'un film mince de lipides. En 1964, Bangham et Horne ont étudié des suspensions lipidiques par microscopie électronique pour découvrir que les mélanges lipidiques hydratés formaient des structures multilamellaires sphériques et fermés. Comprenant l'importance de leur découverte, Bangham et Horne se lancent dans l'étude de la perméabilité aux ions de ces systèmes. Quelque temps plus tard, un pharmacologiste du nom de Schneider joint Bangham pour lui demander si les liposomes pouvaient être utilisés pour libérer des molécules encapsulées. L'idée d'utiliser les liposomes comme nanovecteurs pour la libération d'agents actifs venait de naître.

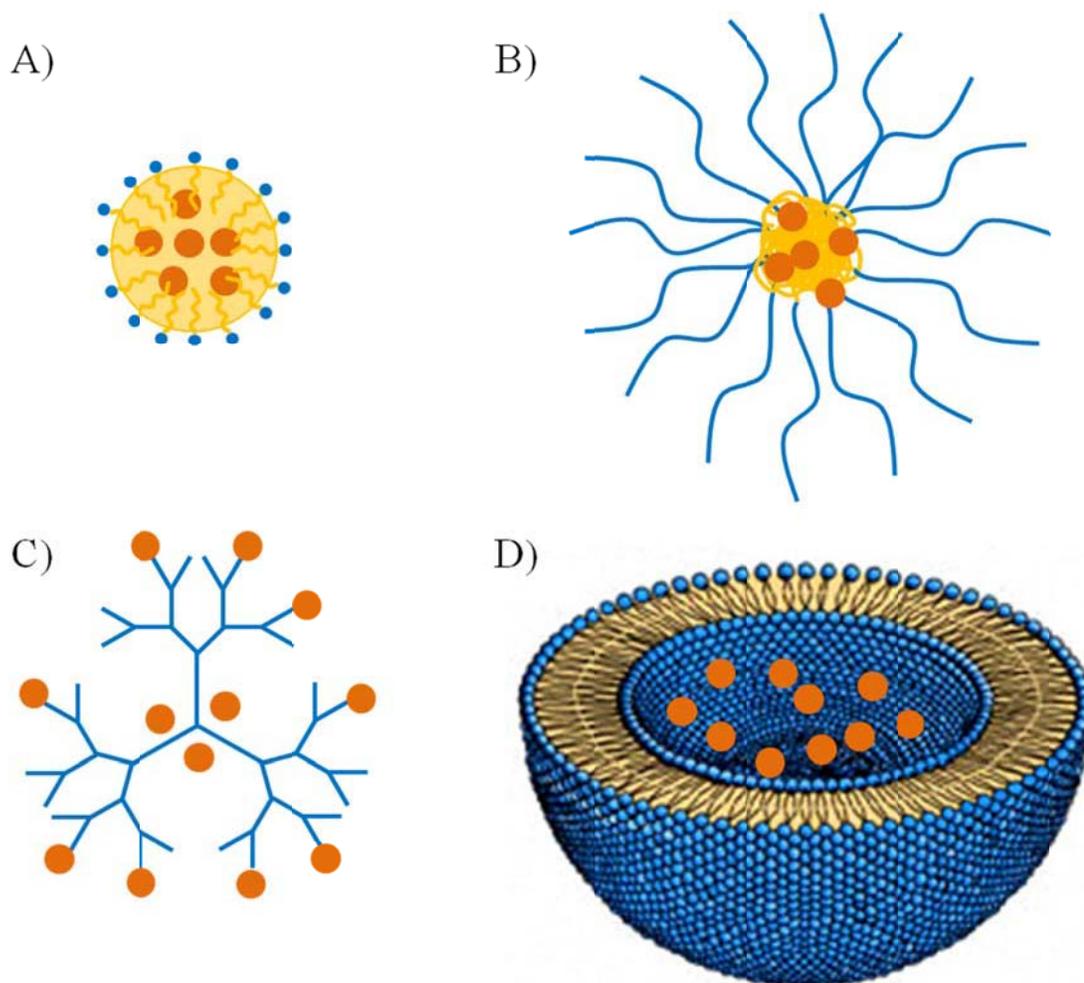


Figure 1.2 : Représentation de la structure de quelques nanovecteurs. En bleu : parties hydrophiles. En jaune-orange : parties hydrophobes. Disques rouges : médicament hydrophile ou hydrophobe. A) Nanoémulsions : le médicament hydrophobe est solubilisé dans la phase dispersée hydrophobe. B) Micelles polymériques : le médicament hydrophobe est solubilisé dans la partie hydrophobe du polymère. C) Dendrimères : le médicament peut être branché en périphérie ou dans le cœur du dendrimère. D) Liposomes : le médicament hydrophile est solubilisé dans la phase aqueuse à l'intérieur du liposome.

1.1.3 Les liposomes et leur utilisation

Les liposomes ont d'abord servi comme modèles de membranes cellulaires.²³ En effet, les membranes biologiques sont des bicouches incorporant un grand nombre de molécules de nature chimique et physique très variée. Étant donné le grand nombre de lipides, protéines, enzymes, peptides, etc. incorporés dans ou attachés sur la membrane, l'étude des interactions entre une molécule en particulier et un des éléments de la membrane est largement simplifiée par l'utilisation des liposomes.

Le rôle des membranes biologiques ne se limite pas seulement à un rôle structural, fait pour soutenir les différents éléments incorporés. En tant que modèle de membrane cellulaire, les liposomes ont permis des découvertes fondamentales comme la mise en évidence de formations de domaines dans un mélange lipidique, suggérant ainsi qu'une membrane biologique n'est pas homogène et uniforme.²⁵ Même si la formation de tels domaines est encore controversée, des expériences menées sur des modèles membranaires suggèrent une possible coexistence de phases.²⁶ Les études menées sur les liposomes permettent d'enrichir nos connaissances au sujet de ces domaines, aussi appelés radeaux lipidiques et qui sont souvent plus riches en cholestérol (Chol). À ce sujet, les liposomes ont permis de découvrir que l'activité de certaines protéines ou enzymes dépendait la fluidité de la membrane, c'est-à-dire du domaine dans lequel elles sont incorporées.²⁷

Certaines molécules peuvent agir sur la membrane elle-même. Les liposomes permettent de déterminer en quoi cette action consiste et les effets engendrés. Plusieurs études ont examiné l'effet des toxines (de virus ou de bactéries) ou des pesticides sur les cellules de plantes et animaux.²⁸ Ces études ont montré que les pesticides peuvent s'insérer dans la membrane et ainsi modifier ses propriétés comme les interactions lipides/lipides et lipides/protéines. Ces mécanismes pourraient être à l'origine de leur toxicité. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'action antibactérienne des détergents. Ce mécanisme met en jeu l'insertion du détergent dans la membrane, ce qui peut mener à son dysfonctionnement. La section 1.4 est consacrée à cet exemple.

Le potentiel des liposomes comme nanovecteurs et/ou protecteurs d'agents actifs s'est rapidement révélé, étant données leurs propriétés d'encapsulation. Les applications étant très variées et nombreuses, cette section ne se veut pas être une énumération exhaustive, le but étant seulement de citer quelques domaines d'application où les liposomes trouvent leur emploi. Le domaine médical est le domaine où les liposomes sont le plus souvent utilisés comme nanovecteurs.²⁹ Plusieurs formulations sont déjà commercialisées et d'autres sont dans un stade d'essais cliniques avancé. Pour en citer quelques uns, Doxil[®] de Sequus (agent anti-cancéreux), Ambisome[®] (agent antibiotique et antifongique) et Daunoxome[®] (agent anti-cancéreux) de NeXstar ou encore ELA-Max[®] (anesthésique) de Biozone Labs sont des formulations qui sont déjà sur le marché. Une application visée est la thérapie anti-cancer car les liposomes peuvent s'accumuler dans les zones cancérogènes. Même si les formulations montrent parfois la même efficacité contre le cancer que le médicament libre, la toxicité du médicament est diminuée, ce qui améliore la qualité de vie des patients. Parce que les liposomes peuvent aussi s'accumuler dans des sites infectés ou enflammés, ils sont aussi utilisés contre ces pathologies. Dans le cadre de la thérapie génique, les liposomes cationiques se sont montrés efficaces pour délivrer des brins d'ADN à l'intérieur des cellules, les libérer et donc provoquer l'expression de protéines encodées par le brin d'ADN. Des compagnies comme Vical, Genzyme, GeneMedicine ou Megabios sont particulièrement intéressées dans ce domaine et ont des formulations en essais cliniques. Les liposomes peuvent aussi encapsuler des vaccins.²⁹ Ils peuvent tenir le rôle d'adjuvant et provoquer la réponse du système immunitaire. La compagnie Swiss Serum Institute a notamment développé un vaccin liposomal contre l'hépatite A et travaille actuellement sur l'hépatite B, la grippe, la diphtérie et le tétanos. La formulation Stivumax de Merck est en essai clinique.³⁰ Pour cette application, les liposomes cationiques sont de bons candidats car ils sont connus pour stimuler le système immunitaire.^{10,30} Les mécanismes menant à cette réponse sont encore mal connus mais sont reliés à la structure de l'amphiphile cationique. Un autre exemple montrant les avantages apportés par les formulations liposomales est l'encapsulation de chloroquine qui s'est montrée non-seulement efficace contre la malaria mais qui permet aussi aux sujets de développer une certaine résistance prolongée contre cette maladie, due à une libération

lente de la chloroquine.²⁸ Enfin, les liposomes sont aussi utilisés pour lutter contre les maladies nosocomiales.⁶ Au moins 50 % des maladies nosocomiales sont associées à une infection pré-opératoire des instruments médicaux. La contamination chez le patient a lieu pendant l'opération, due à l'insertion de l'instrument contaminé. Les stratégies adoptées sont de recouvrir la surface des instruments avec des liposomes. Les liposomes peuvent contenir un agent antibactérien ou servent simplement à empêcher l'adhésion des bactéries à la surface de l'instrument.

Outre le domaine médical, les liposomes trouvent aussi beaucoup d'applications dans le monde industriel, notamment en alimentation ou en cosmétique.²⁸ Dans le domaine de l'alimentation, ils permettent de modifier certains procédés de fabrication. Par exemple, l'encapsulation d'une protéase peut raccourcir le temps de vieillissement des fromages tout en gardant le même degré de vieillissement. L'encapsulation de lipases permet aussi de modifier la fermeté des fromages et d'améliorer leur saveur. Les liposomes permettent aussi de protéger des vitamines et enzymes qui, parce qu'elles sont encapsulées, se dégradent moins ou sont protégées de certaines conditions extrêmes (stockage à basse température, pH extrêmes, attaques par d'autres composés, etc.). Ceci permet d'augmenter les valeurs nutritionnelles d'un produit, d'améliorer la digestion d'autres composés ou de prolonger l'activité des vitamines et enzymes.

En cosmétique, l'encapsulation de vitamines, protéines, gènes, acides gras, mélanine, etc. trouve beaucoup d'application dans ce domaine. Les liposomes sont utilisés afin de rendre la peau plus élastique, d'augmenter la croissance cellulaire, d'hydrater la peau ou lutter contre l'acné.³¹ Ils sont aussi utilisés pour colorer les cheveux, les réparer, accélérer leur croissance ou encore diminuer la perte de cheveux.³² Dans ces applications, les liposomes sont capables de libérer leur contenu sans pénétrer dans le système sanguin et donc diminuent les éventuels effets toxiques des produits cosmétiques.

1.2 Généralités sur les liposomes

1.2.1 Propriétés physico-chimiques des amphiphiles

Les amphiphiles sont des molécules qui possèdent une partie polaire/hydrophile (constituée par la tête polaire), et une partie non-polaire/hydrophobe (constituée par la (les) chaîne(s) alkyles). Dans la fig. 1.3 sont donnés, à titre d'exemple, les différents amphiphiles utilisés dans les travaux de cette thèse, soit des phospholipides à double-chaîne, des détergents monoalkylés comme les acides gras et les ammoniums quaternaires (Quaternary Ammonium Compounds, QACs) et des stérols. Généralement, les phospholipides portent deux chaînes, sauf les lysophospholipides. Les phospholipides les plus abondants chez les mammifères portent une tête polaire formée du groupement phosphocholine et sont appelés phosphatidylcholine (PC) ou encore lécithine.²⁸

Les amphiphiles dans l'eau peuvent former des phases solides lorsque la partie hydrophobe est très importante comparée à la partie hydrophile. C'est le cas des stérols. C'est aussi le cas général des amphiphiles possédant une longue chaîne.

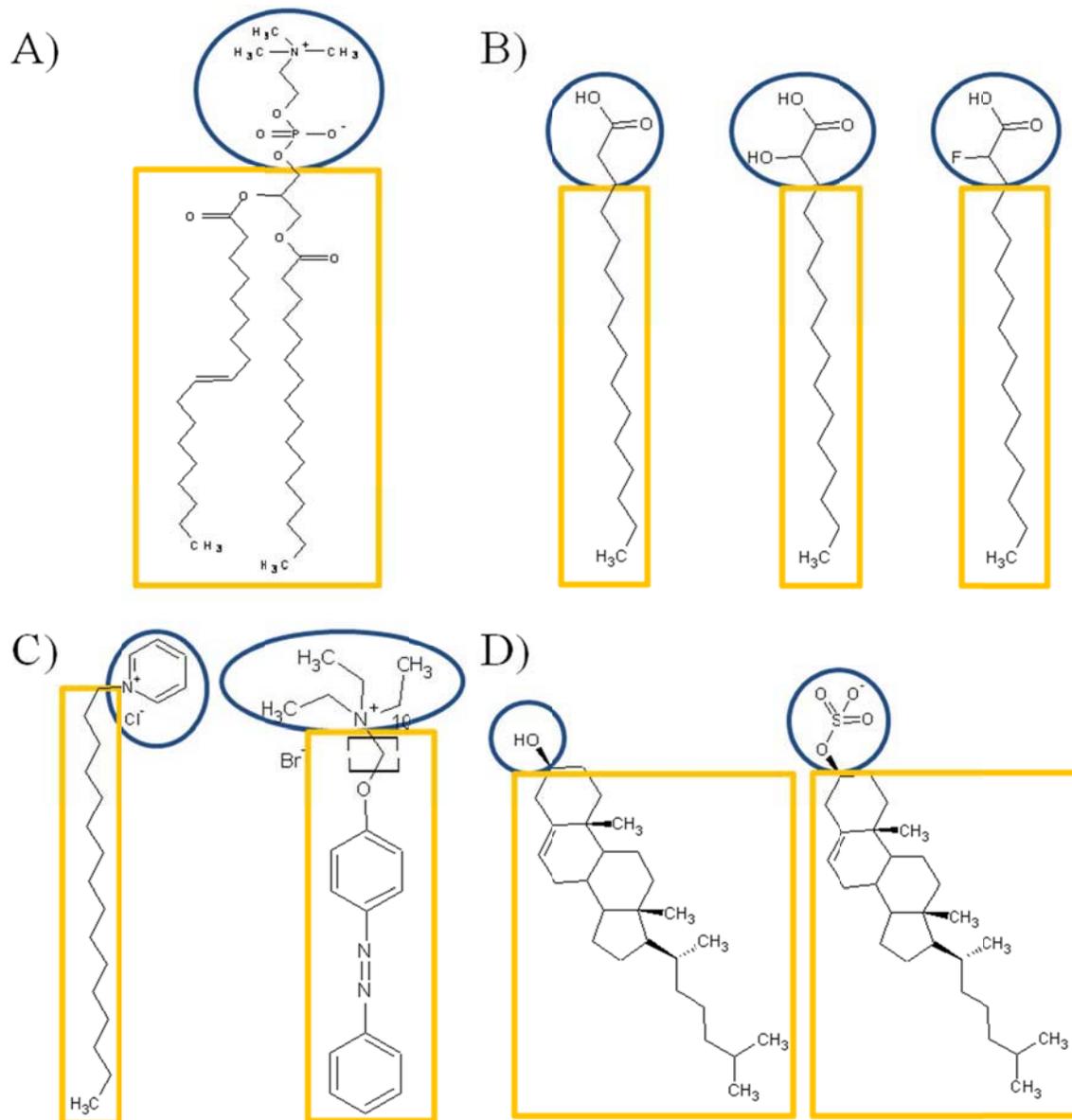


Figure 1.3 : Structures de différents amphiphiles. En bleu, sont encerclées les parties hydrophiles. Les parties hydrophobes sont représentées dans les rectangles orange. A) Un phospholipide : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine, POPC. B) Des acides gras. De gauche à droite : acide palmitique, PA, acide α -hydroxypalmitique, α OH-PA, et acide α -fluoropalmitique, α F-PA. C) Des QACs. De gauche à droite : chlorure de cétylpyridinium, CPC, et bromure de décyl-azobenzyl-triéthylammonium, AzoC₁₀N⁺. D) Des stérols. De gauche à droite : cholestérol, Chol, et sulfate de cholestérol, Schol.

1.2.1.1 Les phases lyotropes

Il existe des phases lyotropes avec différentes architectures mais, dans le cadre de cette thèse, nous nous limiterons aux phases micellaires et lamellaires, dont une représentation est donnée dans la figure 1.4.³³



Figure 1.4 : Schéma d'une micelle (à gauche) et d'une bicouche (à droite).

Beaucoup d'efforts ont été fournis pour essayer de prédire la phase adoptée par un amphiphile. Un modèle en particulier concorde bien, de manière générale, avec l'observation : le modèle d'Israelachvili.³⁴ Ce modèle simple se base sur la géométrie de la molécule pour prédire la phase préférentiellement adoptée selon la valeur du facteur de forme qui est le rapport entre la section efficace occupée par les chaînes sur la section efficace occupée par la tête polaire. Lorsque la section efficace occupée par la chaîne de l'amphiphile est faible comparée à la section occupée par la tête polaire (facteur de forme inférieur à 1/3), la molécule a une forme plutôt conique et l'auto-assemblage en micelles sphériques est favorisé. C'est généralement le cas des amphiphiles ne possédant qu'une seule chaîne, comme les acides gras et les QACs. Si l'aire occupée par la tête polaire est similaire à la section occupée par les chaînes (facteur de forme compris entre 0.5 et 1), l'amphiphile a une forme cylindrique ou quasi-cylindrique et les phases dites lamellaires sont favorisées. Les phospholipides à double chaînes, comme la POPC, se trouvent généralement dans ce cas. Si les chaînes occupent une section plus grande que la tête polaire (facteur de forme supérieur à 1), les phases inverses apparaissent. C'est le cas des amphiphiles double-chaîne possédant une petite tête polaire comme les phosphatidyléthanolamines insaturées.

En dehors de ces considérations géométriques, les phases lyotropes sont aussi influencées par la concentration de l'amphiphile. Dans le cas des surfactants, le modèle d'Israelachvili prédit un auto-assemblage en micelles. En réalité, aux plus faibles concentrations, le détergent reste sous forme de monomères. Au fur et à mesure que la concentration en détergent augmente, la concentration en monomère augmente (fortement) puis atteint un régime où son augmentation est quasi-nulle. Ce régime correspond à la formation de micelles et l'entrée dans ce régime correspond à la concentration micellaire critique (CMC). En augmentant encore la concentration, les amphiphiles à simple chaîne peuvent aussi former des phases lamellaires à très haute concentration (par exemple, le dodécylsulfate de sodium, SDS, et les acides gras à partir de 65 % en poids).^{35,36}

Associés aux propriétés structurales et à la concentration des amphiphiles, des paramètres externes peuvent modifier la formation de ces phases. Les structures résultantes peuvent être modifiées par de faibles changements de température, de pH, de force ionique ou de composition du mélange, etc., car tous ces facteurs externes peuvent modifier les interactions entre agrégats ou entre molécules dans les agrégats.³⁴ Par exemple, les amphiphiles menant à une phase micelle sphérique portent en général des charges qui leur confèrent une tête polaire effective large. En règle générale, l'augmentation de la quantité de NaCl en solution peut venir écranter les répulsions électrostatiques entre têtes polaires et faire diminuer la CMC des détergents portant une charge.³⁷⁻⁴¹ Un autre facteur externe joue un rôle très important, notamment pour les acides gras : le pH de la solution. À haut pH, lorsque leur fonction carboxylique devient déprotonnée, la section occupée par la tête polaire peut devenir suffisamment large par rapport à la section occupée par la chaîne pour que la formation de micelles soit favorisée. En diminuant le pH, une certaine proportion d'acides gras se protone. La protonation fait diminuer la section occupée par la tête polaire et peut faire augmenter le facteur de forme. Lorsque les proportions d'acide protoné et d'acide déprotoné deviennent équivalentes,⁴² les acides gras peuvent adopter une phase lamellaire. Enfin, lorsque le pH diminue encore, de plus en plus d'acides gras deviennent protonés. Dépendamment de la longueur de leur chaîne, ils peuvent former des huiles (chaîne courte) ou ils peuvent précipiter (chaîne longue).

1.2.1.2 Les phases lamellaires : insertion de stérol

Les bicouches peuvent exister sous différentes phases. Une représentation des principales phases est donnée à la figure 1.5. La phase gel, L_β , est caractérisée par un coefficient de diffusion latérale faible ($< 1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$),⁴³ des chaînes dans la conformation presque toutes *trans*, donc étirées, et des têtes polaires disposées dans un réseau hexagonal (ordre à courte distance). C'est une phase ordonnée et peu fluide, assimilée à une phase solide bidimensionnelle. Dans la phase gel, les chaînes peuvent être parallèles à la normale à la bicouche, tiltées (l'axe long des chaînes forme un angle avec la normale à la bicouche) ou ondulée. Lorsque les chaînes sont parallèles à la normale à la bicouche, les bicouches sont d'épaisseur maximale. Alors que lorsque les chaînes sont tiltées, la bicouche est moins épaisse. Au contraire, la phase liquide-cristalline (L_α) présente un coefficient de diffusion latérale élevé ($4 \text{ à } 12 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$),⁴³ des chaînes pour lesquelles on retrouve une isomérisation *trans*-gauche c'est-à-dire menant à des chaînes désordonnées donnant une membrane moins épaisse et des têtes polaires sans ordre bidimensionnel.³³ C'est une phase fluide assimilée à une phase liquide bidimensionnelle. La température à laquelle les lipides passe de la phase gel à la phase L_α est appelée la température de fusion, T_m , qui correspond à tous les changements indiqués plus haut.

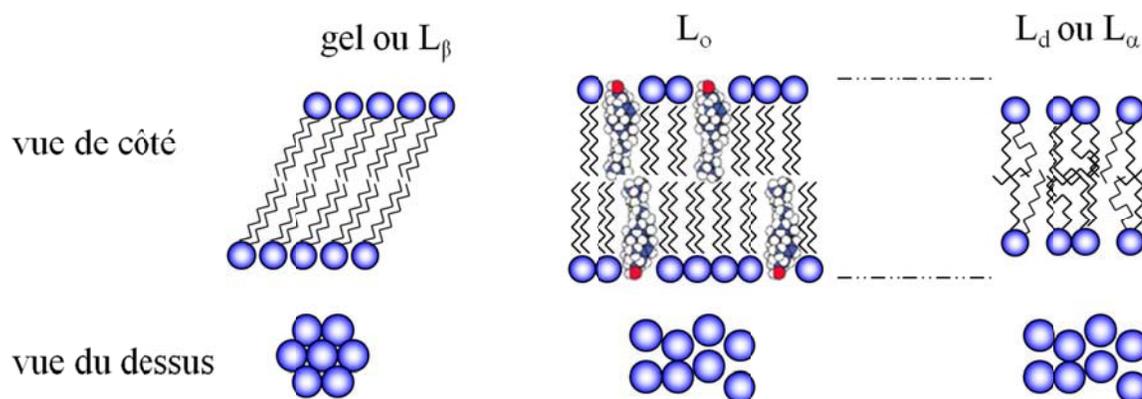


Figure 1.5 : Représentation des phases gel (avec des chaînes tiltées), L_o et L_d .

En 1968, Ladbrokee *et al.* montrent que l'insertion d'une grande quantité de Chol dans la membrane modifiait le comportement de phase de la 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (DPPC) et tendait à fluidifier ses chaînes.⁴⁴ Beaucoup de recherches ont été menées sur le mélange DPPC/Chol. Plusieurs techniques de pointe ont été utilisées, allant de la calorimétrie aux méthodes spectroscopiques.^{45,46} En 1987, Ipsen *et al.* tracent et expliquent un diagramme de phase du DPPC/Chol en proposant un modèle basé sur la thermodynamique et les interactions entre lipides.⁴⁶ À faible concentration en Chol (< 5 (mol) %), la transition L_{β} - L_{α} s'affaiblit et s'élargit. À des concentrations intermédiaires en Chol (10 à 20 (mol) %), la coexistence de deux phases fluides est observée au-delà de la T_m . À plus haute concentration (> 30 (mol) %), le Chol élimine la transition de phase. La disparition de la T_m a lieu en faveur de l'apparition d'une autre phase qui est stable de 5 à 55 °C et dont les propriétés sont intermédiaires entre les états L_{α} et L_{β} .⁴⁷ Pour ces raisons, Ipsen *et al.* l'ont nommée la phase liquide ordonnée, L_o , par opposition à la phase L_{α} devenant la phase liquide désordonnée (L_d).⁴⁶ Dans la phase L_o , comme dans la phase gel, les chaînes sont presque toutes en conformation *trans* : elle est donc ordonnée. Mais, comme dans la phase L_d , le coefficient de diffusion latérale reste élevé (2 à $10 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) et les têtes polaires ne sont pas ordonnées dans le plan de la membrane (fig. 1.5) : cette phase est donc fluide.^{43,46,47} Cet effet est associé à la capacité du Chol à ordonner les chaînes. Cette capacité a des répercussions sur d'autres propriétés. L'augmentation de l'ordre des chaînes favorise les interactions attractives de Van der Waals entre les chaînes, ce qui a pour effet de compresser la membrane (effet de condensation) et d'augmenter l'épaisseur de la bicouche.⁴⁸ Comme il sera expliqué dans la section 1.2.2.3, tous ces paramètres modifient la perméabilité de la membrane.

À ce stade, il est important de souligner que certains dérivés du Chol ont aussi des propriétés similaires. Le lecteur pourra se référer à la revue écrite par Rog *et al.* pour de plus amples détails.⁴⁸ Nous nous limiterons ici au cas du Schol. Le Schol possède un groupement sulfate qui remplace le groupement hydroxyl du Chol. Le sulfate étant un groupement plus gros que le groupement OH et étant chargé négativement au pH physiologique, cette différence entraîne des effets différents sur la membrane.⁴⁹ Ce dernier ordonne aussi les chaînes lipidiques mais l'ordre associé au Schol est moins élevé que dans

le cas du Chol.^{48,49} Outre ce paramètre, par rapport au Chol, le Schol montre d'autres différences notamment un degré d'hydratation de la membrane différent dû à sa charge.⁴⁹

1.2.2 Les liposomes et leurs propriétés

1.2.2.1 Types de liposomes

Les liposomes peuvent être unilamellaires (la membrane est constituée d'une seule bicouche) ou multilamellaires (dans ce cas, les liposomes contiennent plusieurs bicouches). Une représentation est donnée dans la figure 1.6. Les liposomes unilamellaires sont classés selon leur taille : les petites vésicules unilamellaires (Small Unilamellar Vesicles, SUVs) de moins de 50 nm de diamètre, les vésicules unilamellaires larges (Large Unilamellar Vesicles, LUVs) dont le diamètre est d'une centaine à quelques centaines de nm de diamètre et les vésicules unilamellaires géantes (Giant Unilamellar Vesicles, GUVs) dont le diamètre est de plusieurs μm . Parmi les systèmes multilamellaires, les vésicules multilamellaires (MultiLamellar Vesicles, MLVs) sont de quelques μm de diamètre et les différentes bicouches sont disposées de manière concentrique, à la manière d'un oignon. Il existe aussi les vésicules multivésiculaires, aussi appelées oligovésiculaires, (MultiVesicular Vesicles, MVVs ou OligoVesicular Vesicles, OVVs) qui sont formées de petites vésicules incluses dans une autre vésicule plus grande. Les MLVs se forment spontanément lorsque les lipides sont dispersés dans une phase aqueuse. Pour former des liposomes unilamellaires, il faut apporter de l'énergie pour briser les vésicules multilamellaires.^{28,29,50} Cette énergie peut provenir d'une pression qui force l'extrusion de la dispersion lipidique au travers les pores d'un filtre ou d'ultrasons.

Le type de liposome à utiliser est déterminé selon plusieurs critères. Un de ces critères est donné par la nature de l'agent actif à encapsuler. Pour les molécules hydrophiles, les liposomes unilamellaires sont favorisés car ils peuvent contenir un grand volume de phase aqueuse.²⁹ À l'inverse, les agents hydrophobes s'insèrent dans la membrane plutôt qu'à l'intérieur du liposome.⁵¹ Pour ces composés-là, les systèmes multilamellaires sont favorisés, car ils permettent une plus grande encapsulation. La

capacité d'encapsulation représente le volume de solution encapsulée par rapport à la quantité de lipides. Cette capacité d'encapsulation est elle-même un critère important. Ainsi, les SUVs présentent une capacité d'encapsulation plus faible que les LUVs,⁸ elle-même plus faible que les GUVs. Enfin, dans une optique commerciale, les SUVs et les LUVs peuvent être préparés par des techniques plus facilement applicables à l'échelle industrielle.²⁹ Les suspensions de SUVs et de LUVs sont aussi facilement stérilisées par filtration (l'autoclave ou l'irradiation peuvent dégrader les lipides ou l'agent actif).

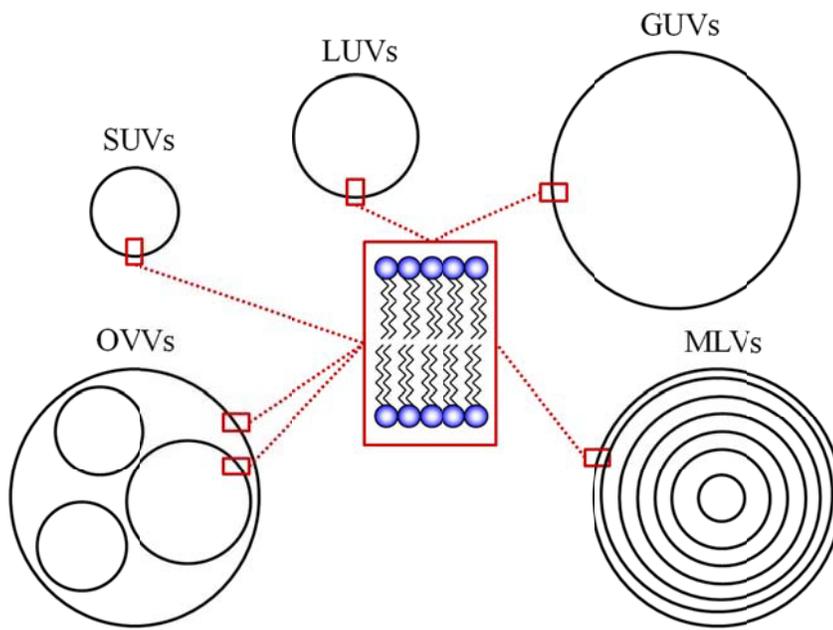


Figure 1.6 : Schémas des différents types de liposomes.

1.2.2.2 Méthodes de formation

Plusieurs méthodes ont été développées pour former des liposomes et chacune présente des avantages et des inconvénients. Les liposomes peuvent être obtenus par des méthodes dites mécaniques et non-mécaniques.

Parmi les méthodes dites non-mécaniques, se trouve la réhydratation du mélange lipidique après lyophilisation (freeze-drying/rehydration).²⁸ Cette méthode permet d'augmenter la capacité d'encapsulation des MLVs.⁵² La suspension aqueuse contenant le produit à encapsuler est séchée. En séchant, les vésicules fusionnent et piègent le produit à encapsuler entre les différentes bicouches. Puis le film est graduellement réhydraté. Comme le produit se trouve déjà entre les bicouches de lipides, la capacité d'encapsulation des MLVs formées est augmentée.

L'hydratation par des cycles de gel-dégel (freeze-thawing cycles) est une autre méthode non-mécanique.²⁸ Les cycles gel-dégel permettent d'améliorer l'efficacité d'encapsulation par diminution de la lamellarité des MLVs et aussi par la formation d'OVVs.⁵² La taille des liposomes formés est aussi légèrement réduite. Dans cette méthode, le mélange lipidique est congelé (dans de l'azote liquide) puis amené à une température au-dessus de sa T_m . Ce cycle est répété plusieurs fois. Même si les MLVs permettent d'encapsuler dans leur membrane plus de molécules hydrophobes que les vésicules unilamellaires, l'encapsulation est typiquement 1 à 2 %, rarement supérieure à 5 %.²⁸

Une autre méthode est connue sous le nom d'évaporation en phase inverse (reverse phase evaporation).^{28,50,53} Le mélange lipidique est d'abord solubilisé dans un solvant organique. Le composé, qui doit être encapsulé, est solubilisé dans une solution aqueuse. Cette solution aqueuse est ajoutée sous agitation à la solution organique. Ce processus forme d'abord des émulsions, où les lipides sont dans des phases inverses. Puis, le solvant organique est évaporé. En résulte une dispersion de vésicules (LUVs et même OVVs) dont la polydispersité peut être grande et multimodale. D'autre part, il est parfois difficile d'évaporer complètement le solvant organique.

Une dernière méthode consiste en l'appauvrissement en détergent d'un mélange lipides/détergents (depletion dialysis).²⁸ Si le détergent est mis en excès (comparé à la quantité de lipides), le mélange résultant est formé de micelles mixtes (composées de lipides et de détergents) en équilibre avec le détergent monomère. Par dialyse, la quantité de détergents monomères est éliminée, ce qui déplace l'équilibre et force le détergent à

quitter les micelles mixtes. Lorsque tout le détergent est éliminé, il en résulte des vésicules (LUVs ou SUVs) dont la taille dépend de la nature et de la quantité de détergent utilisé, ainsi que de la vitesse d'appauvrissement en détergent. Cette situation rend le contrôle de la taille difficile. D'autre part, c'est un processus lent qui peut laisser une petite quantité de détergent dans la solution, ce qui peut être nuisible aux expériences subséquentes. L'efficacité d'encapsulation peut atteindre 50 %.

Les méthodes dites mécaniques sont les plus souvent utilisées. Parmi ces techniques se trouve la sonication.²⁸ Le mélange lipidique est soumis aux ultrasons, soit dans un bain sonicateur, soit à l'aide d'un sonicateur à pointe. La propagation des ultrasons conduit à la formation d'un flux très turbulent qui détruit les liposomes de grosse taille et mène à la formation de petites vésicules (SUVs) qui résistent mieux à ce stress que les liposomes de plus grosse taille. Par cette méthode, les tailles obtenues sont souvent polydisperses.⁵⁰ D'autre part, la température et la pression créées peuvent être élevées et difficilement contrôlables. Enfin, les SUVs ainsi formées sont souvent instables et tendent à fusionner.

L'extrusion est une autre méthode pour obtenir des liposomes unilamellaires.^{28,29,54} La suspension liposomale passe à travers des filtres possédant des pores de taille homogène. Le passage exerce des forces de cisaillement qui brisent les liposomes de taille supérieure aux pores des filtres. Ils forment alors des liposomes unilamellaires dont la taille est dictée par la taille des pores, mais dépendent aussi de la vitesse d'extrusion et de la pression appliquée (plus ces deux paramètres sont élevés, plus la taille finale est petite).²⁸ Ainsi, des SUVs ou des LUVs peuvent facilement être obtenues. Par cette méthode, il faut extruder à une température supérieure à la T_m des lipides. L'extrusion est une technique qui est adaptable à grande échelle. L'efficacité d'encapsulation passive dépasse rarement les 30 % ;^{29,54} des approches d'encapsulation actives ont cependant été développées²⁹ et permettent d'atteindre une encapsulation supérieure à 90 %.

Enfin, les GUVs peuvent être obtenus par électroformation. Brièvement, le mélange lipidique, solubilisé dans un solvant organique, est vaporisé sur deux électrodes de Platine, à basse pression pour évaporer le solvant. Les électrodes sont ensuite placées dans une

cellule contenant la solution aqueuse qui est scellée par la suite. Puis un courant d'une certaine fréquence est appliqué. La fréquence est diminuée petit à petit pour permettre aux liposomes de se détacher des électrodes. Les GUVs ainsi obtenus peuvent atteindre des tailles de 100 μm .⁵⁵⁻⁵⁷

1.2.2.3 Facteurs influençant l'efficacité d'un vecteur

Les formulations liposomales possèdent une perméabilité passive. Cette perméabilité passive se traduit par la diffusion de molécules à travers la membrane. Une suggestion met en jeu les volumes libres, existants dans la membrane comme entités dynamiques, pour expliquer la diffusion de molécules à travers la membrane et donc leur perméabilité passive.^{43,48,58,59} Ces vides sont induits par les conformations gauche le long des chaînes. Les fluctuations thermiques redistribuent ces vides et les molécules peuvent donc diffuser à travers la membrane.⁴³ Lorsque la membrane est dans la phase gel, un ordre élevé des chaînes augmente la compacité/densité de la membrane et donc limite la formation et diffusion de ces volumes libres. De plus, l'épaisseur de la membrane est plus élevée que la phase fluide. Ainsi, la phase gel est en général peu perméable comparée à la phase L_d où les isomérisations *trans*-gauche des chaînes induisent un plus grand nombre de vides et une diffusion de ces vides plus grande. À ce phénomène s'ajoute une épaisseur de la membrane plus faible, ce qui augmente aussi la perméabilité passive de la bicouche.

Dans le domaine de la libération d'agents actifs thérapeutiques par injections intraveineuses, deux facteurs influencent grandement l'efficacité d'un vecteur : la perméabilité du vecteur et son temps de circulation dans le corps.⁶⁰ Plus le vecteur est perméable, et moins l'accumulation d'agents actifs dans la zone malade est importante comparée au médicament libre. Nous avons vu, dans la section précédente, que l'insertion de Chol favorise la formation de la phase L_o . Parce que cette phase est ordonnée, le nombre de volumes libres est réduit, ce qui réduit donc la perméabilité de la membrane en phase L_o comparée à une membrane en phase L_d .^{43,48} Donc l'insertion de Chol dans la membrane

permet d'obtenir des formulations moins perméables mais qui restent dans un état fluide. Pour ces raisons, le Chol est parfois introduit dans les formulations liposomales.⁵

D'autre part, plus le vecteur circule longtemps dans le corps, plus il peut s'accumuler dans la zone malade par effet EPR. En général, une haute concentration en lipides chargés, anioniques ou cationiques, augmente le taux d'élimination des liposomes.⁵ Des stratégies sont donc développées afin de diminuer l'élimination du vecteur dans le système sanguin par le système immunitaire. Cette reconnaissance peut être diminuée par inclusion de Chol dans la membrane. Il est connu pour réduire les interactions avec les protéines et opsonines du plasma.⁵ Une autre stratégie adoptée pour diminuer l'élimination du vecteur est la pegylation : le but est de couvrir le nanovecteur d'une 'coquille' les rendant 'invisibles' au système immunitaire (pour plus de détails, se référer à la revue de Harris *et al.*).⁶¹ En réalité, beaucoup de facteurs influencent l'élimination du vecteur de la circulation sanguine. Brièvement, en plus de la charge, la taille des particules influence aussi la réponse du système immunitaire : les très petites particules dont la taille est inférieure à 4 à 8 nm et les particules très grosses, comme les GUVs, sont plus rapidement éliminées.⁵ Les particules dont les tailles vont de quelques dizaines à quelques centaines de nm (comme les SUVs et les LUVs) ont moins tendance à être éliminées. Ainsi, les LUVs d'un diamètre de l'ordre de 100 nm répondent bien à ce critère, tout en présentant l'avantage d'avoir un bon volume d'encapsulation comparés aux SUVs.⁸ Les paramètres influençant la réponse du système immunitaire étant nombreux, plus de détails sont donnés dans la revue de Drummond *et al.*.⁵

1.3 Les liposomes non-phospholipidiques

1.3.1 Exemples de liposomes non-phospholipidiques

D'une manière générale, les liposomes sont en majorité formés de phospholipides car ce sont des molécules naturelles, bien que ces liposomes soient instables (tendance à l'aggrégation/fusion) et perméables.⁶² De plus, la synthèse et la purification des lipides sont des processus coûteux. Ainsi, la production des liposomes phospholipidiques à

l'échelle industrielle est assez onéreuse. Il est donc important de comprendre comment la formation de tels systèmes est possible afin d'optimiser leur propriétés physico-chimiques pour une meilleure stabilité et une plus faible perméabilité à des coûts plus faibles. Un paramètre important est la balance hydrophile/hydrophobe de l'amphiphile, donnée par la géométrie de la molécule, selon le concept d'Israelachvili.³⁴ Ainsi, les amphiphiles ayant une section de la tête polaire équivalente à la section occupée par la ou les chaînes (facteur de forme de 0.5 à 1) peuvent former des phases lamellaires, et donc montrent un certain potentiel pour former des vésicules. De ce principe géométrique, il découle la possibilité de préparer des liposomes composés d'amphiphiles dont la nature chimique des groupements polaires et apolaires peut être très variée. La partie apolaire peut être constituée d'une simple ou de plusieurs chaînes, saturées ou insaturées, linéaires ou ramifiées, ou d'un squelette stéroïde.^{63,64,63,64} La partie polaire peut être neutre, anionique, cationique ou zwitterionique. Elle peut être représentée par des groupements carboxyliques, des groupements hydroxyls, des groupements azotés ou sulfatés, des polyoxyéthylènes, des polyglycérols, des oses, des acides aminés, des éthers couronne, etc. La nature chimique très variée des têtes polaires indique que ce paramètre n'est pas crucial pour former des liposomes, la taille de cette partie polaire étant beaucoup plus fondamentale.

Les différentes combinaisons des parties polaires et apolaires donnent des amphiphiles et donc des liposomes de nature très variée. Certains font partie d'une classe bien définie. Par exemple, des vésicules polymérisées ont été formulées.⁶⁵ Les composants de telles vésicules contiennent un lien triple qui permet une polymérisation en 2D. La polymérisation se fait en général par irradiation UV (photo-polymérisation). Elle peut aussi être provoquée par ultrasons ou chimiquement. Le groupement peut être placé au niveau des têtes polaires, sur les chaînes ou en bout de chaîne. En général, la polymérisation est utilisée pour stabiliser les liposomes instables, mais elle peut aussi servir à destabiliser les liposomes.^{66,67} D'autres liposomes peuvent être constitués de lipides bipolaires ou bolaamphiphiles, c'est-à-dire de surfactants possédant deux têtes polaires reliées entre elles par une à trois chaînes hydrocarbonées.⁶⁵ Si les deux têtes polaires sont de même section efficace, des bicouches planes sont obtenues. Si par contre, elles ont des sections efficaces différentes, les bicouches posséderont une courbure spontanée et pourront donner lieu à la

formation de liposomes thermodynamiquement stables. Dans les années 1970, Gebicki et Hicks ont préparé des liposomes à partir d'acides gras à longues chaînes insaturées qu'ils ont appelé les Ufasomes pour « Unsaturated Fatty Acids ». ⁶³ Par la suite, Hargreaves *et al.* ont formulé des liposomes, appelés liposomes détergents, constitués d'un mélange de détergents cationiques et anioniques possédant une simple chaîne saturée. ⁶⁵ Les Niosomes™ de L'Oréal sont constitués de surfactants non-ioniques. ^{63,65} La partie hydrophobe de ces amphiphiles peut être constituée d'une ou deux chaînes ou d'un squelette stéroïde. La partie hydrophile peut être constituée d'un condensat d'oxyde d'éthylène, de glycérol ou d'oses. Les parties hydrophiles et hydrophobes sont reliées par un groupement éther ou ester. La perméabilité de ces vésicules peut être modulée par la longueur des chaînes. Du Chol peut être introduit pour améliorer leur imperméabilité. Ces liposomes étant non-chargés, il est parfois nécessaire d'y introduire des lipides chargés ou qui occasionnent un encombrement stérique pour empêcher la floculation/agrégation/fusion des liposomes. ^{63,64} Ainsi, la composition générale est le mélange de 47.5 % d'acyléther de polyglycérol, 47.5 % de Chol et 5 % de dicétylphosphate ou de Solulan™. ^{63,68} Les Novasomes® de Micro Vesicular Systems, Inc. sont des microsphères de lipides. ^{62,69} En majorité, ces vésicules sont formées de plusieurs bicouches. Leur composition générale est un mélange de 75 % d'acyléther de polyoxyéthylène, 20 % de Chol et 5 % d'acides gras ou de QACs (qui jouent le rôle de modules ionogéniques). Dépendamment de leur composition, ces liposomes peuvent présenter un cœur aqueux prédominant ou un cœur hydrophobe prédominant. L'avantage apporté par les Novasomes® est leur capacité à encapsuler une grande quantité d'agents actifs hydrophobes comme des huiles. Enfin, une dernière catégorie de liposomes non-phospholipidiques est formée de polymères : les polymersomes. Ces vésicules sont constituées de co-polymères bloc amphiphiles dont un bloc est hydrophile et l'autre bloc est hydrophobe. La nature des polymères étant très large et variée, pour plus de détails quant à leur structure, leur méthode de formation et leurs applications, le lecteur pourra se référer à quelques revues. ⁷⁰⁻⁷⁴

1.3.2 Les liposomes non-phospholipidiques riches en stérol

La capacité des mélanges amphiphiles monoalkylés/stérols à former des phases lamellaires n'était pas pressentie. Pourtant, ces mélanges montrent des propriétés inhabituelles. D'abord, ces systèmes contiennent une proportion de stérol considérablement plus grande que les systèmes phospholipidiques. Bach *et al.* ont répertorié les limites de solubilité du cholestérol dans différents systèmes phospholipidiques.⁷⁵ Quelques exemples sont donnés dans le tableau 1.1. Les systèmes composés de phospholipides à double-chaîne ne peuvent pas contenir plus de 50 % de cholestérol et, pour la majorité d'entre eux, la limite de solubilité du Chol est de 30 à 40 %.

En 2001, Paré *et al.* ont rapporté l'obtention d'une phase L_o dans des mélanges constitués de PA/Chol à différentes compositions.⁷⁶ Un diagramme température-composition de ces systèmes a été proposé. Le diagramme montre que, pour une proportion de 70 % en Chol, le mélange forme exclusivement la phase L_o . Lorsque cette proportion s'éloigne de 70 %, la phase L_o est en présence d'autres phases. Les auteurs ont proposé que le système PA/Chol pouvait potentiellement former des liposomes qui pourraient être sensibles au pH étant donné la présence d'acide palmitique. Puis, en 2003, Ouimet *et al.* ont étudié le système PA/Chol dans différentes proportions et en fonction du pH et de la température.⁷⁷ Ils observent qu'à pH 5.5, une phase solide se forme et une transition vers la phase L_o est observée vers 50 °C, alors qu'à haut pH > 8.5, la phase L_o est stable de 20 à 70 °C. En 2004, Ouimet *et al.* ont montré qu'il est possible d'obtenir la phase L_o avec d'autres acides gras dans des mélanges équimolaires en acides gras et en Chol, le facteur primordial pour former cette phase étant la correspondance de la longueur de la chaîne de l'acide gras avec la longueur du cholestérol.⁷⁸ Puis, en 2007, Bastiat *et al.* ont formé des vésicules de PA/Chol (30/70 mol/mol) et ont étudié la perméabilité de ces mélanges en fonction du pH.⁸ Ils ont aussi formé des mélanges constitués de PA/Schol et de PA/Chol/Schol (dans différentes proportions en stérol), toujours en gardant une proportion de 70 % en stérol. Ces mélanges sont aussi capables de former des vésicules.⁹ Dans le même temps et indépendamment, Ramakrishnan *et al.* ont étudié des mélanges

Tableau 1.1 : Quantité maximum de Chol dans des liposomes phospholipidiques (dits conventionnels) avant l'apparition de cristaux de Chol.⁷⁵

Phospholipides	Pourcentage maximum de Chol inséré (%)
DMPE; DMPG; DMPC	43; 44; 45
DOPE; DSPG; DPPS; DPPG; DMPS	33; 35; 36; 37; 37
SOPS	20
DDPC	10

dimyristoylphosphatidyléthanolamine (DMPE) ; dimyristoylphosphoglycérol (DMPG) ; dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) ; dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE); distearoylphosphoglycérol (DSPG) ; dipalmitoylphosphatidylsérine (DPPS) ; dipalmitoylphosphoglycérol (DPPG) ; dimyristoylphosphatidylsérine (DMPS) ; stearyloléoylphosphatidylsérine (SOPS) ; didécanoylphosphatidylcholine (DDPC).

constitués de 50-40 % de N-acétyléthanolamine (NAE) ou ses dérivés et de 50-60 % de Chol par DSC.⁷⁹ En plus de celle du NAE, ils ont observé l'apparition d'une autre transition représentée par un pic dont l'aire atteint un maximum pour une proportion de 50-60 % de Chol. Les auteurs attribuent ce phénomène à la formation d'un complexe NAE-Chol. En 2008, Gater *et al.* ont étudié des mélanges constitués de lyso-palmitoylphosphatidylcholine (lyso-PPC) et de Chol par RMN ³¹P.⁸⁰ Lorsque du Chol est ajouté à de la lyso-PPC, ils ont observé la disparition des micelles de lyso-PPC en faveur de l'apparition de la phase L_o. Pour une proportion de 70 % de Chol, toutes les micelles de lyso-PPC ont disparu et seule reste la phase L_o. Enfin, en 2009, Cui *et al.* ont étendu la possibilité de former la phase L_o et de former des vésicules avec d'autres stérols que le Chol et le Schol. Ces mélanges sont constitués de 30 % de PA et 70 % de différents stérols.⁸¹

Même si ces mélanges contiennent une grande quantité de stérol, contre-intuitivement, ils sont capables de former une phase L_o stable sur une grande gamme de température. Cette propriété ne s'applique pas seulement à un système en particulier mais s'applique aussi à différents amphiphiles monoalkylés et à différents stérols, pourvu que ces mélanges répondent à certains critères. Notamment, la longueur de la chaîne alkyle de l'amphiphile semble jouer un rôle crucial dans ces mélanges, comme l'ont montré Ouimet *et al.*⁷⁸ Dans cette étude, ils ont montré que les acides gras dont la longueur de la chaîne était composée de 14 à 18 carbones (et donc correspondait à la longueur du Chol, 16 Å) pouvaient former cette phase alors que les acides gras plus courts ou plus longs ne le pouvaient pas. Comme il a été remarqué pour d'autres systèmes,⁸²⁻⁸⁹ la concordance hydrophobe entre le Chol et les molécules environnantes joue un rôle important sur certaines propriétés.

La structure des stérols aussi joue un rôle important dans la formation de la phase L_o, comme l'ont montré Cui *et al.*⁸¹ Dans cette étude, les mélanges entre le PA et les stérols dont la chaîne est identique à celle du Chol (de structure 2,6-diméthylheptane sur le carbone C17) forment exclusivement une phase L_o. L'ajout d'insaturations ou de

substituants, conduisant à des chaînes branchées, rend la chaîne plus volumineuse et réduit la quantité de phase L_o formée. Excepté le système contenant l'ergostérol, ces systèmes sont capables de former des vésicules. Les vésicules constituées de stérols à chaîne identique à celle du Chol montrent une perméabilité passive plus faible que celles contenant une chaîne plus volumineuse. Il a été proposé que le volume de la chaîne empêche le stérol d'ordonner les chaînes de manière efficace, ce qui conduit à une perméabilité plus élevée.

Les vésicules formées à partir des mélanges amphiphiles monoalkylés/stérols présentent des propriétés intéressantes. D'abord, leur perméabilité passive est faible par rapport aux liposomes conventionnels. Ces liposomes restent imperméables sur de longues périodes (plusieurs mois, voir quelques années). D'autre part, les vésicules contenant le PA se sont montrées sensibles au pH. Lorsque le PA est mélangé à du Chol, les vésicules de PA/Chol restent stables à haut pH mais libèrent leur contenu à bas pH.⁸ À l'inverse, lorsque le PA est mélangé à du Schol, les vésicules de PA/Schol sont stables à bas pH et libèrent leur contenu à haut pH. Cette propriété a été reliée à la capacité de mélange de ces molécules pour former une phase L_o stable. En effet, pour le PA/Chol, à haut pH, l'état déprotoné du PA force les molécules de PA^- à se mélanger au Chol afin de réduire les répulsions électrostatiques. À bas pH, la protonation de l'acide mène à une séparation des phases solides formées par le PA et le Chol. À l'inverse, dans le système PA/Schol, à bas pH, le Schol tente de réduire les répulsions électrostatiques en se mélangeant au PA protoné. Alors qu'à haut pH, le PA étant déprotoné, les répulsions électrostatiques favorisent la séparation de phase et déstabilisent le système.

Enfin, ces liposomes non-phospholipidiques peuvent être chargés ou neutres,⁹⁰ dépendamment de l'amphiphile ou du stérol incorporés dans la membrane. En effet, les vésicules de PA/Chol sont chargées négativement quand elles sont stables ou sont neutres quand elles sont instables. Les vésicules de PA/Schol sont constamment chargées négativement. Récemment, des vésicules neutres ont été obtenues à partir d'un mélange d'octadécyl méthyl sulfoxyde (OMSO)/Chol (50/50 mol/mol). Mais dans ce cas, la phase L_o obtenue à température de la pièce a été montrée comme étant métastable.

1.3.3 Nos objectifs

À la suite de ces études, nous avons voulu étendre la possibilité de former des liposomes avec d'autres amphiphiles. Ainsi, nous avons voulu concevoir des vésicules contenant un amphiphile cationique, dans l'idée de former des liposomes cationiques. L'amphiphile choisi a été le CPC. Le CPC possède une chaîne de 16 carbones, compatible avec la longueur du Chol. D'autre part, c'est un antibactérien déjà approuvé par la U.S. Food and Drug Administration (FDA). Comme précédemment cité dans la section 1.1.3, les liposomes cationiques montrent un potentiel intéressant en thérapie génique. Ils peuvent se complexer avec des brins d'ADN et ainsi les amener à l'intérieur des cellules pour y libérer leur contenu et exprimer leurs gènes.

Ensuite, comme il a été montré par Bastiat *et al.*, les liposomes contenant le PA sont sensibles au pH.^{8,9} La libération d'agents actifs peut donc être provoquée par ce stimulus externe. À la suite de ces études, nous avons voulu étudier la modulabilité du pH de libération par le pK_a de l'acide gras incorporé. Pour ce faire, des dérivés du PA de pK_a différents ont été mélangés à du Chol ou du Schol.

Enfin, nous avons voulu former des liposomes répondant à un autre stimulus externe, à savoir la lumière. Dans ce but, un dérivé de l'azobenzène (AzoC₁₀N⁺) a été mélangé à du Schol. Le groupement Azo peut, avec l'illumination appropriée, s'isomériser de la forme *trans* à la forme *cis* (fig. 1.7A). La forme *trans* est thermodynamiquement plus stable que la forme *cis*,^{91,92} Elle donne une bande intense centrée autour de 350 nm et une bande faible centrée autour de 440 nm (fig. 1.7B). Ces bandes correspondent aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ et $n \rightarrow \pi^*$ respectivement.⁹²⁻⁹⁴ De la même manière, la forme *cis* donne 2 bandes de faible intensité, l'une centrée autour de 440 nm et l'autre centrée autour de 320 nm. La première bande est attribuée à la transition $n \rightarrow \pi^*$ et la deuxième à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$.⁹⁵ Le mécanisme de photo-isomérisation du groupement Azo n'est pas encore clairement établi mais deux mécanismes sont proposés. Initialement, il avait été proposé que l'isomérisation par la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ (transition $S_0 \rightarrow S_2$) se produisait par un mécanisme de rotation, alors que l'isomérisation par la transition $n \rightarrow \pi^*$ (transition $S_0 \rightarrow S_1$)

se produisait par le mécanisme d'inversion.^{93,96} Pour le mécanisme de rotation, à l'état excité, la double liaison est brisée et laisse place à une rotation libre autour de la liaison simple N-N ; cette rotation permet la formation de la forme *cis*. Alternativement, pour le mécanisme d'inversion, le doublet dans l'orbitale moléculaire non-liante de l'azote permet un état de transition hybridé sp qui conduit au passage vers l'une ou l'autre forme (*trans* ou *cis*) - la double liaison N=N est conservée.^{93,96} Cependant, des expériences et des calculs ont mené à proposer d'autres mécanismes. Diau *et al.* ont proposé un mécanisme complexe impliquant la rotation et l'inversion.⁹² L'excitation vers l'état S₁ serait suivie de l'isomérisation par rotation, alors que l'excitation vers l'état S₂ serait suivie d'une relaxation vers l'état S₁. Le retour vers l'état fondamental S₀, et donc l'isomérisation, se produirait par inversion concertée.^{92,93,96} Quelque soit le mécanisme d'isomérisation, il est possible de passer de la forme *trans* à la forme *cis* par absorption d'une longueur d'onde à 350 nm. La régénération de la forme *trans* est aussi possible par absorption d'une radiation à 450 nm ou par relaxation thermique.⁹⁶ D'autre part, l'obtention de la forme *cis* s'accompagne d'une augmentation du volume libre.⁹⁷ Ainsi, l'isomérisation de l'Azo peut engendrer des défauts dans la membrane par lesquels des molécules peuvent diffuser et être libérées.

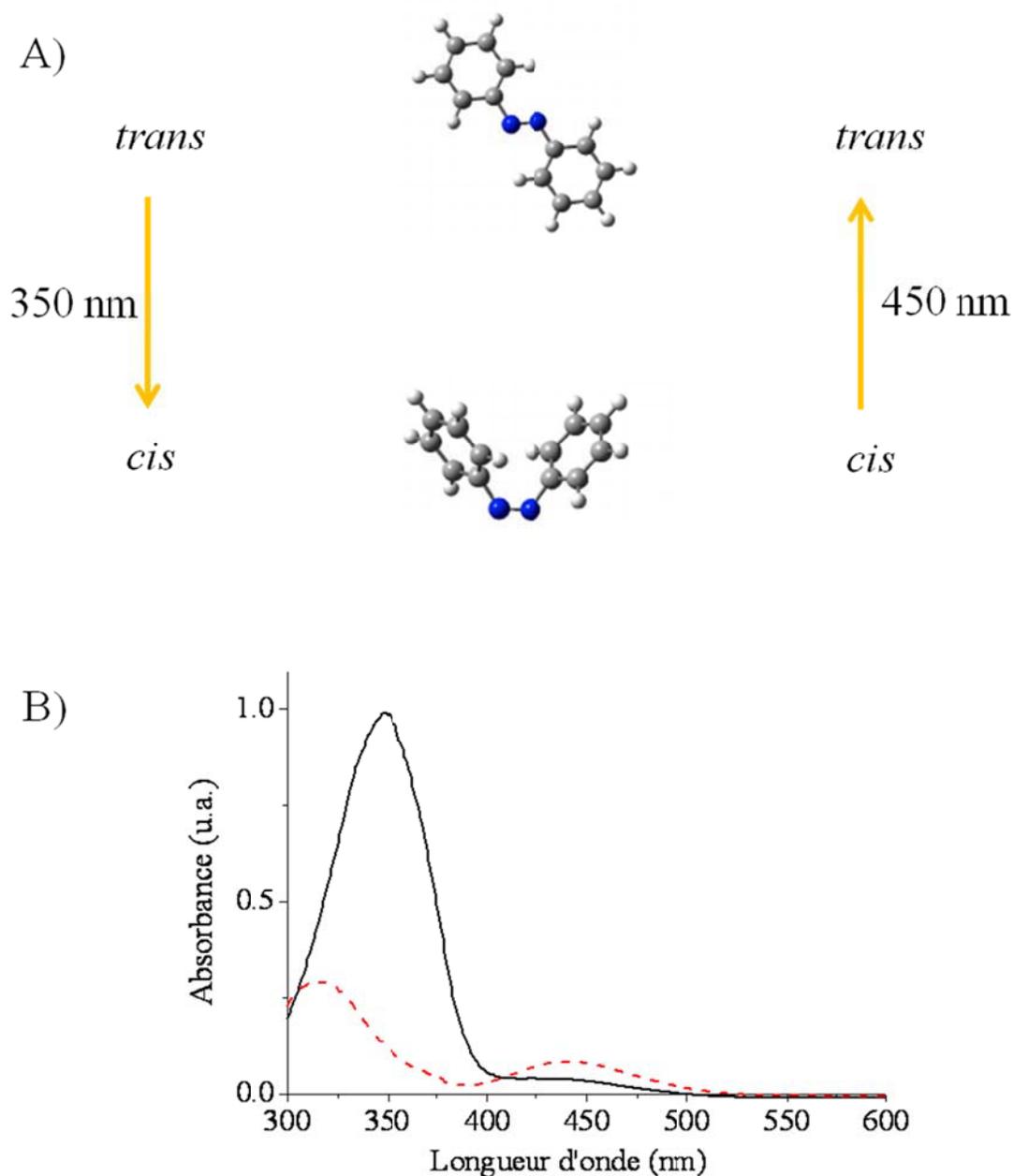


Figure 1.7 : A) Structure chimique du groupement Azo : en haut, la forme *trans*. En bas, la forme *cis*. B) Spectre UV-Vis de l'Azo libre dans une solution de CHCl_3 . En trait plein noir, spectre de la forme *trans*. En pointillés rouges, spectre de la forme *cis*. Lorsqu'une irradiation à 350 nm est appliquée, la bande à 350 nm diminue (disparition de la forme *trans*) et celles à 320 et 450 nm augmentent (apparition de la forme *cis*).

1.4 Les liposomes, comme modèles de membranes cellulaires

Les biocides, ou agents antibactériens, sont de toutes natures chimiques (hydrophiles, hydrophobes ou amphiphiles).²⁷ De ce fait, leurs actions sur les bactéries peuvent être très variées. La connaissance du mécanisme d'action du biocide permet d'améliorer l'action antibactérienne elle-même et de diminuer les effets toxiques du biocide. Aussi, connaître les mécanismes d'action permet de combiner de manière synergique les effets induits par différents agents antibactériens.^{1,98}

Les agents antibactériens peuvent être classés de différentes manières.^{1,2} L'une d'entre elles se base sur leurs mécanismes d'action. Ils peuvent réagir de manière chimique avec leur cible, par oxydation de certains groupements, halogénéation, chélation, etc. Ou ils peuvent avoir des interactions physiques avec la bactérie : ils peuvent solubiliser les protéines membranaires, solvater les phospholipides constituant la membrane ou encore agir par insertion dans la membrane. L'insertion d'une molécule dans la membrane peut causer des changements de structures fondamentaux pour la membrane et modifier certaines fonctions. L'insertion peut aussi mener à la création de défauts par lesquels le contenu cellulaire peut fuir.^{99,100}

La membrane cytoplasmique est une cible de choix pour les biocides car elle possède un rôle structural et métabolique crucial et elle présente une grande surface pour d'éventuelles interactions.² Les amphiphiles, comme les QACs, représentent le type de molécules qui interagissent facilement avec la membrane. Leur mécanisme d'action est relié à leur insertion, elle-même reliée à leur affinité avec la membrane. Ainsi, il devient important de déterminer les constantes d'affinité entre ce genre d'amphiphiles, ou détergents, et les membranes bactériennes. Une approche pour ce genre d'études est d'utiliser des liposomes comme membrane modèle. Pour les QACs, Marcotte *et al.* ont montré, par exemple, que leur affinité est due en majorité à la longueur de leur chaîne (l'affinité est principalement contrôlée par les effets hydrophobes) et en minorité due à leur charge positive qui peut interagir avec les charges négatives portées par les phospholipides (et qui mène à une petite contribution électrostatique).¹⁰⁰

Seulement quelques méthodes ont permis d'étudier l'affinité des détergents pour les membranes. Pour étudier l'insertion du SDS et de détergents non-ioniques dans des bicouches de phospholipides, Kragh *et al.* et Le Maire *et al.* ont procédé par une séparation physique entre les détergents liés et les détergents libres, marqués de manière radioactive. Les analyses se sont faites par mesure de la radioactivité des détergents et lipides.^{101,102} Mais la séparation de phase peut déplacer l'équilibre entre le détergent lié et le détergent libre.

Tsao *et al.*, Arrigler *et al.* et Kadi *et al.* ont utilisé une méthode sans séparation de phase, basée sur la conductimétrie.^{57,103,104} Dans l'étude menée par Tsao *et al.*, les liposomes sont considérés comme des particules piégeant les molécules chargées. Par conséquent, la différence de conductivité entre une solution avec et sans liposomes donne la quantité de détergent inséré. Mais les expériences ne peuvent être réalisées qu'en présence d'une faible quantité de sel (1 mM).¹⁰³ Tandis que Arrigler *et al.* et Kadi *et al.* ont utilisé une électrode sélective au détergent (en l'occurrence sélective au CPC). Dans cette étude, la concentration de détergents monomères dans l'eau est déterminée selon une courbe de calibration. Un avantage est de pouvoir travailler en présence d'électrolytes. Par contre, cette méthode se limite aux détergents ioniques.^{57,104}

Enfin, Heerklotz *et al.* ont étudié l'affinité de détergents neutres du type dodécyléther d'oxyde d'éthylène (C₁₂EO_m) pour des membranes de POPC. Leur approche est basée sur le déplacement des bandes d'émission de fluorescence d'une sonde associé au changement de son environnement causé par l'insertion du détergent dans la membrane.¹⁰⁵ Mais l'insertion d'une sonde fluorescente peut perturber la membrane et éventuellement modifier l'affinité du détergent.

La titration calorimétrique isotherme (ITC) permet de déterminer l'affinité des détergents pour les bicouches lipidiques sans séparation de phase, sans éléments radioactifs, en présence d'électrolytes et sans prendre le risque de perturber la membrane. De plus, elle permet d'étudier l'insertion de détergents ioniques ou neutres. Dans le cas précis de l'insertion de détergents dans des membranes lipidiques, elle atteint parfois ses

limites de détection, comme il sera expliqué dans la section 1.5.4.1. Ainsi, nous avons voulu développer une méthode regroupant plusieurs avantages de l'ITC et permettant d'étudier l'insertion des détergents à basses concentrations.

1.5 Techniques employées

1.5.1 Caractérisation des phases

1.5.1.1 IR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une technique spectroscopique vibrationnelle. L'absorption d'une longueur d'onde infrarouge permet de provoquer des transitions entre les différents niveaux vibrationnels d'un même état électronique. Ces énergies vibrationnelles sont dues aux différents mouvements qui sont accessibles à chaque liaison chimique. Ces mouvements ou modes de vibration sont l'élongation (stretching), la déformation (bending), le balancement (rocking), l'agitation (wagging), la torsion (twisting) etc. Chaque liaison peut adopter un ou plusieurs de ces modes de vibration. Ainsi, une même liaison peut donner lieu à plusieurs bandes de vibration dans le spectre infrarouge (IR). De plus, chaque mode de vibration génère des énergies situées dans des régions spectrales infrarouges différentes. D'autre part, ces énergies de vibration dépendent de la nature des atomes formant la liaison. Enfin, ces énergies de vibration dépendent aussi de l'environnement immédiat des liaisons chimiques (présence d'insaturations, liaisons hydrogène, atomes environnants, etc). En résumé, chaque liaison d'une molécule possède une ou plusieurs signatures IR spécifiques, dépendamment du mode de vibration accessible et dépendamment de son environnement immédiat. Pour un phospholipide, il est donc possible de différencier et d'étudier chaque partie de la molécule à savoir la chaîne alkyl ou acyl saturée ou insaturée avec ses liaisons C-H ou la tête polaire avec ses liaisons C=O, COO, les groupements phosphatés et azotés, etc.^{106,107}

Comme il a été mentionné, les énergies de vibration d'une liaison dépendent de l'environnement immédiat de la liaison. Ainsi, la spectroscopie IR permet d'étudier les changements de structure dans les systèmes membranaires. Parce que les phases gel, L_o et L_d diffèrent notamment par l'ordre des chaînes, cet ordre devrait se refléter dans les fréquences de vibration des groupements CH_2 . Ces groupements sont représentés par les bandes les plus intenses dans le spectre IR, notamment les régions vers 2920 et 2850 cm^{-1} qui sont assignées aux modes d'élongation antisymétrique ($\nu_{as,C-H}$) et symétrique des liaisons C-H ($\nu_{s,C-H}$) respectivement.^{106,108} Lors de ce projet, la caractérisation des phases adoptées par les systèmes étudiés a été réalisée selon les bandes d'élongation $\nu_{s,C-H}$ vibrant autour de 2850 cm^{-1} car en général, moins de modes de vibration participent à cette bande et donc la bande à 2850 cm^{-1} est moins perturbée par ces autres modes de vibration.¹⁰⁷ D'autre part, la bande d'eau se situe aux alentours de $2900\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$. Par conséquent, la bande à 2920 cm^{-1} se situe plus dans le flanc de la bande d'eau comparée à la bande à 2850 cm^{-1} . Ainsi, les corrections de ligne de base apportées sont moins importantes pour la bande à 2850 cm^{-1} que pour la bande à 2920 cm^{-1} .

Il a été montré empiriquement que la position de cette bande est sensible aux conformations *trans*-gauche et permet donc de différencier les différents types de phase lamellaires. D'autre part, en faisant varier la température, il est aussi possible de déterminer la T_m d'une membrane. En règle générale, les liaisons C-H dans la phase gel vibrent en-dessous de 2850 cm^{-1} ^{45,106} alors qu'elles vibrent au-delà de 2853 cm^{-1} ^{45,106,109} dans la phase L_d . L'insertion de Chol dans la membrane donne naissance à la phase L_o . Comme le Chol a pour effet de mener à un ordre intermédiaire aux phases gel et L_d , alors les liaisons C-H en phase L_o vibrent à des fréquences qui se situent en général autour de $2851\text{-}2852\text{ cm}^{-1}$.^{9,109} Les phases solides ne permettant pas un grand degré de liberté de mouvement, les fréquences associées sont en général égales ou inférieures à 2849 cm^{-1} .^{9,106,110} Les systèmes en phase micellaire montrent des fréquences de vibration vers et au-delà de 2853 cm^{-1} , dû à leur plus grande liberté de mouvement.^{9,110} Il faut ajouter que les fréquences observées dans ces phases dépendent aussi de la longueur de la chaîne.¹⁰⁷ Ainsi, il a été remarqué que pour les phospholipides possédant deux chaînes identiques, dans la phase gel, les fréquences de vibration des chaînes ont tendance à

diminuer quand la longueur de la chaîne augmente. Alors que dans la phase L_d , les fréquences de vibration ont tendance à augmenter. Cette remarque ne peut pas être extrapolée à tous les types de lipides.

1.5.1.2 RMN ^2H

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est un outil qui permet d'étudier un grand nombre de propriétés. L'avantage apporté par la RMN ^2H à l'état solide est de pouvoir caractériser les systèmes membranaires qui se trouvent sous diverses phases, du solide au liquide isotrope. La résonance nucléaire est sensible à différentes interactions : les anisotropies de déplacement chimiques, les interactions dipolaires et les interactions quadripolaires. Étant donné que le noyau ^2H possède un spin nucléaire (I) de 1, il subit les interactions quadripolaires. Par rapport aux autres, ces interactions sont fortes et dominent l'allure du spectre. Comme on le verra, elles sont sensibles à l'orientation des liens C- ^2H par rapport au champ magnétique et à la dynamique de ces liens. La RMN ^2H solide est donc efficace dans l'étude structurale et dynamique des membranes modèles et biologiques.^{111,112}

Prenons le cas d'un ^2H placé dans un champ magnétique H_0 . L'effet Zeeman, dû aux interactions entre le champ magnétique H_0 et le spin nucléaire, mène à la levée de la dégénérescence des niveaux d'énergies décrits par les nombres quantiques de spin m_I . Dans le cas du ^2H , les nombres quantiques de spin sont $m_I = -1 ; 0 ; +1$. Comme la règle de sélection pour les transitions est $\Delta m_I = \pm 1$, il y a deux transitions : de -1 à 0 et de 0 à 1.

L'énergie impliquée dans ces transitions est différente à cause des interactions quadripolaires et, en conséquence, deux raies sont observées pour un noyau. L'éclatement quadripolaire $\Delta\nu_Q$ est l'écart d'énergie entre ces transitions et est donné par :

$$\Delta\nu_Q = h\nu_{0 \rightarrow +1} - h\nu_{-1 \rightarrow 0} = \frac{3}{2} \frac{e^2 q Q}{h} \frac{3\cos^2\chi - 1}{2} = \frac{3}{2} A_Q \frac{3\cos^2\chi - 1}{2} \quad \text{Équation 1.1}$$

où e est la charge élémentaire, Q est le moment quadripolaire scalaire (pour le ^2H , il est égal à $2.875 \times 10^{-27} \text{ cm}^2$), h étant la constante de Planck, χ est l'angle entre H_0 le lien C-D

et A_Q est la constante de couplage quadripolaire statique. Quelques valeurs de cette constante sont données dans la revue de Seelig.¹¹² L'éclatement quadripolaire dépend donc de l'orientation du lien C-D par rapport au champ magnétique H_0 .

Lorsque les molécules sont dans une phase solide, elles sont pratiquement immobiles. Ainsi, chaque orientation des liens C-D par rapport au champ H_0 (angle χ_i) donne lieu à un doublet dont le $\Delta\nu_{Qi}$ est donné par χ_i .

$$\Delta\nu_{Qi} = \frac{3}{2}A_Q \left(\frac{3\cos^2\chi_i - 1}{2} \right) \quad \text{Équation 1.2}$$

Pour $\chi_i = 0^\circ$, $\Delta\nu_{Qi}$ est maximum et est égal à $\frac{3}{2}A_Q$. Pour $\chi_i = 54.7^\circ$, $\Delta\nu_{Qi}$ est nul (c'est donc un singulet). Pour $\chi_i = 90^\circ$, $\Delta\nu_{Qi}$ est égal à $-\frac{3}{4}A_Q$. Pour une distribution aléatoire de molécules dans un solide, la probabilité qu'un lien C-D soit parallèle au champ magnétique H_0 est faible et donc l'intensité du doublet associé est faible. La probabilité que les liens C-D soient perpendiculaires au champ magnétique est maximale et donc, l'intensité du signal associé à cette orientation est aussi maximale. Le spectre résultant est la superposition de tous ces doublets possibles (spectre de poudre, fig. 1.8A). Notons cependant qu'en pratique, le signe de $\Delta\nu_Q$ ne peut pas être déterminé et seules sont considérées les valeurs absolues.

Lorsque les molécules se situent dans une bicouche fluide, elles subissent un mouvement de symétrie axiale (par exemple, celui associé à la rotation le long de leur axe long, correspondant approximativement à la perpendiculaire à la surface de la bicouche). Dans ce cas, on peut décomposer l'angle χ_i décrivant les mouvements des liens C-D par rapport à H_0 . Il faut donc définir des axes de symétrie des mouvements (fig. 1.8B). L'axe long de la molécule (\hat{a}) est un axe de rotation probant en phase fluide. Les liens C-D forment avec cet axe un angle Φ_j . Cet angle est associé au terme appelé le paramètre d'ordre orientationnel, S_{C-D} , décrivant les fluctuations intramoléculaires des liens C-D par rapport à l'axe de rotation moléculaire. Dans un système lamellaire, l'axe \hat{a} peut fluctuer par rapport à la normale de la bicouche (\hat{r}). Cette fluctuation est décrite par l'angle α . Ce

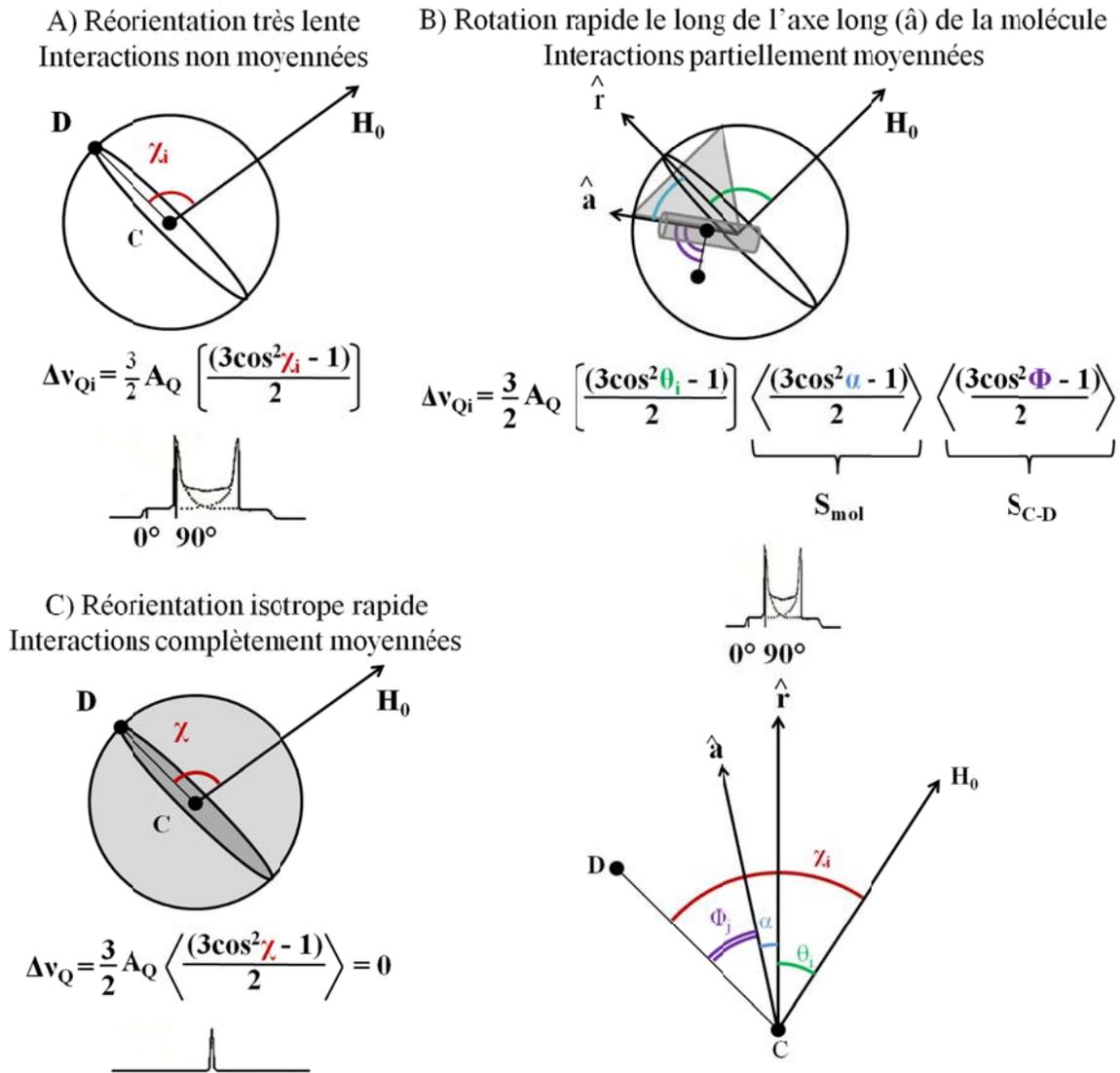


Figure 1.8 : Schéma décrivant l'allure des spectres RMN ^2H . A) Cas des phases solides où L'orientation des liens C-D suit une distribution aléatoire et les réorientations des liens C-D sont lentes. La valeur maximum observée pour $\Delta\nu_{Qi}$ est égale à $\frac{3}{2} A_Q$. B) Cas des bicouches. Lien C-D (●—●). L'angle χ_i est décomposé en 3 angles : θ_i , α et Φ_j . Comme les fluctuations associées aux angles α et Φ sont rapides, les interactions quadrupolaires sont partiellement moyennées. Le spectre résultant est de symétrie axiale. C) Cas d'un système où les réorientations du lien C-D sont isotropes et rapides.

mouvement donne lieu au paramètre d'ordre moléculaire S_{mol} qui représente les fluctuations de la molécule entière par rapport à la normale de la bicouche. Enfin, la normale de la bicouche fait un angle θ_i par rapport au champ magnétique H_0 . De ces mouvements, le mouvement du lien C-D par rapport à l'axe moléculaire (\hat{a}) et les fluctuations de la molécule autour de l'axe \hat{r} sont rapides par rapport à l'échelle des temps RMN (environ 10^{-5} s) : les interactions sont donc partiellement moyennées dans le temps par ces mouvements. L'éclatement quadripolaire $\Delta\nu_{Qi}$ prend donc la forme :

$$\Delta\nu_{Qi} = \frac{3}{2}A_Q \left(\frac{3\cos^2\theta_i - 1}{2} \right) \left\langle \frac{3\cos^2\alpha - 1}{2} \right\rangle \left\langle \frac{3\cos^2\Phi - 1}{2} \right\rangle = \frac{3}{2}A_Q \left(\frac{3\cos^2\theta_i - 1}{2} \right) S_{mol} S_{C-D} \quad \text{Équation 1.3}$$

Comme la distribution de l'axe \hat{r} par rapport à H_0 est sphérique, le spectre final résultant est un spectre de poudre de symétrie axiale.

Considérons maintenant que le lien C-D peut adopter, par rapport à l'échelle de temps RMN, toutes les orientations possibles. Dans ce cas, il faut considérer la moyenne dans le temps du terme $\langle 3\cos^2\chi - 1 \rangle$. Pour une réorientation isotrope, cette moyenne est nulle et le $\Delta\nu_Q$ résultant l'est aussi (éq. 1.4). Ainsi, le spectre résultant est constitué d'un pic fin. C'est le cas des solutions liquides et des suspensions micellaires (fig 1.8C).

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2}A_Q \left\langle \frac{3\cos^2\chi - 1}{2} \right\rangle = 0 \quad \text{Équation 1.4}$$

Le $\Delta\nu_Q$ contient des informations sur les termes S_{mol} et S_{C-D} . Pour obtenir ces paramètres, dans un premier temps, il convient d'identifier une orientation θ_i . Cette opération est simplifiée par le biais d'un algorithme mathématique conçu pour « de-Paké » le spectre brut afin d'obtenir le spectre caractéristique d'une certaine orientation.¹¹³ Il permet donc de simplifier le spectre et de définir plus aisément les $\Delta\nu_{Qi}$ et les intensités relatives de chaque doublet associé à chaque 2H pour un angle θ_i donné. Si les angles Φ_j sont connus (angle entre le lien C-D et l'axe de rotation moléculaire), le paramètre S_{mol} est directement accessible. Si les angles Φ_j ne sont pas connus, ils peuvent être déterminés par le rapport des $\Delta\nu_{Qi}$. En effet, les termes dépendant de θ_i et α étant identiques pour tous les 2H , le rapport des $\Delta\nu_{Qi}$ devient une contrainte à respecter afin de déterminer les angles Φ_j . Une fois ces angles obtenus, le paramètre S_{mol} devient accessible.

1.5.2 Calcul de la densité de surface

La densité de charge de surface provient des charges portées par toutes les molécules contenues dans une membrane cellulaire. L'impact de cette densité de charge peut être très varié.¹¹⁴ Par exemple, comme les liposomes ont une nature colloïdale, les charges portées par leur surface peuvent stabiliser ou favoriser l'agrégation de ces systèmes. Dans les années 1910, Gouy et Chapman proposent la théorie de la double-couche diffuse. Ce modèle simple a été utilisé dans la thèse afin de décrire l'influence de la densité de charge sur le pH interfacial des bicouches. Considérons une surface composée de molécules chargées. Ces charges produisent un champ électrique et attirent vers elles les contre-ions se trouvant dans la solution et repoussent les ions de charges identiques (fig. 1.9). L'ensemble de ces ions constituent l'atmosphère ionique et l'ensemble des charges sur la surface et des charges à proximité de cette surface (les contre-ions et co-ions) constitue la double-couche électrique. Dans le modèle de Gouy-Chapman, les interactions électrostatiques entre les charges portées en surface et les ions en solution sont contre-balançées par la tendance de la matière à diffuser des zones concentrées vers les zones moins concentrées. Ainsi, en l'absence d'autres types d'interactions, les contre-ions et co-ions restent libres en solution et forment une couche diffuse.

À l'équilibre, les ions en solutions sont répartis selon une distribution statistique de Boltzmann :

$$n^+(x) = n(\infty) \cdot \exp\left(\frac{-z e \varphi(x)}{kT}\right) \quad \text{Équation 1.5}$$

$$n^-(x) = n(\infty) \cdot \exp\left(\frac{z e \varphi(x)}{kT}\right) \quad \text{Équation 1.6}$$

où $n^\pm(x)$ est le nombre de charges (positives ou négatives) par unité de volume à une distance x de la surface, $n(\infty)$ est le nombre de charges par unité de volume dans le cœur de la solution, z est la valence, e est la charge élémentaire, k est la constante de Boltzmann et T est la température.

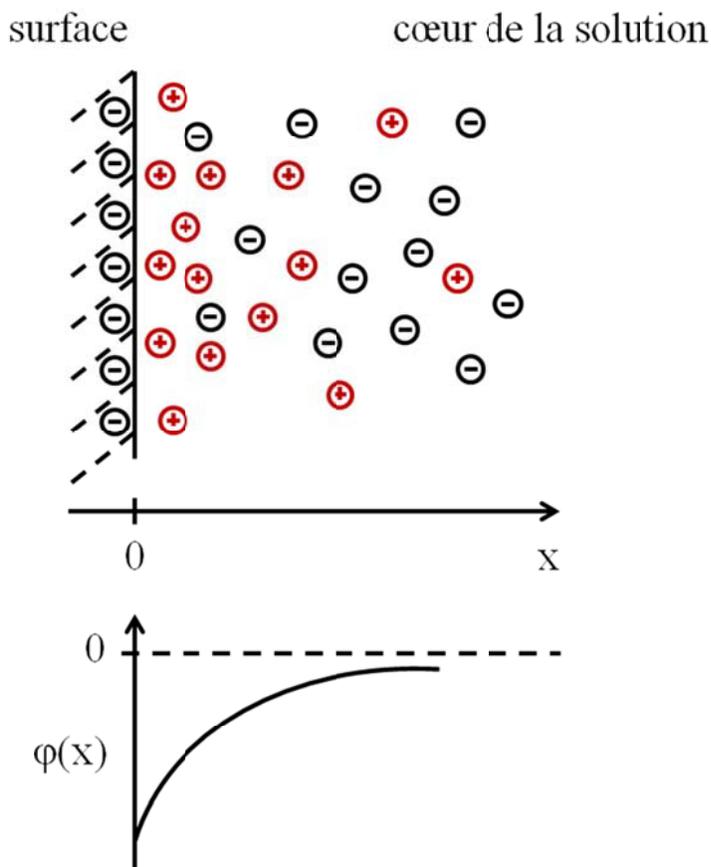


Figure 1.9 : Schéma de la double-couche diffuse prédite par la théorie de Gouy-Chapman (en haut). Allure du potentiel électrostatique $\varphi(x)$ associé à la densité de charge de surface en fonction de la distance à la surface (en bas). Dans ce schéma, la surface est chargée négativement. Les cations sont donc concentrés à proximité de la surface alors que les anions sont repoussés loin de cette surface. La surface étant négative, le potentiel associé est donc négatif par rapport au potentiel du cœur de la solution.

Comme le montre la figure 1.9, le potentiel électrostatique $\varphi(x)$ varie avec la distance à la membrane et est exprimé de manière relative au potentiel de cœur de phase. La distance à laquelle ce potentiel tombe à $\frac{1}{e}$ de sa valeur interfaciale est appelée la longueur de Debye. Les nombres de cations et anions à une distance x de la surface varient selon une distribution de Boltzmann. Si on considère un seul ion et qu'on se place à une distance $x = 0$ (à l'interface), ces deux équations peuvent être réécrites selon :

$$C_{int} = C_{bulk} \exp\left(\frac{-zF\varphi_0}{RT}\right) \quad \text{Équation 1.7}$$

où C_{int} est la concentration à l'interface d'un ion donné, C_{bulk} est sa concentration au cœur de la solution, z est sa charge, F est la constante de Faraday, φ_0 est le potentiel à la surface de la membrane et R est la constante des gaz parfaits.

La densité de charge à une distance x de la surface, $\rho(x)$, est donnée par :

$$\rho(x) = \sum z^+ \cdot e \cdot n^+(x) - \sum z^- \cdot e \cdot n^-(x) \quad \text{Équation 1.8}$$

L'électroneutralité de la solution implique que :

$$\sigma = - \int_0^{\infty} \rho(x) dx \quad \text{Équation 1.9}$$

où σ est la densité de charge à la surface de la membrane. Par conséquent, σ est relié au potentiel électrostatique à la surface de la membrane, φ_0 , selon :

$$\sigma = \left[2\varepsilon_r \varepsilon_0 kT \sum_i n_i(\infty) \left[\exp\left(\frac{-z_i e \varphi_0}{kT}\right) - 1 \right] \right]^{1/2} \quad \text{Équation 1.10}$$

où ε_r est la constante diélectrique de la solution et ε_0 est la permittivité du vide,

Ou encore :

$$\sigma = \left[2000\varepsilon_r \varepsilon_0 RT \sum_i C_i(\infty) \left[\exp\left(\frac{-z_i F \varphi_0}{RT}\right) - 1 \right] \right]^{1/2} \quad \text{Équation 1.11}$$

où z est la charge de l'ion i .

La densité de charge de surface peut aussi être calculée à partir des charges portées par la surface selon :

$$\sigma = \frac{e \sum_i z_i x_i}{\sum_i A_i \cdot x_i} \quad \text{Équation 1.12}$$

où z_i est la charge de la molécule i , x_i est sa fraction molaire et A_i est la surface moléculaire occupée par cette molécule.

Ces équations impliquent que le pH à l'interface de la membrane chargée est différent de celui mesuré dans le cœur de la solution. Connaissant la composition moléculaire de la membrane et le pH dans le cœur de la solution, pH_{bulk} , il est possible de calculer le pH à l'interface, pH_{int} , ainsi que la densité de charge de surface, σ , par un processus itératif en combinant les équations 1.7, 1.11 et 1.12.

1.5.3 Détermination de la perméabilité

La perméabilité d'une formulation a été déterminée par fluorescence. La méthode employée tire avantage des propriétés d'extinction ou d'auto-extinction d'une sonde fluorescente. Lorsque la sonde est encapsulée dans certaines conditions, il est possible de faire la différence entre la sonde encapsulée (éteinte par un quencher ou auto-éteinte) et la sonde libre (fluorescente). Les suspensions liposomales sont donc diluées de manière à ce que la sonde, une fois libérée, fluoresce à son maximum. Deux sondes ont été utilisées dans ce projet : la 3,6-dihydroxy-2,3-bis[N,N'-di(carboxyméthyl)-aminométhyl]fluoran (calcéine) et l'acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique de disodium (ANTS). La calcéine possède la propriété de s'auto-éteindre à haute concentration (80-90 % d'extinction entre 20 et 100 mM).¹¹⁵ Le mécanisme d'auto-extinction de la calcéine est complexe et fait intervenir plusieurs mécanismes.^{116,117} À faible concentration, le spectre d'excitation de la calcéine montre un maximum à 490 nm. Lorsque la concentration en calcéine est suffisamment élevée, la calcéine dimérise. Le dimère résultant est non-fluorescent, ce qui entraîne l'auto-extinction d'une grande partie de la fluorescence de la calcéine. Parallèlement à la dimérisation, une partie de l'auto-extinction est due à un transfert

d'énergie du monomère vers le dimère non-fluorescent. Enfin, une autre partie de l'auto-extinction de la calcéine est due à des collisions entre les formes monomères de la calcéine.^{116,117} La calcéine présente aussi l'avantage de voir sa fluorescence à peu près constante dans une gamme de pH allant de 5.5 à 9.¹¹⁵ Elle permet donc d'étudier la perméabilité des systèmes en fonction du pH. Cependant, pour étudier la perméabilité de systèmes à des pH plus bas que 5.5, il est nécessaire d'utiliser une sonde insensible dans cette région.

En plus de présenter cet avantage, la fluorescence de l'ANTS peut être éteinte en présence de bromure de p-xylène-bis-pyridinium (DPX).¹¹⁸ À priori, le mécanisme d'extinction de fluorescence de l'ANTS par le DPX n'est pas clairement identifié. Ellens *et al.* ont conclu à un transfert d'énergie non radiatif classique.¹¹⁹ Cependant, comme la durée de vie de fluorescence de l'ANTS change très peu en ajoutant le DPX, Ladokhin *et al.* ont conclu à la formation d'un complexe non-fluorescent.¹²⁰ La figure 1.10 montre les structures chimiques des sondes utilisées.

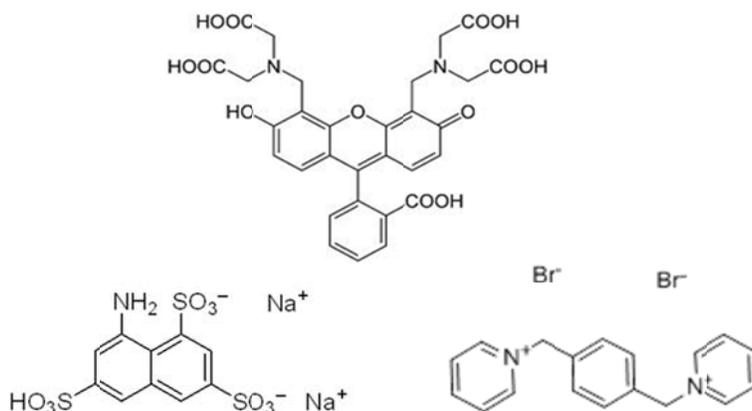


Figure 1.10 : Structure chimique des sondes fluorescentes. En haut, la calcéine. En bas, l'ANTS à gauche et le DPX à droite.

Le principe est le suivant : par extrusion, la sonde est encapsulée dans les liposomes dans des conditions menant à l'extinction de sa fluorescence. La sonde libre est séparée de la sonde encapsulée par chromatographie d'exclusion. Le signal de fluorescence enregistré

alors est associé à la fluorescence résiduelle de la sonde encapsulée (I_b obtenue au temps $t = 0$). Lorsque la sonde est libérée du liposome (par libération passive ou par libération induite), l'intensité de fluorescence augmente due à la dilution de la sonde dans la solution (I_F). À la fin de l'expérience, l'ajout de polyéthylène glycol p-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)-phényl éther (Triton X-100) permet de briser toutes les vésicules et provoque la libération complète de la sonde dans la solution. La fluorescence est alors maximale (I_T obtenue au temps $t = 0$). La différence ($I_T - I_b$) donne l'intensité de fluorescence maximale que l'on puisse obtenir et représente donc 100 % de relargage (soit 0 % d'encapsulation). La différence ($I_F - I_b$) donne l'intensité de fluorescence due à la sonde libérée. Les pourcentages de sonde libérée et encapsulée sont calculés respectivement selon :

$$\% \text{ relargage} = \frac{I_F - I_b}{I_T - I_b} \times 100 \text{ et } \% \text{ encapsulation} = \frac{I_T - I_F}{I_T - I_b} \times 100 \quad \text{Équation 1.13}$$

Cette équation est équivalente à l'équation 2.1.

Pour les cinétiques à longs termes, les conditions expérimentales ayant changées (par exemple, la puissance de la source varie ou si une libération s'est produite), la valeur de I_b n'est pas accessible, seul I_T est accessible. Cependant, en tout temps, le rapport $\frac{I_b}{I_T}$ doit rester identique. Ainsi, connaissant les valeurs de I_b et I_T obtenues au tout début de l'expérience (à $t = 0$, donnant I_{b0} et I_{T0}) et connaissant le nouveau I_T (au temps t), la valeur de I_b est déterminée par extrapolation de ces valeurs. Le pourcentage de relargage devient :

$$\% \text{ relargage} = 100 - \% \text{ encapsulation} = 100 - \frac{(I_T - I_F) / I_T}{(I_{T0} - I_{b0}) / I_{T0}} \times 100 \quad \text{Équation 1.14}$$

Cette équation est l'équation 3.5.

Dans le cas où une variation de pH est appliquée, chacun des termes I_{b0} , I_F , I_T et I_{T0} sont mesurés au pH imposé. Ces termes prennent respectivement la forme I_{b0}^{pH} , I_F^{pH} , I_T^{pH} et I_{T0}^{pH} et l'équation 1.14 devient :

$$\% \text{ relargage} = 100 - \frac{(I_T^{pH} - I_F^{pH}) / I_T^{pH}}{(I_{T0}^{pH} - I_{b0}^{pH}) / I_{T0}^{pH}} \times 100 \quad \text{Équation 1.15}$$

Cette équation est équivalente à l'équation 4.1. Elle est valable lorsqu'une libération lente est observée.

Dans le cas où une libération très rapide est observée (dans les premières secondes aux pH extrêmes), cette libération empêche la mesure de I_{b0}^{pH} de l'équation 1.15. Ainsi, le terme $(I_{T0}^{pH} - I_{b0}^{pH}) / I_{T0}^{pH}$ est remplacé par la moyenne des rapports obtenus aux pH où aucune libération n'est observée, à savoir $\overline{(I_{T0} - I_{b0}) / I_{T0}}$. Ainsi, l'équation devient :

$$\% \text{ relargage} = 100 - \frac{(I_T^{pH} - I_F^{pH}) / I_T^{pH}}{(I_{T0} - I_{b0}) / I_{T0}} \times 100 \quad \text{Équation 1.16}$$

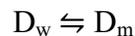
Cette équation est équivalente à l'équation 2.2.

1.5.4 Détermination des constantes d'affinité

1.5.4.1 ITC

L'ITC est une technique précise, sensible et connue pour étudier les interactions entre différentes molécules. Un avantage de cette méthode est qu'elle donne accès à la constante d'affinité K et aux paramètres thermodynamiques de la réaction. L'appareil ITC est constitué d'une cellule de référence (contenant en général de l'eau dégazée), d'une cellule où l'échantillon est placé et d'une seringue d'injection. Des détecteurs placés autour de chaque cellule détectent la quantité de chaleur absorbée ou libérée dans la cellule contenant l'échantillon lors de l'expérience. Comme l'expérience se déroule à pression constante, alors la chaleur détectée correspond à l'enthalpie mise en jeu. Au laboratoire, l'ITC permet de détecter des chaleurs de l'ordre du μcal .

Dans le cas où l'insertion d'un détergent dans une membrane est étudiée, il existe un équilibre de partage entre le détergent libre dans l'eau (et sous forme de monomères), D_w , et le détergent inséré dans la membrane, D_m . Cet équilibre peut être défini par :



La constante de partage K_w de cet équilibre est donnée par :

$$K_w = \frac{\frac{n_{d,m}}{n_{d,m} + n_L}}{\frac{n_{d,w}}{n_{d,w} + n_w}} = \frac{\frac{C_{d,m}}{C_{d,m} + C_L}}{\frac{C_{d,w}}{C_{d,w} + C_w}} \quad \text{Équation 1.17}$$

où $C_{d,m}$: concentration de détergent inséré dans la membrane ; $C_{d,w}$: concentration de détergent libre ; C_L : concentration de lipides ; C_w : concentration de l'eau soit 55 M. En considérant que $C_{d,w} \ll C_w$ et en réarrangeant l'équation 1.17, l'équation devient :

$$\frac{C_{d,m}}{C_{d,w}} = K \cdot (C_{d,m} + C_L) \quad \text{Équation 1.18}$$

Une expérience classique ITC consiste à injecter le ligand (dans notre cas, le détergent contenu dans la seringue) dans la cellule (dans notre cas, contenant les liposomes). Le détergent est injecté jusqu'à ce que les liposomes soient saturés en détergent. Les aires des premiers pics d'injection peuvent être égales si tout le détergent injecté se lie aux liposomes. Puis, au fur et à mesure des injections, moins de détergents se lient du fait de l'occupation de plusieurs sites par les détergents des injections précédentes. Ceci induit une diminution de la chaleur détectée h_i . Lorsque les liposomes sont saturés en détergents, l'aire des derniers pics d'injection reste constante et ces derniers pics correspondent à l'enthalpie de la dilution des liposomes saturés additionnée à l'enthalpie de la dilution du détergent injecté (dh_{dil}). La valeur de l'enthalpie de transfert (ΔH_m) peut donc se calculer à partir des premiers pics d'injection : c'est la chaleur détectée divisée par la quantité de ligand injectée. Une fois le ΔH_m déterminé, la quantité de détergent inséré à chaque injection i , $C_{d,m,i}$, est calculée à partir des chaleurs h_i détectées à chaque injection. Les données sont simulées et permettent d'obtenir la constante d'affinité K .

Dans le cas des interactions entre un détergent et une membrane modèle, l'insertion est en général contrôlée par le terme entropique. Ceci équivaut à dire que le terme enthalpique est faible comparé à l'entropie du transfert. La faible valeur de ΔH_m peut rendre les analyses difficiles. Le tableau 1.2 regroupe des valeurs d'enthalpies de transfert déterminées pour différents détergents sur des membranes de POPC entre 25 et 28 °C. À titre d'exemple et de comparaison, les tableaux 1.3 et 1.4 regroupent des valeurs

Tableau 1.2 : Valeurs d'enthalpies de transfert (ΔH_m) en $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ déterminées pour différents détergents sur des membranes de POPC et à des températures variant de 25 à 28 °C. Valeurs tirées des références 99,100,121.

Détergents	$\Delta H_m (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
C_nEO_m (n,m) = (10,3) ; (10,7) ; (12,3) ; (12,4) ; (12,5) ; (12,6) ; (12,7) ; (12,8)	8 ; 27 ; 6 ; 12 ; 16 ; 20 ; 20 ; 32
Triton X-100	15
Triton X-114	8
$C_n\text{Gluc}$ n = 8 ; 10	5.4 ; 4.9
$C_8\text{TGluc}$	4 à 8
$C_n\text{Malt}$ n = 8 ; 10 ; 12	10 ; 14 ; 4
SDS	-19.5
CPC	-9
DPC	-0.06
CTAC	-12

Alkyl éther d'oxyde d'éthylène (C_nEO_m) ; alkyl glucoside ($C_n\text{Gluc}$) ; octylthioglucoside ($C_8\text{TGluc}$) ; alkyl maltoside ($C_n\text{Malt}$) ; chlorure de dodécylpyridinium (DPC) ; chlorure de cétyltriméthylammonium (CTAC).

Tableau 1.3 : Valeurs d'enthalpies de transfert (ΔH_m) en $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ déterminées pour différents peptides sur des membranes de POPC et à une température de 25 °C. Valeurs tirées de la référence 122.

Peptide	$\Delta H_m (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
Octreotide	-28
Spantide	-35
Melittin	-54

Tableau 1.4 : Valeurs d'enthalpies de transfert (ΔH_m) en $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ déterminées pour différents médicaments sur des membranes de POPC et à une température de 25 °C. Valeurs tirées de la référence 122.

Médicaments	$\Delta H_m (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
Chlorpromazin	-26 à -39
Amlodipine	-38
Astemizol	-16
Cyclosporine	33

d'enthalpie de transfert déterminées pour différents peptides et médicaments, respectivement, pour des membranes de POPC à 27 °C. En règle générale, pour les détergents, les valeurs absolues des ΔH_m se situent entre 0.06 et 32 kJ · mol⁻¹, avec une moyenne à 12 ± 8 kJ · mol⁻¹.¹²¹ Pour les peptides, les valeurs absolues des ΔH_m varient de 28 à 54 kJ · mol⁻¹ avec une moyenne à 31 ± 10 kJ · mol⁻¹.¹²² Alors que pour les médicaments, les valeurs absolues des ΔH_m varient de 16 à 39 kJ · mol⁻¹ avec une moyenne à 30 ± 13 kJ · mol⁻¹.¹²²

Pour le titrage de détergents s'insérant dans une membrane lipidique, suivant l'approche classique, le détergent sous forme monomère (c'est-à-dire à faible concentration) est placé dans la seringue et les liposomes sont placés dans la cellule. Dans cette configuration, les signaux détectés sont très faibles dû à la faible quantité de ligand injecté et aux faibles valeurs des enthalpies de transfert. Une approche différente, celle adoptée dans le présent travail, consiste à placer le détergent dans la cellule (toujours sous forme monomère) et injecter les liposomes. Lors des premières injections, une quantité inconnue de détergent s'insère dans les liposomes. La chaleur détectée h_i varie donc dépendamment du nombre de détergent qui s'insère. Les injections sont répétées jusqu'à ce que tout le détergent contenu dans la cellule soit lié aux liposomes. Lors des dernières injections, les chaleurs détectées doivent être constantes et correspondent à la dilution des liposomes contenant le détergent. Dans ce cas, il n'est pas possible de déterminer le ΔH_m en se basant sur les premiers pics car la quantité de détergent inséré dépend de la constante de partage. Ainsi, les termes $C_{d,m}$ et $C_{d,w}$ de l'équation 1.18 sont calculés selon les équations 1.19 et 1.20 suivantes :

$$C_{d,m} = \frac{\sum h_i}{V_{tot,cell} \cdot \Delta H_m} \quad \text{Équation 1.19}$$

$$C_{d,w} = C_{CPC,cell} - C_{d,m} \quad \text{Équation 1.20}$$

où $\sum h_i$ est la chaleur totale dégagée, $V_{tot,cell}$ est le volume totale de la cellule et $C_{CPC,cell}$ est la concentration totale de CPC dans la cellule.

Dans cette configuration, la constante de partage et le ΔH_m sont des paramètres ajustables pour la simulation des données. Le ΔH_m peut être évalué en calculant la chaleur

totale dégagée $\sum h_i$ lors de l'expérience et en la divisant par la quantité totale de détergent contenu dans la cellule ($C_{CPC,cell}$). Comme contrôle, le ΔH_m simulé doit correspondre à celui estimé expérimentalement à partir de la chaleur totale. Dans le chapitre 5, les équations et la méthode de simulation sont décrites en détails.

1.5.4.2 SERS

L'histoire du SERS commence en 1974, avec sa découverte fortuite par Fleischmann *et al.* qui tentaient d'améliorer la sensibilité de leurs électrodes d'argent pour une solution de pyridine en augmentant la rugosité de leurs surfaces par des cycles d'oxydo-réduction.¹²³ En enregistrant l'intensité du signal Raman de la pyridine, les auteurs ont observé une exaltation anormale de l'intensité Raman. Depuis, nombreux sont les groupes de recherche qui étudient l'effet SERS et tentent de comprendre les causes théoriques responsables de ce phénomène. La littérature étant composée de plusieurs milliers d'articles, le lecteur se réfèrera à quelques revues pour de plus amples détails.¹²⁴⁻
¹²⁶ Le but de cette section est de citer les phénomènes principaux reconnus pour exalter le signal Raman.

Ces effets sont classés selon deux catégories, l'effet électromagnétique et l'effet chimique.^{124,125,127} Une manière simple d'expliquer ces phénomènes est de considérer l'intensité de la diffusion Raman classique. Une transition vibrationnelle est dite active si elle s'accompagne d'un changement du moment dipolaire (permanent ou induit), autrement dit si le moment dipolaire de transition est non nul. Le moment dipolaire induit P est donné par :

$$P = \alpha \cdot E \quad \text{Équation 1.21}$$

où P est le moment dipolaire induit, α est la polarisabilité de la molécule (propriété intrinsèque au système) et E est le champ électrique incident (propriété externe au système).

L'intensité d'absorption étant proportionnelle au carré du moment dipolaire de transition, pour augmenter le signal de diffusion Raman, il suffit donc d'augmenter l'un de ces deux

facteurs, α ou l'intensité du champ électrique E . Ainsi, l'effet électromagnétique regroupe tous les mécanismes menant à l'augmentation du champ électrique E et l'effet chimique regroupe les causes menant à l'augmentation de la polarisabilité α . En réalité, l'effet chimique regroupe toutes les causes ne rentrant pas dans le cadre de l'effet électromagnétique.

L'effet électromagnétique est un effet à longue distance.^{126,128} Plusieurs facteurs permettent de modifier le champ électromagnétique. D'abord, la géométrie de la surface joue un rôle important. Le champ électromagnétique excitateur (onde incidente) peut faire apparaître un moment dipolaire induit, par interaction avec les charges positives et négatives à la surface du métal. Comme ces charges se situent surtout dans les régions de fortes courbures, la rugosité de la surface est un facteur important car elle modifie le nombre de protubérances, interstices, arêtes, etc.^{124,129}

Un autre facteur influençant le champ électromagnétique est l'effet plasmon. Les plasmons de surface sont les modes propres de vibration des électrons situés à la surface du métal. Comme les particules métalliques possèdent une grande section efficace d'absorption et d'émission, elles jouent le rôle de récepteurs et émetteurs et produisent un champ électromagnétique plus intense.^{124,129}

L'effet chimique, aussi appelé « the first layer effect », est un effet à courte distance.^{126,128} Des évidences expérimentales obligent à prendre en compte un autre effet que l'effet électromagnétique relié au métal.^{124,126,127,129} Entre autre, une évidence vient de la sélectivité du SERS. En effet, les effets électromagnétiques sont des effets non-sélectifs et à longue distance et devraient s'appliquer sur toutes les molécules environnant le métal, comme par exemple les molécules de solvant. Pourtant, les molécules de solvant ne sont pas observées par SERS, ce qui impliquerait un effet d'exaltation à courte distance. D'autre part, les facteurs d'exaltation observés sont souvent supérieurs aux facteurs d'exaltation théoriquement calculés (en prenant en compte seulement l'effet

électromagnétique). Ainsi, il a été calculé que l'effet chimique induisait des facteurs d'exaltation de 10^{-10} contre 10^4 - 10^7 pour l'effet électromagnétique.¹²⁴

Deux facteurs principaux influencent l'effet chimique. Lorsqu'une molécule s'adsorbe sur une surface métallique, il peut y avoir un transfert de charge entre les deux protagonistes lorsque les niveaux d'énergie (HOMO et LUMO) de la molécule adsorbée se situent autour du niveau de Fermi du métal. La direction relative du transfert dépend de l'énergie relative de ces niveaux. Ce transfert de charge a été proposé à cause de l'apparition de bandes vibrationnelles dans les spectres SERS (les E-lines ou extralines) comparées aux spectres Raman classiques (N-bands ou Normal bands).¹²⁶

La chimisorption influence aussi l'exaltation du signal par effet chimique. Dans ce cadre, les molécules adsorbées peuvent se complexer au métal. Cette complexation mène à des modifications de l'intensité de certaines bandes de vibration lorsque les spectres SERS et Raman sont comparés. Elle peut aussi modifier les règles de sélection de la spectroscopie Raman (des bandes normalement interdites peuvent apparaître). La présence de contre-ions peut aussi modifier le facteur d'exaltation par la formation d'un complexe stable métal-contre-ion-adsorbat. Par exemple, les ions Br^- , I^- et Cl^- semblent augmenter le facteur d'exaltation.¹²⁹

En conclusion, il est difficile d'étudier les causes exactes menant à l'exaltation d'un signal Raman car les effets électromagnétiques et chimiques sont difficilement découplés. Néanmoins, certaines conditions sont requises pour observer un effet SERS, la plus importante étant le contact avec le métal. De plus, les molécules connues pour être de bons ligands engendrent une exaltation plus élevée : par exemple, les ligands possédant les éléments N et S se lient plus fortement aux molécules d'Ag et présentent une exaltation de leur signal plus intense que les ligands possédant l'élément O.¹³⁰

Au niveau des applications, parce que le SERS est une méthode sensible et sélective, il a été utilisé dans le cadre d'études sur les complexes ADN/médicaments anti-tumeurs,¹³¹ l'adsorption d'agent anti-cancéreux sur des membranes¹³² ou lors d'une étude sur l'organisation structurale d'une protéine dans une membrane.¹³³ Dans ce projet de

thèse, le SERS est utilisé pour étudier les interactions entre un détergent (CPC) et une membrane modèle (POPC). Le CPC est composé d'une tête polaire pyridinium qui possède des bandes de vibrations actives en Raman. Plus spécifiquement, la bande centrée à 1028 cm^{-1} peut être amplifiée en présence d'un colloïde d'argent.¹³⁴ L'hypothèse sur laquelle se base la méthode est que seul le CPC dans l'eau peut interagir avec le colloïde et voir son signal exalté. Ainsi, le CPC inclut dans la membrane ou dans une micelle ne participerait pas au signal SERS. Il serait donc possible de doser le détergent dans l'eau, $C_{d,w}$, et d'en déduire la quantité de détergent inséré dans la membrane, $C_{d,m}$. La quantité initiale de CPC en l'absence de POPC est donnée par l'intensité SERS I_0 . En ajoutant de la POPC dans cette solution, le CPC va s'insérer dans la membrane et la quantité de CPC restant dans l'eau est donnée par l'intensité SERS I . Ainsi, la quantité de CPC inséré dans la membrane est donnée par la différence entre I_0 et I . L'équation 1.18 devient :

$$\frac{C_{d,m}}{C_{d,w}} = \frac{I_0 - I}{I} = K_{SERS} \cdot (C_{d,m} + C_L) \quad \text{Équation 1.22}$$

1.6 Présentation des chapitres

Lors de ce projet de thèse, deux aspects des liposomes ont été étudiés. En tant que nanovecteurs, des liposomes riches en stérol ont été formulés et caractérisés. En tant que modèles de membranes cellulaires, nous avons tenté de développer une méthode pour déterminer la constante d'affinité d'un détergent pour une membrane.

Dans le chapitre 2, des liposomes sensibles au pH ont été formulés. La perméabilité de ces systèmes en fonction du temps et en fonction du pH a été étudiée par fluorescence et la taille des liposomes formés a été étudiée par diffusion de la lumière (QELS). Les différentes formulations sont composées de 30 % d'acides gras possédant différents pK_a et de 70 % de stérol. Dans cette étude, nous avons voulu contrôler la libération de la sonde

encapsulée par le pKa de l'acide gras. D'autre part, nous avons voulu identifier les phénomènes contrôlant cette libération.

Dans le chapitre 3, nous avons tenté de formuler des liposomes sensibles à la lumière. La formulation est composée de 30 % d'un dérivé d'azobenzène et de 70 % de Schol. Il est proposé que l'azobenzène s'isomérise sous l'effet de la lumière et que cette isomérisation conduit à des défauts dans les liposomes menant à la libération de l'agent encapsulé. Des expériences sur le comportement de libération du système ont été commencées. Les perméabilités passive et induite du système ont été étudiées par fluorescence. Ces expériences en sont à un stade préliminaire.

Dans le chapitre 4, nous avons voulu développer des liposomes contenant un amphiphile cationique. Les liposomes incorporant des groupements cationiques sont plus performants pour certaines applications. Ces liposomes sont composés de CPC et de stérol dans les proportions 30/70 (mol/mol). La spectroscopie IR et la RMN ^2H solide a permis d'étudier les phases formées par ces différentes formulations. Plus particulièrement, la RMN a permis d'étudier l'orientation des différentes molécules dans la membrane. La taille de ces liposomes a été étudiée par QELS et la perméabilité du système CPC/Schol en fonction du temps et en fonction du pH a été étudiée par fluorescence.

Dans le chapitre 5, nous avons voulu développer une méthode permettant de déterminer la constante d'affinité entre un détergent et une membrane modèle. Comme système d'essai, le détergent choisi est le CPC et la membrane modèle est celle formée par la POPC. La constante d'affinité entre le CPC et la membrane de POPC a été étudiée par ITC et les résultats ont été comparés à ceux déterminés par SERS.

Enfin, le chapitre 6 est la conclusion générale de ce projet de thèse.

1.7 Références

1. Denyer, S. P. *Int. Biodeterior.* **1990**, 26, 89.
2. Denyer, S. P. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **1995**, 36, 227.
3. Rózycka-Roszak, B.; Zylka, R.; Kral, T.; Przyczyna, A. *Z. Naturforsch.* **2001**, 56c, 407.
4. Ganta, S.; Devalapally, H.; Shahiwala, A.; Amiji, M. *J. Control. Release* **2008**, 126, 187.
5. Drummond, D. C.; Noble, C. O.; Hayes, M. E.; Park, J. W.; Kirpotin, D. B. *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 4696.
6. Tamilvanan, S.; Venkateshan, N.; Ludwig, A. *J. Control. Release* **2008**, 128, 2.
7. Drummond, D. C.; Zignani, M.; Leroux, J.-C. *Prog. Lipid Res.* **2000**, 39, 409.
8. Bastiat, G.; Oliger, P.; Karlsson, G.; Edwards, K.; Lafleur, M. *Langmuir* **2007**, 23, 7695.
9. Bastiat, G.; Lafleur, M. *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 10929.
10. Lonez, C.; Vandenbranden, M.; Ruyschaert, J.-M. *Prog. Lipid Res.* **2008**, 47, 340.
11. Bai, Y.; Louis, K. M.; Murphy, R. S. *J. Photoch. Photobio. A* **2007**, 192, 130.
12. Shimomura, M.; Kunitake, T. *Chem. Lett.* **1981**, 1001.
13. Morgan, C. J.; Bisby, R. H.; Johnson, S. A.; Mitchell, A. C. *FEBS Letters* **1995**, 375, 113.
14. Bisby, R. H.; Mead, C.; Morgan, C. G. *FEBS Letters* **1999**, 463, 165.
15. Liu, X.-M.; Yang, B.; Wang, Y.-L.; Wang, J.-Y. *Chem. Mater.* **2005**, 17, 2792.
16. Huang, S.-L. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, 1167.
17. Speiser, P.; Oppenheim, R. C.; Marty, J. J. *Pharm. Acta Helv.* **1978**, 53, 17.

18. Husseini, G. A.; Pitt, W. G. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1137.
19. Azarmi, S.; Roa, W. H.; Löbenberg, R. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 863.
20. Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polymer J.* **1985**, *17*, 117.
21. Newkome, G. R.; Nayak, A.; Behera, R. K.; Moorefield, C. N.; Baker, G. R. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 358.
22. Wang, P.; Moorefield, C. N.; Jeong, K.-U.; Hwang, S.-H.; Li, S.; Cheng, S. Z. D.; Newkome, G. R. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 1381.
23. Lasic, D. D., On the history of liposomes. In *Handbook of non-medical applications of liposomes*, Lasic, D. D.; Barenholz, Y., Eds. CRC Press: Boca Raton, **1996**; pp 1.
24. Bangham, A. D.; Horne, R. W. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 660.
25. Almeida, P. F. F.; Pokorny, A.; Hinderliter, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1720*, 1.
26. London, E. *Curr. Opin. Stuc. Biol.* **2002**, *12*, 480.
27. Przystalski, S.; Sarapuk, J.; Kleszczynska, H.; Gabrielska, J.; Hladyszowski, J.; Trela, Z.; Kuczera, J. *Acta Biochim. Pol.* **2000**, *47*, 627.
28. Taylor, T. M.; Davidson, P. M.; Bruce, B. D.; Weiss, J. *Crit. Rev. Food Sci.* **2005**, *45*, 587.
29. Lasic, D. D. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 307.
30. Peek, L. J.; Middaugh, C. R.; Berkland, C. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 915.
31. Cevc, G.; Blume, G.; Schätzlein, A.; Gebauer, D.; Paul, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, *18*, 349.
32. Hoffman, R. M. *J. Drug Target.* **1997**, *5*, 67.

33. Collings, P. J.; Hird, M., Lyotropic liquid crystals - anisotropic solutions. In *Introduction to liquid crystals chemistry and physics*, Gray, G. W., Goodby, J. W.; Fukuda, A., Eds. Taylor & Francis: London ; Bristol, PA, **1997**; pp 133.
34. Israelachvili, J., In *Intermolecular and surface forces, 2th edition*, Israelachvili, J., Ed. Academic Press inc.: London, **1991**.
35. Fairhurst, C. E.; Fuller, S.; Gray, J.; Holmes, M. C.; Tiddy, G. G. T., High molecular weight liquid crystals. In *Handbook of liquid crystals*, Demus, D., Goodby, J. W., Gray, G. W., Spiess, H.-W.; Vill, V., Eds. Wiley-VCH: Weinheim ; Toronto, **1998**; Vol. 3, pp 341.
36. Cistola, D. P.; Atkinson, D.; Hamilton, J. A.; Small, D. M. *Biochemistry* **1986**, *25*, 2804.
37. Varade, D.; Joshi, T.; Aswal, V. K.; Goyal, P. S.; Hassan, P. A.; Bahadur, P. *Colloid Surface A* **2005**, *259*, 95.
38. Simončič, B.; Špan, J. *Acta Chim. Slov.* **1998**, *45*, 143.
39. Muherei, M. A.; Junin, R. *J. Applied Sci.* **2007**, *7*, 1362.
40. Ud-din, K.; Al Ahmadi, M. D. A.; Naqvi, A. Z.; Akram, M. *Colloid J+* **2009**, *71*, 498.
41. Chung, J. J.; Lee, S. W.; Choi, J. H. *B. Kor. Chem. Soc.* **1991**, *12*, 411.
42. Cistola, D. P.; Hamilton, J. A.; Jackson, D.; Small, D. M. *Biochemistry* **1988**, *27*, 1881.
43. Almeida, P. F. F.; Vaz, W. L. C.; Thompson, T. E. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6739.
44. Ladbrooke, B. D.; Williams, R. M.; Chapman, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, *150*, 333.
45. Umemura, J.; Cameron, D. G.; Mantsch, H. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *602*, 32.

46. Ipsen, J. H.; Karlström, G.; Mouritsen, O. G.; Wennerström, H.; Zuckermann, M. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *905*, 162.
47. Bloom, M.; Evans, E.; Mouritsen, O. G. *Q. Rev. Biophys.* **1991**, *24*, 293.
48. Rog, T.; Pasenkiewicz-Gierula, M.; Vattulainen, I.; Karttunen, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 97.
49. Smondyrev, A. M.; Berkowitz, M. L. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1672.
50. Segota, S.; Tezak, D. *Adv. Colloid Interfac.* **2006**, *121*, 51.
51. Speiser, P. P. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **1991**, *13*, 337.
52. Hope, M. J.; Bally, M. B.; Mayer, L. D.; Janoff, A. S.; Cullis, P. R. *Chem. Phys. Lipids* **1986**, *40*, 89.
53. Szoka, F. C. J.; Papahadjopoulos, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 4194.
54. Hope, M. J.; Bally, M. B.; Webb, G.; Cullis, P. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *812*, 55.
55. Mally, M.; Majhenc, J.; Svetina, S.; Zeks, B. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 944.
56. Peterlin, P.; Arrigler, V. *Colloid Surface B* **2008**, *64*, 77.
57. Arrigler, V.; Kogej, K.; Majhenc, J.; Svetina, S. *Langmuir* **2005**, *21*, 7653.
58. Cohen, M. H.; Turnbull, D. *J. Chem. Phys.* **1959**, *31*, 1164.
59. Macedo, P. B.; Litovitz, T. A. *J. Chem. Phys.* **1964**, *42*, 245.
60. Johnston, M. J. W.; Semple, S. C.; Klimuk, S. K.; Ansell, S.; Maurer, N.; Cullis, P. R. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 1121.
61. Harris, J. M.; Martin, N. E.; Modi, M. *Clin. Pharmacokinet.* **2001**, *40*, 539.
62. Philippot, J. R.; Milhaud, P. G.; Puyal, C. O.; Wallach, D. F. H., Non-phospholipid molecules and modified phospholipid components of liposomes. In *Liposomes as Tools in Basic Research and Industry*, CRC Press ed.; Boca Raton, FL, **1995**; pp 41.

63. Handjani-Vila, R. M.; Ribier, A.; Vanlerberghe, G., Les niosomes. In *Les liposomes: applications thérapeutiques*, Puisieux, F.; Delattre, J., Eds. Technique et documentation (Lavoisier): Paris, France, **1985**; pp 297.
64. Florence, A. T., Nonionic surfactant vesicles: preparation and characterization. In *Liposome technology: liposome preparation and related techniques*, Gregoriadis, G., Ed. CRC Press: Boca Raton, FC, **1992**; Vol. 1, pp 157.
65. Lasic, D. D., *Liposomes : from Physics to Applications*. Elsevier: **1993**; p 9.
66. Mueller, A.; Bondurant, B.; O'Brien, D. F. *Macromolecules* **2000**, *33*, 4799.
67. Bondurant, B.; Mueller, A.; O'Brien, D. F. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1511*, 113.
68. Biswal, S.; Murthy, P. N.; Sahu, J.; Sahoo, P.; Amir, F. *Int. J. Pharm. Sci. and Nanotech.* **2008**, *1*, 1.
69. Wallach, D. F. H.; Philippot, J. R., New type of lipid vesicle: NovasomeTM. In *Liposome technology : liposome preparation and related techniques*, Gregoriadis, G., Ed. CRC Press: Boca Raton, FC, **1992**; Vol. 1, pp 141.
70. Christian, D. A.; Cai, S.; Bowen, D. M.; Kim, Y.; Pajerowski, D.; Discher, D. E. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71*, 463.
71. Lensen, D.; Vriezema, D. M.; van Hest, J. C. M. *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 991.
72. Discher, D. E.; Ortiz, V.; Srinivas, G.; Klein, M. L.; Kim, Y.; Christian, D.; Cai, S.; Photos, P.; Ahmed, F. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 838.
73. Letchford, K.; Burt, H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *65*, 259.
74. Discher, B. M.; Hammer, D. A.; Bates, F. S.; Discher, D. E. *Curr. Opin. Colloid In.* **2000**, *5*, 125.
75. Bach, D.; Wachtel, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1610*, 187.
76. Paré, C.; Lafleur, M. *Langmuir* **2001**, *17*, 5587.
77. Ouimet, J.; Croft, S.; Paré, C.; Katsaras, J.; Lafleur, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1089.
78. Ouimet, J.; Lafleur, M. *Langmuir* **2004**, *20*, 7474.

79. Ramakrishnan, M.; Tarafdar, P. K.; Kamlekar, R. K.; Swamy, M. J. *Curr. Sci. India* **2007**, *93*, 234.
80. Gater, D. L.; Seddon, J. M.; Law, R. V. *Soft Matter* **2008**, *4*, 263.
81. Cui, Z.-K.; Bastiat, G.; Jin, C.; Keyvanloo, A.; Lafleur, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 1144.
82. Sparr, E.; Ekelund, K.; Engblom, J.; Engström, S.; Wennerström, H. *Langmuir* **1999**, *15*, 6950.
83. Slotte, J. P. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1238*, 118.
84. McMullen, T. P. W.; Lewis, R. N. A. H.; McElhaney, R. N. *Biochemistry* **1993**, *32*, 516.
85. McMullen, T. P. W.; Lewis, R. N. A. H.; McElhaney, R. N. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1416*, 119.
86. Silvius, J. R.; del Giudice, D.; Lafleur, M. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15198.
87. Davidson, S. M. K.; Liu, Y.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10104.
88. Sugahara, M.; Uragami, M.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13040.
89. Sugahara, M.; Uragami, M.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4253.
90. Cui, Z.-K.; Bastiat, G.; Lafleur, M. *Langmuir* **2010**, *26*, 12733.
91. Bisby, R. H.; Mead, C.; Morgan, C. G. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *72*, 57.
92. Diau, E. W.-G. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 950.
93. Bandara, H. M. D.; Friss, T. R.; Enriquez, M. M.; Isley, W.; Incarvito, C.; Frank, H. A.; Jose, G.; Burdette, S. C. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4817.
94. Wang, A.; Li, Y.-Y.; Ru, J. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1463.
95. Shimomura, M.; Kunitake, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5175.
96. Xie, S.; Natansohn, A. L.; Rochon, P. L. *Chem. Mater.* **1993**, *5*, 403.
97. Barrett, C. J.; Rochon, P. L.; Natansohn, A. L. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 1505.

98. Harrison, J. J.; Turner, R. J.; Joo, D. A.; Stan, M. A.; Chan, C. S.; Allan, N. D.; Vrionis, H. A.; Olson, M. E.; Ceri, H. *Antimicrob. Agents Ch.* **2008**, *52*, 2870.
99. Marcotte, L.; Barbeau, J.; Edwards, K.; Karlsson, G.; Lafleur, M. *Colloid Surface A* **2005**, *266*, 51.
100. Marcotte, L.; Barbeau, J.; Lafleur, M. *J. Colloid Interf. Sci.* **2005**, *292*, 219.
101. Kragh-Hansen, U.; le Maire, M.; Møller, J. V. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 2932.
102. le Maire, M.; Møller, J. V.; Champeil, P. *Biochemistry* **1987**, *26*, 4803.
103. Tsao, H.-K.; Tseng, W. L. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 8125.
104. Kadi, M.; Hansson, P.; Almgren, M. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 7344.
105. Heerklotz, H.; Binder, H.; Lantzsch, G.; Klose, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1196*, 114.
106. Casal, H. L.; Mantsch, H. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *779*, 381.
107. Mantsch, H. H.; Mcelhaney, R. N. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *57*, 213.
108. Cameron, D. G.; Casal, H. L.; Gudgin, E. F.; Mantsch, H. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *596*, 463.
109. Kodati, R. V.; Lafleur, M. *Biophys. J.* **1993**, *64*, 163.
110. Wong, T. C.; Wong, N. B.; Tanner, P. A. *J. Colloid Interf. Sci.* **1997**, *186*, 325.
111. Dufourc, E. J.; Smith, I. C. P.; Jarrell, H. C. *Chem. Phys. Lipids* **1983**, *33*, 153.
112. Seelig, J. *Q. Rev. Biophys.* **1977**, *10*, 353.
113. Sternin, E.; Bloom, M.; MacKay, A. L. *J. Magn. Reson.* **1983**, *55*, 274.
114. McLaughlin, S. *Curr. Top. Membr. Trans.* **1977**, *9*, 71.
115. Allen, T. M., Calcein as a tool in liposome methodology. In *Liposome technology*, Gregoriadis, G., Ed. CRC Press: Boca Raton, FC, **1984**; pp 177.
116. Magzoub, M.; Zhang, H.; Dix, J. A.; Verkman, A. S. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 2382.
117. Chen, R. F.; Knutson, J. R. *Anal. Biochem.* **1988**, *172*, 61.

118. Smolarsky, M.; Teitelbaum, D.; Sela, M.; Gitler, C. *J. Immunol. Methods* **1977**, *15*, 255.
119. Ellens, H.; Bentz, J.; Szoka, F. C. *Biochemistry* **1984**, *23*, 1532.
120. Ladokhin, A. S.; Wimley, W. C.; White, S. H. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1964.
121. Heerklotz, H. *Q. Rev. Biophys.* **2008**, *41*, 205.
122. Seelig, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1331*, 103.
123. Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26*, 163.
124. Champion, A.; Kambhampati, P. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 241.
125. Moskovits, M. *Rev. Mod. Phys.* **1985**, *57*, 783.
126. Otto, A.; Mrozek, I.; Grabhorn, H.; Akemann, W. *J. Phys. Condens. Matter* **1992**, *4*, 1143.
127. Xu, H.; Aizpurua, J.; Käll, M.; Apell, P. *Phys. Rev. E* **2000**, *62*, 4318.
128. Stöckle, R. M.; Suh, Y. D.; Deckert, V.; Zenobi, R. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *318*, 131.
129. Julien, C. Physics Ph. D. degree, Université Paris-Sud 11, Paris, **2004**.
130. Alvarez-Puebla, R. A.; Arceo, E.; Goulet, P. J. G.; Garrido, J. J.; Aroca, R. F. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 3787.
131. Breuzard, G.; Millot, J.-M.; Riou, J.-F.; Manfait, M. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4305.
132. Breuzard, G.; Angiboust, J.-F.; Jeannesson, P.; Manfait, M.; Millot, J.-M. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2004**, *320*, 615.
133. Abdulaev, N. G.; Nabiev, I. R.; Efremov, R. G.; Chumanov, G. D. *FEBS Letters* **1987**, *213*, 113.
134. Muniz-Miranda, M. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *340*, 437.

Chapitre 2

pH-triggered release from non-phospholipid LUVs modulated by the pK_a of the included fatty acid

Thida Phoeung, Pauline Aubron, Gauthier Rydzek, Michel Lafleur

Reproduced with permission from

Langmuir, **26** (15), 12769–12776, 2010

Copyright 2010 American Chemical Society

Keywords : pH-sensitive LUVs, controlled drug release, fatty acid, sterol, pK_a ,
deprotonation state

Abbreviated title : pH-sensitive liposomes

2.1 Abstract

It has been shown that mixtures of palmitic acid (PA) and cholesterol (Chol) or cholesterol sulfate (Schol) can form fluid bilayers. These bilayers could be extruded using standard extrusion techniques to obtain non-phospholipid Large Unilamellar Vesicles (LUVs). These LUVs displayed a very limited passive permeability, associated with their high sterol content (typically 70 (mol) %). In addition, they showed a pH-dependent behaviour dictated by the electrostatic interfacial interactions, which are drastically modulated by the protonation state of PA. Interestingly, the LUVs prepared with cholesterol were stable at high pH and the release of the content could be triggered by a pH decrease (i.e. the protonation of PA). In contrast, the LUVs including Schol were stable at low pH and a pH increase (leading to the deprotonation of PA) would induce the release. In the present study, we demonstrate that the pH triggering the release in these two systems can be dictated in a predictable manner by selecting a fatty acid with an appropriate pK_a . The pK_a of the fatty acids was modulated by the presence of an electro-withdrawing group (hydroxyl or fluoro) in the α position of the carboxylic function. The fatty acid protonation state is shown to be a critical factor for the modulation of the liposome permeability. The described systems display a remarkable versatility regarding the pH-sensitivity because the nature of the sterol controls the overall pH stability of the LUVs while the fatty acid pK_a fine tunes the pH-induced release. Therefore it is possible to rationally design LUVs with controlled release at a specific pH; this original aspect is beneficial to the use of LUVs for encapsulation, vectorisation and controlled release of active agents.

2.2 Introduction

pH-sensitive LUVs have attracted considerable interest in recent years for their potential in many areas including the pharmaceutical industry. For example, they can be used to release encapsulated hydrophilic molecules at specific location in cells or organisms where a distinct local pH prevails.¹ pH-sensitive formulations becoming unstable at lower pH have been examined in strategies to specifically deliver drugs in the tumour acidic environment, leading to an effective delivery of the therapeutic compound.² Similarly, the low pH of the endosomes has been used to trigger the release of the liposome content (drugs, DNA, etc...) into the cytoplasm before being delivered to lysosomes where active agents could be degraded.¹

pH-sensitive LUVs have been obtained using different strategies involving pH-sensitive chemical species. One approach is to associate to LUVs, molecules whose physical or chemical properties are influenced by the protonation state of some functional groups. The stability of the LUVs can be modulated by the protonation state of inserted or associated amphiphiles (fatty acids, sterol derivatives, phospholipids, glycerolipids, double chain amphiphiles, etc),^{1,3-5} peptides^{6,7} or polymers.^{1,8} Similarly, systems based on reconstituted membranes of viruses that are sensitive to pH, referred to virosomes, have been proposed as pH-sensitive nanocarriers.⁹ An alternative approach is to introduce in the LUVs molecules that are chemically pH sensitive. For example, the decrease of pH causes the hydrolysis or cleavage of functional groups of phospholipid derivatives; the products act as destabilizing agents and lead to more permeable LUVs.¹

Recently, it was shown that it is possible to form non-phospholipid LUVs with mixtures of sterol, and palmitic acid (PA).^{10,11} These nanovector formulations display an entrapment capacity comparable to classical phospholipid vesicles but a drastically improved retention time of the encapsulated materials, a property associated with their high sterol content (~70 (mol) %). These LUVs also showed a pH-sensitivity associated with the protonation-deprotonation state of palmitic acid.^{10,11} In this system, the apparent pK_a of the palmitic acid, inserted in fluid bilayers, was estimated to be between 7.1 and 6.4.¹¹

Interestingly, mixtures prepared with cholesterol (Chol) and cholesterol sulfate (Schol) have opposite behaviour. In the presence of cholesterol, the LUVs are stable when a significant fraction of the palmitic acid is deprotonated. A decrease of pH, leading to the protonation of the palmitic acid, leads to the destabilization of the bilayers and triggers the release of the LUV content. Conversely, in the presence of cholesterol sulfate, the LUVs are stable when the palmitic acid is mainly under the protonated form and the release is triggered by a pH increase leading to the deprotonation of the palmitic acid head group. These behaviours have been associated with the variations of the electrostatic intermolecular interactions that modulate the mixing propensities of the fatty acid and the sterol and, consequently, the LUV stability.¹⁰

The possibility to form LUVs based on parent formulations is examined in the present paper. We show here that it is possible to design pH-sensitive non-phospholipid LUVs for which the pH triggering the release can be fine tuned in a predictable manner by selecting saturated linear fatty acids with different apparent pK_a . An analogous approach has been shown to be successful for pH-sensitive LUVs prepared from phosphatidylethanolamine (70%) and fatty acids (30%).³ In that study, it was highlighted that the LUVs including α -hydroxyacids were destabilized at lower pH compared to those with the linear parent form without the OH substituent. The presence of an electro-withdrawing element (e.g. a fluorine atom or a hydroxyl group) at the α position of the carboxylic acid function decreases its pK_a by stabilizing the unprotonated form via inductive effects. This effect has been shown for short chain acid. For example, the pK_a of acetic acid is ~ 4.8 ^{12,13} whereas it is 3.8 and 2.6 for the α OH-acetic acid^{14,15} and α F-acetic acid¹³ respectively. A similar effect of these α -substituents is expected for palmitic acid analogues because the addition of methylene groups in the alkyl chain has a limited impact on the pK_a of fatty acids.¹⁶ The estimated pK_a values of the monomeric fatty acids used in this work and their chemical structure are reported in Fig. 2.1.

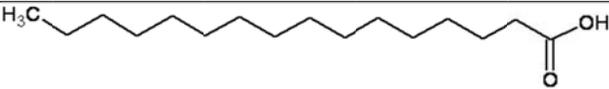
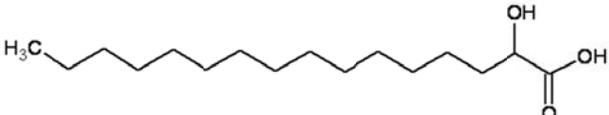
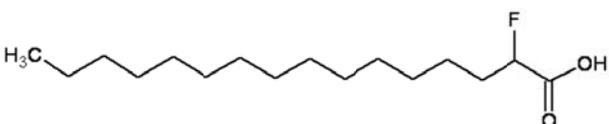
Name	Chemical Structure	pK _a
palmitic acid		4.8
2-hydroxypalmitic acid		3.8
2-fluoropalmitic acid		2.6

Figure 2.1: Chemical structure of PA derivatives and their monomeric form pK_a.

The potential to form LUVs with mixtures of sterol and these acids was examined. The permeability of the resulting LUVs and the influence of pH were also assessed. The variations of permeability as a function of pH were associated with changes in the mixing propensities of the compounds. From a formulation point of view, α -hydroxyacids present also a distinct advantage as they are generally recognized as safe and are commonly used as active dermatological drugs and cosmetic ingredients.¹⁷

2.3 Materials and Methods

Palmitic acid (PA, approximately 99%), 2-hydroxypalmitic acid (α OH-PA, 98%), cholesterol (> 99%), Schol, tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) (> 99.8%) and Triton X-100 (99%) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). 2-fluoropalmitic acid (α F-PA) was purchased from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 99%) was obtained from Aldrich (St. Louis, MO). Calcein, 8-aminonaphtalene-1,3,6-trisulfonic acid, disodium salt (ANTS), p-xylene-bis-pyridinium bromide (DPX) were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid (MES, > 99%) and NaCl (> 99%)

were obtained from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ) and Anachemia (Montréal, QC, Canada), respectively.

Sample preparation

Weighed quantities of lipids were solvated in a mixture of benzene/methanol 95/5 (v/v) for systems with cholesterol and 75/25 (v/v) for systems with Schol. The solutions were then frozen in liquid nitrogen and lyophilized for at least 16 h to allow complete sublimation of the organic solvent. The fatty acid/total sterol molar ratio of the mixtures was 0.3/0.7. For the PA/Chol_{0.25}/Schol_{0.75} system, the molar fraction of Schol relative to total sterol was 0.75. A stock liposome dispersion was prepared by hydrating the solid lipids in an MES/TRIS buffer (referred to as the internal buffer), subjecting these suspensions to five freeze-and-thaw cycles (from liquid nitrogen temperature to ~70 °C) and vortexing between the cycles. For cholesterol-containing systems, the passive permeability of the LUVs was measured using a fluorescence procedure, based on the leakage of co-encapsulated ANTS/DPX.⁵ In these experiments, the internal buffer contained 50 mM TRIS, 50 mM MES, 5 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 50 mM ANTS and 50 mM DPX, pH 7.4. For systems with Schol and those including mixtures of cholesterol and Schol, the permeability was measured using the self-quenching property of calcein at high concentration.^{18,19} The internal buffer contained 50 mM TRIS, 50 mM MES, 5 mM NaCl, 0.5 mM EDTA and 80 mM calcein, pH 5.5. The fatty acid concentration in these suspensions was approximately 20 mM. In order to form large unilamellar vesicles (LUVs), the dispersions were extruded 10 times through two stacked polycarbonate filters with a 200-nm and then 100-nm pore size, using a handheld Liposofast extruder (Avestin Corp., Ottawa, ON, Canada). The extrusions were carried out between 55 and 80 °C for all the systems except for the α F-PA/Chol and PA/Chol_{0.25}/Schol_{0.75} systems that could be extruded at room temperature. Probe-containing LUVs were isolated at room temperature from the free probes by gel exclusion chromatography using a column (column diameter, 1.5 cm; length 25 cm) filled with Sephadex G-50 medium (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) equilibrated with an isosmotic MES/TRIS buffer. For systems with cholesterol, this external buffer was composed of 50 mM MES, 50 mM TRIS, 0.5 mM EDTA, 140 mM

NaCl, pH 7.4 while it contained 50 mM MES, 50 mM TRIS, 0.5 mM EDTA, 115 mM NaCl at pH 5.5 for systems with Schol and those including mixtures of Chol and Schol. The low NaCl concentration of the internal buffer is required to counterbalance the osmotic contribution of the encapsulated concentrated fluorophore/quencher (calcein or ANTS/DPX). It has been shown that the presence of an osmotic gradient across bilayers can destabilize LUVs and can lead to artefactual leakage.²⁰ Because the osmotic contribution of 80 mM calcein and that of 50 mM ANTS/50 mM DPX are not exactly the same, the NaCl concentration of the external buffers used for the Chol-, and Schol-containing systems is not exactly the same.

Entrapment experiments and release

The kinetics of the pH-induced release was followed by fluorescence measurements. pH varying between 4.5 and 9 was investigated for systems containing cholesterol, whereas the pH range was between 5.5 and 9 for systems containing Schol. The pH of the external buffer was adjusted by adding an aliquot of diluted HCl or NaOH solution. For the short-term kinetics, 30 μ L of the collected fluorophore-loaded LUVs were diluted in an external buffer at the appropriate pH to obtain a final fatty acid concentration of about 20 μ M. The fluorescence intensity (I_f^{pH}) was recorded as a function of time during the first hour following the dilution (set as $t = 0$). Then, 10 μ L of Triton X-100 (10% v/v) was added to the suspension and the fluorescence intensity ($I_{f/T}^{pH}$) was measured. The addition of this detergent led to the complete release of the probe and therefore the maximum fluorescence intensity. If there was no significant increase of fluorescence intensity during the first minute, this initial intensity was considered to be the background fluorescence intensity (I_0^{pH}) and the percentage of encapsulation was calculated according to:

$$\% \text{ of encapsulated probe} = \left(\frac{(I_{f/T}^{pH} - I_f^{pH})}{(I_{f/T}^{pH} - I_0^{pH})} \right) \times 100 \quad (2.1)$$

In the cases of extreme pH, significant rapid leakage was observed, preventing a reliable measurement of I_0^{pH} . In these cases, this initial fluorescence intensity associated with the background fluorescence was estimated using the I_0^{pH} values measured at pH for which no significant rapid release was observed. Then, the percentage of encapsulation was determined by:

$$\% \text{ of encapsulated probe} = \left(\frac{\left(\frac{(I_{f/T}^{pH} - I_f^{pH})}{I_{f/T}^{pH}} \right)}{\left(\frac{(I_{0/T} - I_0)}{I_{0/T}} \right)} \right) \times 100 \quad (2.2)$$

where I_0 is the fluorescence intensity observed at $t = 0$ for the systems where no significant rapid leakage was observed, and $I_{0/T}$, the fluorescence intensity of these samples after the addition of Triton X-100. The average value $\overline{\left(\frac{(I_{0/T} - I_0)}{I_{0/T}} \right)}$, calculated from all the experiments where no significant rapid leakage was observed, was used in Eq. 2.2.

For long-term kinetics, 250 μL of the suspension were diluted in an external buffer at the appropriate pH to obtain a final fatty acid concentration of about 20 μM . Following the isolation and the dilution of the fluorophore-loaded LUVs, the fluorescence intensities were measured at the beginning of the kinetics for an aliquot prior and after the addition of 10 μL of Triton X-100 (10% v/v), providing respectively I_0 and $I_{0/T}$. The fluorescence intensities before (I_f^{pH}) and after the addition of Triton X-100 ($I_{f/T}^{pH}$) were measured on different aliquots at different times, for different pH. The percentage of encapsulated probe was calculated according to Equation 2.2. In an analogous approach to that used for the short-term kinetics, the values of I_0 and $I_{0/T}$ obtained at the investigated pH were used for the conditions where no rapid leakage was observed. For the extreme pH values, where fast leakage prevented us from obtaining a reliable values of these parameters, the average value $\overline{\left(\frac{(I_{0/T} - I_0)}{I_{0/T}} \right)}$, calculated from all the experiments where no significant rapid leakage was observed, was used in Eq. 2.2.

The percentage of released material corresponds to:

$$\% \text{ of released material} = 100 - \% \text{ of encapsulated probe} \quad (2.3)$$

The fluorescence experiments were carried out on a SPEX Fluorolog spectrofluorimeter at room temperature. The ANTS fluorescence intensity was measured using $\lambda_{\text{exc}} = 384$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 528$ nm with excitation and emission band widths set at 6.8 nm and 15 nm respectively. The calcein fluorescence intensity was recorded at $\lambda_{\text{em}} = 513$ nm, using $\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm with excitation and emission band widths set at 2.5 nm and 1.9 nm respectively. All experiments were carried out in independent triplicates. The average values are reported and the given uncertainties correspond to the standard deviations.

LUVs size

The hydrodynamic diameters of the particles were measured at 25 °C using a Coulter N4 Plus quasi-elastic light-scattering (QELS) apparatus coupled with a Malvern autocorrelator (BeckmanCoulter, Fullerton, CA). The lipid concentration was adjusted to approximately 20 μM and the measurements were carried out after a 2-day incubation at a given pH.

2.4 Results and Discussion

The pH sensitivity of the kinetics of the fluorophore release from PA/Chol LUVs is illustrated in Figure 2.2. The fluorescence intensity was very low and constant when the LUVs were incubated at pH 7.4 or 9. This indicates that the leakage was practically nil over this short period, a result completely consistent with the LUV stability reported earlier.¹⁰ Conversely, the LUVs released rapidly their content when the external pH was 4.5. After 10 minutes, about 30% of the content had leaked out.

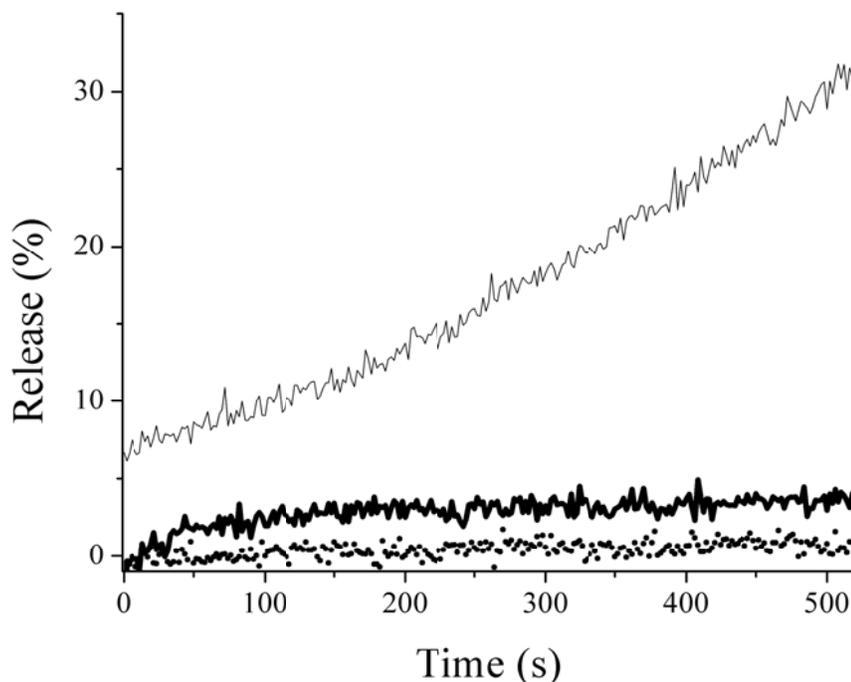


Figure 2.2: Kinetics of the ANTS/DPX release from PA/Chol (30/70) LUVs prepared at pH 7.4. The external pH was adjusted at $t = 0$ s to 4.5 (line), 7.4 (dotted line) or 9 (thick line).

The fluorophore release from LUVs prepared with different linear and saturated fatty acids has been characterized at pH 7.4 and 4.5 (Fig. 2.3). For the 3 investigated systems (PA/Chol, α OH-PA/Chol and α F-PA/Chol), more than 80% of the probe was still encapsulated after 100 days when the LUVs were incubated at pH 7.4. The results for the PA/Chol system are in agreement with our previous study,^{10,11} and we show here that the presence of the OH or F in the α position has a very little impact on the low passive permeability of these cholesterol-rich LUVs. The extremely low permeability of these LUVs is demonstrated by the fact that more than 60% of the encapsulated probe was still inside the LUVs after 1.5 years for PA/Chol system.

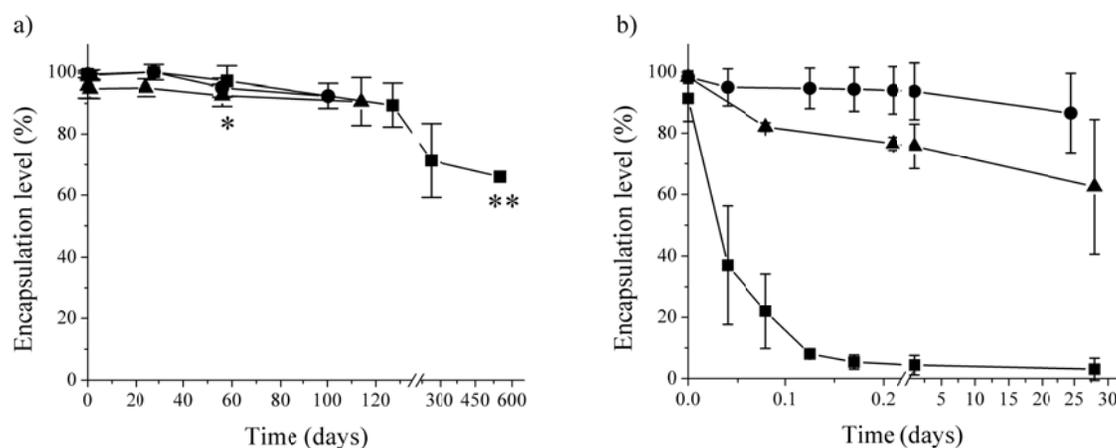


Figure 2.3: Kinetics of ANTS/DPX release from LUVs prepared with PA/Chol (■), αOH-PA/Chol (▲) and αF-PA/Chol (●) 30/70 mixtures. The measurements were carried out at pH (a) 7.4, and (b) 4.5. The data points identified with * and ** correspond to duplicates, and single measurements, respectively.

The kinetics of the probe release displayed a different behavior at pH 4.5 (Fig. 2.3B). After 5 hours (0.21 day), the encapsulation level decreased to 5%, 81% and 94% for PA/Chol, αOH-PA/Chol and αF-PA/Chol systems respectively. The release from PA/Chol LUVs was quasi complete whereas practically all the encapsulated material remained inside the LUVs formed with αF-PA/Chol mixture. Under these conditions, the release was strongly modulated by the pK_a of the fatty acid. After a 30-days period at pH 4.5, 63% and 85% of the probe were still encapsulated for αOH-PA/Chol and αF-PA/Chol respectively.

The pH sensitivity of the bilayer permeability of these systems is highlighted by reporting the encapsulation level after a given incubation period as a function of the external pH (Fig. 2.4). For a 24-hour period (Fig. 2.4A), no leakage was observed for $pH > 6$ for the 3 formulations containing cholesterol. For lower pH, a leakage dependent on the nature of the fatty acid was observed. At pH 4.5, the LUVs made of PA/Chol were almost completely empty, whereas those made of αOH-PA/Chol released only 20% of their content and those prepared with αF-PA/Chol showed practically no leakage. This trend was

even more pronounced after a 1-month incubation (Fig. 2.4B). The encapsulation level was affected below pH 6. It decreased rapidly as a function of decreasing pH for PA/Chol system reaching completely empty LUVs for $\text{pH} \leq 5$. The shape of this curve is reminiscent of a titration curve. For $\alpha\text{OH-PA/Chol}$ LUVs, significant leakage ($\sim 65\%$) was observed at $\text{pH} 4.5$. $\alpha\text{F-PA/Chol}$ LUVs remained stable over the whole range of investigated pH and the passive permeability was very limited. In addition to showing the stability of these LUVs at the pH they were formed ($\text{pH} 7.4$), it indicates that an increase in pH up to 9 did not reduce the stability of the three investigated systems.

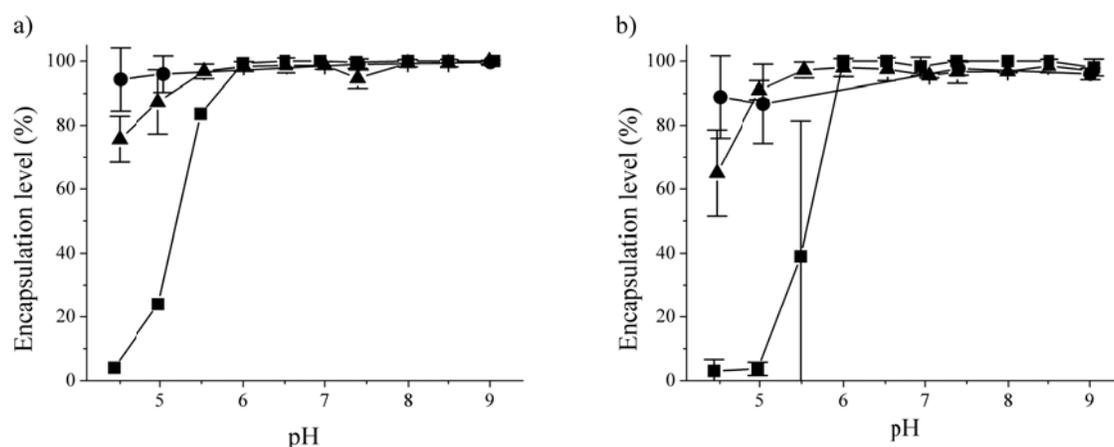


Figure 2.4: pH-triggered ANTS/DPX release from PA/Chol (■); $\alpha\text{OH-PA/Chol}$ (▲); $\alpha\text{F-PA/Chol}$ (●) LUVs. The encapsulation levels are reported after (a) a 24-h, and (b) a 1-month incubation. The time was set to 0 when the external pH was changed.

The influence of pH on the kinetics of release from Schol systems (PA/Schol and $\alpha\text{OH-PA/Schol}$) was assessed (Fig. 2.5). $\alpha\text{F-PA/Schol}$ (3/7) mixtures appeared to behave differently as only a very small quantity of leaky LUVs could be obtained by extrusion. This system was therefore not examined in details. The passive release of PA/Schol LUVs is very limited at $\text{pH} 5.5$; most of the content was intact after 7 days in agreement with previous results.¹⁰ The presence of the $\alpha\text{OH-PA}$ appeared to slightly destabilise the LUVs at $\text{pH} 5.5$ as the encapsulation level was reduced to 70% after one week. It has been shown that the chain ordering ability of Schol was slightly lower than that of cholesterol.^{10,21} In

addition, it was inferred from a monolayer study²² that α OH-PA leads to distortions of the chain packing; its larger polar head group resulting from the presence of the α OH group would lead to a misfit between the alkyl chain area and the polar head group area. The combined effect of reduced ordering ability of Schol and distorted chain order of α OH-PA are proposed to be the origin of the increased permeability. For these Schol-containing LUVs, the permeability was considerably greater at higher pH, in agreement with previous results obtained with the PA/Schol LUVs;¹⁰ this feature is conserved for the α OH-PA/Schol LUVs. After 7 days at pH 8.0, the encapsulation level went down to 60% and 5% for PA/Schol, and α OH-PA/Schol respectively. The α OH-PA/Schol LUVs released more rapidly than PA/Schol LUVs, showing that the instability of these systems was influenced by the nature of the FA, an effect likely related to its pK_a .

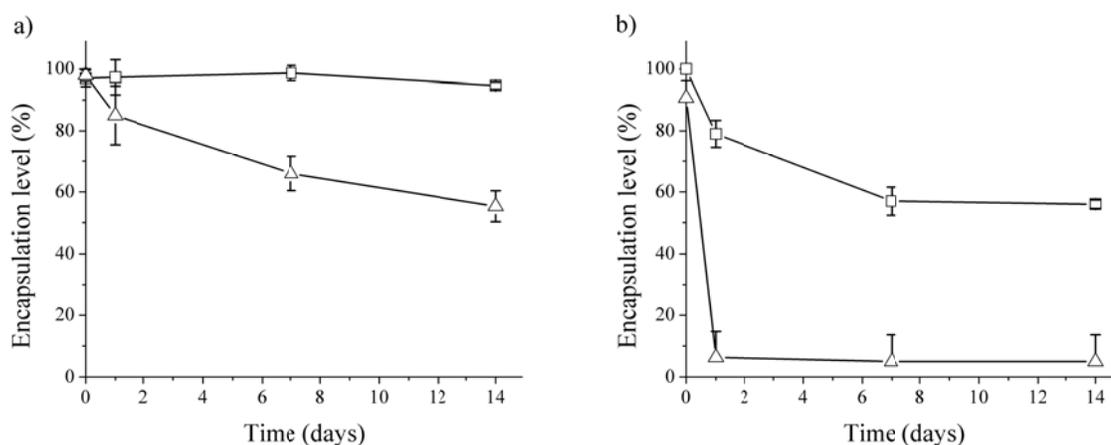


Figure 2.5: Kinetics of calcein release from LUVs prepared with PA/Schol (\square), and α OH-PA/Schol (Δ) 30/70 mixtures. The measurements were carried out at pH (a) 5.5, and (b) 8.0.

As for Chol-based systems, the encapsulation level of the Schol-based LUVs was determined as a function of pH immediately after a final dilution at the appropriate pH (set as $t = 0$) (Fig. 2.6A) and after a 24-h incubation (Fig. 2.6B). The instantaneous leakage from PA/Schol system was practically nil at $pH < 8.5$ whereas a leakage between 10 and

15 % was observed at $\text{pH} \geq 8.5$. The behaviour of $\alpha\text{OH-PA/Schol}$ was similar except that the instantaneous leakage was slightly more pronounced for $\text{pH} \geq 7.4$. After a 24-h incubation at $\text{pH} 5.5$, a similar and limited release was observed for both Schol based systems. However, at higher pH , the leakage was systematically greater for $\alpha\text{OH-PA/Schol}$ LUVs than for the PA/Schol ones. At $\text{pH} 7$, for example, the PA/Schol LUVs were still practically intact while the $\alpha\text{OH-PA/Schol}$ LUVs were essentially empty. These results indicate that the pH -dependence of the release from $\alpha\text{OH-PA/Schol}$ LUVs was shifted towards lower pH relative to PA/Schol system.

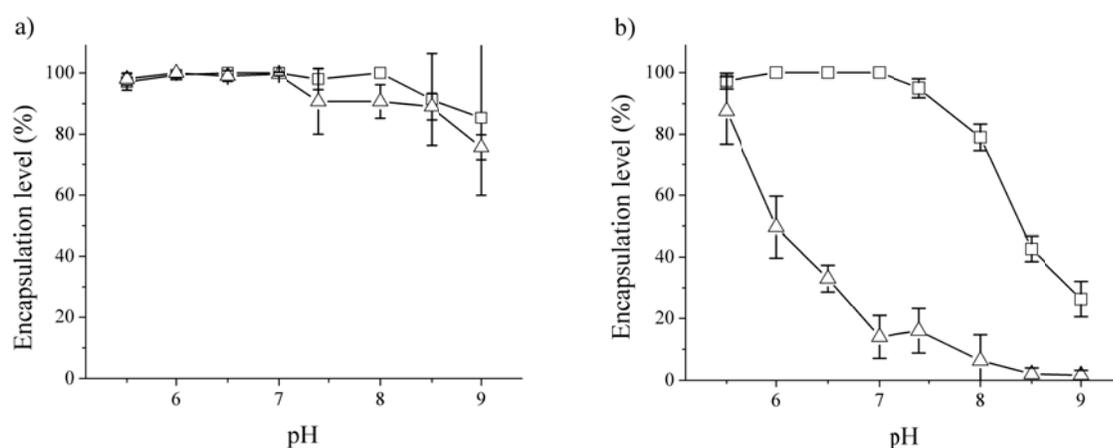


Figure 2.6: pH -triggered calcein release from PA/Schol (□) and $\alpha\text{OH-PA/Schol}$ (Δ) LUVs (a) immediately after the pH change and (b) after a 24-h incubation period.

The size of the LUVs was measured using QELS (Fig. 2.7). For Chol systems, after 2 days at $\text{pH} 7.4$ (under conditions for which no significant leakage was observed), their diameter remained around 100-110 nm. At $\text{pH} 4.5$, an increase of the LUVs size was observed for PA/Chol system whereas the diameter of the 2 other formulations, which displayed limited leakage, remained fairly constant. After extrusion of Schol systems, the QELS measurements confirmed the formation of LUVs with an hydrodynamic diameter of about 100 nm. After 2 days of incubation, the PA/Schol LUV size remained practically unchanged at $\text{pH} 5.5$, paralleling its limited passive release. At $\text{pH} 5.5$, $\alpha\text{OH-PA/Schol}$ LUV were slightly leakier and their size, after 2 days, was actually increased to ~ 300 nm.

At pH 9, conditions under which more extensive leakage was observed, the LUV diameter increased considerably; it was up to 300 nm for PA/Schol LUVs and reached 1400 nm in the case of α OH-PA/Schol LUV, a system for which complete leakage was observed. Interestingly even though there is no straightforward relation between leakage and LUV size, it is noticeable that the pH sensitivity of the LUV permeability and that of the LUV size shows similar trends.

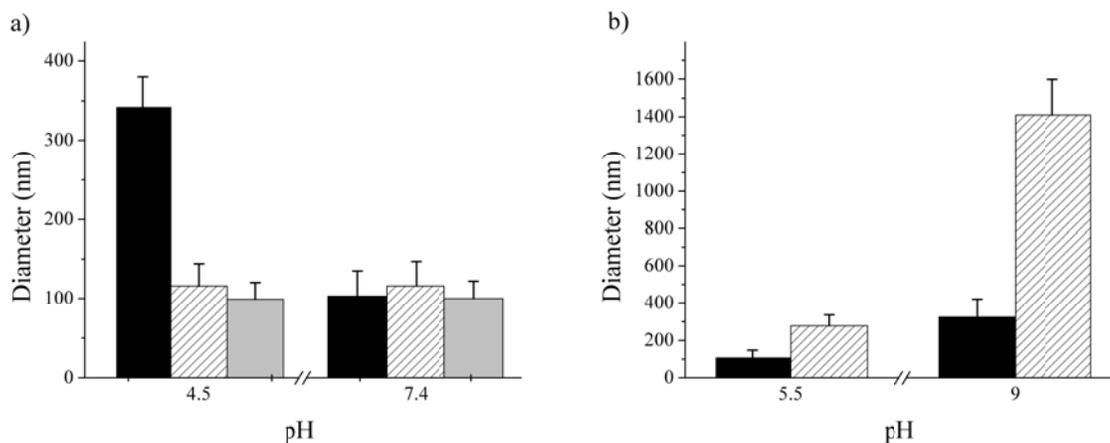


Figure 2.7: Variations of the LUVs hydrodynamic diameter (nm) as a function of pH for the (a) cholesterol-containing systems: PA/Chol (black), α OH-PA/Chol (hatched) and α F-PA/Chol (gray) and (b) Schol-containing systems: PA/Schol (black) and α OH-PA/Schol (hatched). The measurements were carried out 2 days after the isolation of the fluorophore-loaded LUVs followed by the change of the external pH.

The impact of the pK_a of the saturated fatty acid on the leakage properties of the sterol-rich non-phospholipid LUVs is summarized in Figure 2.8. This graph reports the influence of the pK_a of the free fatty acid used to prepare the LUVs on the extent of content release, after a 24-h incubation period. For cholesterol-containing systems at pH 4.5, the highest percentage of release was obtained for the highest pK_a : 95% of release for PA/Chol system. This value decreased when the fatty acid pK_a decreased and was less than 10% for α F-PA/Chol LUVs. For Schol systems at pH 8, the lowest percentage of release was

obtained for the highest pK_a : 20% of release for PA/Schol system. In this case, the release was increased for the lower pK_a value and reached 90% for α OH-PA/Chol LUVs.

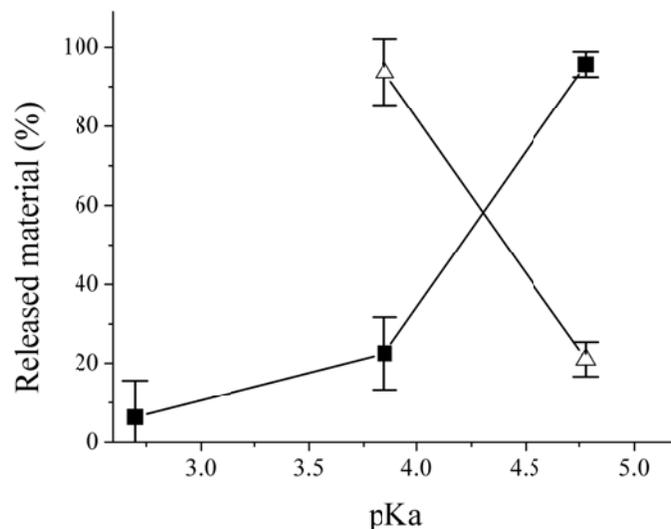


Figure 2.8: Correlation between the fatty acid pK_a and the extent of fluorophore release for cholesterol-containing systems (pH 4.5) (■) and Schol-containing systems (pH 8) (Δ). The reported release was measured 24 h after the change of the external pH.

We examined the leakage of the different systems as a function of the proportion of deprotonated fatty acid, a parameter modulated by their pK_a and likely responsible for the different permeability observed for the LUVs including different fatty acid. The percentage of deprotonation cannot be inferred strictly from the pK_a when a fatty acid is incorporated in bilayers. Because of the charged bilayer interface, there is a pH gradient from the bulk to the bilayer interface and it is the interfacial pH that dictates the protonation/deprotonation of the fatty acid. In addition, the level of fatty acid deprotonation modulates the bilayer surface charge density that modulates the pH gradient. We used a Gouy-Chapman approach to take into account the pH gradients in our systems, in an analogous manner to those previously described to address similar questions.²³⁻²⁶ The bilayer surface charge density σ can be obtained using:

$$\sigma = \frac{e \sum_i z_i \cdot x_i}{\sum_i A_i \cdot x_i} \quad (2.4)$$

where e is the elementary charge, x_i is the mole fraction of the component i , z_i , its charge and A_i , its surface molecular area. z_i was set to -1 for unprotonated FAs and Schol while it was 0 for the other species. A_i was estimated to 20 Å² for PA²⁷ and 25 Å² for αOH-PA.²⁷⁻²⁹ No interfacial molecular area value could be found in the literature for αF-PA; this value was approximated by the one used for PA. The interfacial molecular areas of the unprotonated acids were considered to be equal to that of the protonated analogues. It was shown that the orientational order profile of PA- d_{31} in PA- d_{31} /Chol bilayers at 70 °C was very similar at pH 5.5 and 9.¹⁰ The similarity of the order profiles obtained for the protonated (pH 5.5) and unprotonated (pH 9) form of PA- d_{31} was also observed at 25 °C for the PA- d_{31} /Chol/Schol mixture with a molar ratio of 30/35/35.¹⁰ There is a correlation between the average orientational order parameter and the interfacial area of a molecule bearing the deuterated alkyl chain.³⁰ Therefore the correspondence of the orientation order profiles for the different pH indicates a similarity of PA- d_{31} interfacial molecular area. Moreover, monolayer studies showed that the molecular surface area of stearic acid does not vary considerably between pH 2 and 9.^{31,32} Therefore the equivalence of the interfacial areas of the protonated and unprotonated forms of the fatty acids was assumed. A_i was estimated to 37 and 43 Å² for cholesterol and Schol, respectively.^{10,33-35} The mole fraction of sterol was 0.7 and those for the protonated and unprotonated forms of the fatty acids were obtained from their pK_a (reported in Figure 1) and the interfacial pH (pH_{int}). The apparent pK_a of PA inserted in fluid bilayers (from 6.4 to 8.2) is actually different to the pK_a of its monomeric form.^{11,26,36} This shift is associated with the pH gradient existing between the bilayer interface and the bulk of the solution as taken into account by the present model. Intermolecular interactions in the bilayer plane may also affect the fatty acid pK_a^{37,38} but this putative contribution is neglected at this point.

Because of the interfacial charge density, pH_{int} can be considerably different than the bulk pH (pH_{bulk}). The proton concentration at the interface (C_{int}) can be calculated using:

$$C_{int} = C_{bulk} \cdot \exp\left(\frac{-z_p \cdot F \cdot \varphi_0}{RT}\right) \quad (2.5)$$

where C_{bulk} is the concentration of protons in the bulk solution (associated with pH_{bulk}), z_p the proton charge (+1), F the Faraday constant, φ_0 the membrane surface potential and RT the thermal energy. The surface potential φ_0 is related to σ according to:

$$\sigma^2 = 2000\varepsilon_0\varepsilon_rRT \sum_i \left[C_i \cdot \left(\exp\left(\frac{-z_p \cdot F \cdot \varphi_0}{RT}\right) - 1 \right) \right] \quad (2.6)$$

with ε_0 the permittivity of vacuum, ε_r the dielectric constant of the medium and C_i the concentration of the ion i with a charge of z_i . σ was calculated taking into account TRIS, MES and NaCl. For the buffer molecules, their charged forms were considered as monovalent ions and their concentration was calculated as a function of pH_{bulk} , assuming a pK_a of 8.15 and 6.15 for TRIS and MES respectively. Because Equation 2.6 does not have analytical solution, the solutions of Eq. 2.4-2.6 for which the values of the surface charge density, σ , the percentage of deprotonation of the fatty acid, and pH_{int} were consistent were obtained by an iterative process. The encapsulation level (obtained 24 h after the pH adjustments) was plotted as a function of the percentage of deprotonation of the fatty acid (Fig. 2.9). For the fatty acid/Chol mixtures, the distinct curves obtained as a function of bulk pH for the 3 different acids (Fig. 2.4A) are found superimposed when expressed in terms of the protonation state of the carboxylic group; this finding indicates that the LUV stability is primarily dictated by this parameter. The behavior of the fatty acid/Schol mixtures does not fit well this trend. The content release is affected by the state of protonation of the acid but it appears that other parameters also influence the LUV permeability. The sulfate group of Schol and the hydroxyl group of $\alpha\text{OH-PA}$ are relatively bulky and these molecular details are proposed to be associated with leakier LUVs, an observation also made at low pH, where the LUVs should be impermeable. For these mixtures, a combined influence of the carboxylic group protonation state and of the interfacial group volume appears to define the permeability properties of the LUVs.

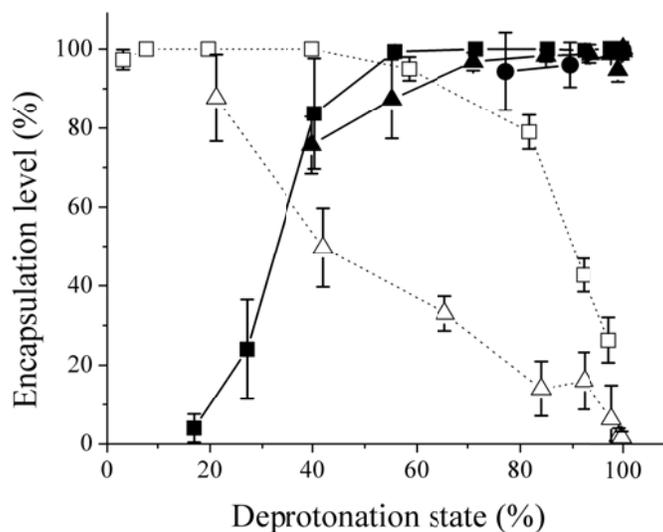


Figure 2.9: Variations of the encapsulation level, 24 h after the adjustment of the external pH, as a function of the percentage of deprotonation of the LUVs: PA/Chol (■), PA/Schol (□), αOH-PA/Chol (▲), αOH-PA/Schol (Δ), and αF-PA/Chol (●).

Finally, since the cholesterol- and Schol-containing LUVs displayed an opposite sensitivity to pH, we have decided to investigate the pH stability of LUVs including both sterols. We prepared LUVs from a PA/Chol_{0.25}/Schol_{0.75} mixture, for which the total sterol content was 70 (mol) % and cholesterol represented 25 % of the sterol content. This composition was chosen on the basis of the composition-phase diagram previously described for the PA/Chol_x/Schol_{1-x} system.¹⁰ This diagram indicates that the mixture with a Chol/Schol molar ratio of 25/75 provides fluid bilayers that are among those stable over the widest pH range, from pH 5 to 9. Analogously to the previously described LUVs, it was possible to extrude the suspension, despite its high sterol content. The resulting LUVs were shown to be very stable and practically pH insensitive (Fig. 2.10). After a 147-day incubation period at room temperature, no significant leakage could be detected over the whole investigated pH range (5.5 - 9.0). Therefore, the sterol composition of the fatty acid/sterol LUVs is not only a parameter controlling whether the LUVs are leaky at low or at high pH, it also provides a simple means to prepare pH-sensitive and pH-insensitive LUVs.

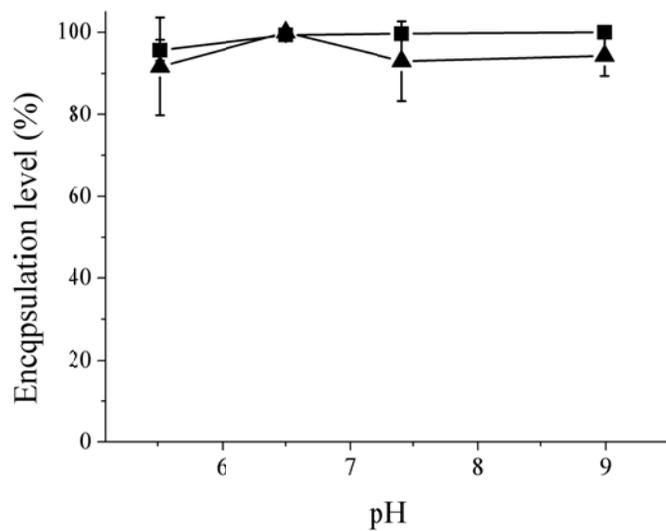


Figure 2.10: Influence of the external pH on the calcein release from PA/Chol_{0.25}/Schol_{0.75} LUVs. The encapsulated levels were measured 24 h (■) and 147 days (▲) after the change of the external pH.

It is clear that the protonation state of the fatty acid modulates the permeability of the LUVs and we propose that this relationship is associated with the mixing properties of the different chemical species. It has been shown that, at pH 9, a condition under which the fatty acid is fully deprotonated, PA and cholesterol, in a 3/7 molar ratio, are well mixed and form a liquid ordered (lo) phase.^{10,36} The mixing of the two species reduces the unfavorable repulsive electrostatic interactions between unprotonated PA molecules. Upon decreasing pH, and therefore protonation of the fatty acid, a transition from the lo to a solid phase is observed for the PA/Chol (3/7) mixture.³⁶ It was also shown that PA and Chol were both in a solid phase and were phase separated. This change was associated to the variation of the electrostatic interfacial interactions between the components. A similar phenomenon was observed for PA/Schol system¹⁰ but in that system, the lo phase was obtained for pH lower than 6.5 while a solid phase was observed for pH higher than 6.5. We suggest that when the variation of pH induces a transition from lo to solid phase, the LUVs become unstable and leaky. This conclusion is supported by the behavior of the PA/Chol_{0.25}/Schol_{0.75} LUVs

because a stable lo phase is reported for this system between pH 5 and 9¹⁰ and no leakage is observed over that pH range. The co-existence of solid and lo phase regions within the bilayers can lead to defects that would favour leakage; enhanced permeability has been observed when gel and fluid phases coexist in phospholipid LUVs (for example, see ref. 39,40); such phenomenon should be even more pronounced for a solid/fluid phase coexistence. In addition, it is not clear how solid domains can be accommodated in bilayers forming LUVs. These domains could destabilize the curled bilayer and create leaks. Such a destabilization would also be compatible with the increase of size particles that was observed, in parallel with leakage.

2.5 Conclusion

In conclusion, we introduce an original extension of the new non-phospholipidic LUVs with high cholesterol content that present a remarkable versatility for pH-triggered release. The resulting LUVs show a very limited passive permeability under conditions where they are stable; the content is practically intact for several months in most cases. We show in this paper that non-phospholipid LUVs can be prepared from fatty acid/sterol mixtures and the pH control of the release of their content can be rationally designed, is predictable and particularly flexible. The selection of the sterol defines the low/high pH stability while the selection of the fatty acid, on the basis of its pK_a, allows the fine tuning of the pH at which release is triggered. The presence of an electro-withdrawing group (OH or F) in the α position of the fatty acid carboxyl group is one simple way to decrease its pK_a and therefore modulate the proportion of deprotonated state. Finally, the long term encapsulation of agents inside these LUVs is, under conditions where the LUVs are stable, greatly enhanced compared to conventional LUVs. These original aspects are beneficial to the use of LUVs for encapsulation, vectorisation and controlled release.

2.6 Acknowledgment

The authors would like to thank Patrick Oliger for carrying out preliminary experiments. T. Phoeung is grateful to Université de Montréal for her Scholarship. This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies through its financial support to the Center for Self-Assembled Chemical Structures (CSACS).

2.7 References

1. Drummond, D. C.; Zignani, M.; Leroux, J.-C. *Prog. Lipid Res.* **2000**, *39*, 409.
2. Yatvin, M. B.; Kreutz, W.; Horwitz, B. A.; Shinitzky, M. *Science* **1980**, *210*, 1253.
3. Hazemoto, N.; Harada, M.; Komatsubara, N.; Haga, M.; Kato, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 748.
4. Leventis, R.; Diacovo, T.; Silvius, J. R. *Biochemistry* **1987**, *26*, 3267.
5. Ellens, H.; Bentz, J.; Szoka, F. C. *Biochemistry* **1984**, *23*, 1532.
6. Parente, R. A.; Nir, S.; Szoka, F. C. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 4724.
7. Rafalski, M.; Ortiz, A.; Rockwell, A.; van Ginkel, L. C.; Lear, J. D.; DeGrado, W. F.; Wilschut, J. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10211.
8. Roux, E.; Stomp, R.; Giasson, S.; Pézolet, M.; Moreau, P.; Leroux, J.-C. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1795.
9. Bron, R.; Ortiz, A.; Wilschut, J. *Biochemistry* **1994**, *33*, 9110.
10. Bastiat, G.; Lafleur, M. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 10929.
11. Bastiat, G.; Oliger, P.; Karlsson, G.; Edwards, K.; Lafleur, M. *Langmuir* **2007**, *23*, 7695.

12. Cistola, D. P.; Hamilton, J. A.; Jackson, D.; Small, D. M. *Biochemistry* **1988**, *27*, 1881.
13. Ives, D. J. G.; Pryor, J. H. *J. Chem. Soc.* **1955**, 2104.
14. Davies, P. B.; Monk, C. B. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1953**, *50*, 128.
15. Nims, L. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 987.
16. Spector, A. A. *J. Lipid Res.* 1975, *16*, 165.
17. Piérard, G. E.; Piérard-Franchimont, C.; Hermanns-Lê, T., Hydroxyacids. In *Cosmetic Science and Technology Series*, Elsner, Peter//Maibach, Howard: **2000**; Vol. 23, pp 35.
18. Allen, T. M., Calcein as a tool in liposome methodology. In *Liposome technology*, Gregoriadis, G., Ed. CRC Press: Boca Raton, FC, **1984**; pp 177.
19. Benachir, T.; Lafleur, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1235*, 452.
20. Benachir, T.; Lafleur, M. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 831.
21. Smondyrev, A. M.; Berkowitz, M. L. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1672.
22. Weidemann, G.; Brezesinski, G.; Vollhardt, D.; De Wolf, C.; Möhwald, H. *Langmuir* **1999**, *15*, 2901.
23. McLaughlin, S. *Curr. Top. Membr. Trans.* **1977**, *9*, 71.
24. Seelig, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1331*, 103.
25. Lassiseraye, D.; Courtemanche, L.; Bergeron, A.; Manjunath, P.; Lafleur, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 502.
26. Cevc, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1031-3*, 311.
27. Kellner, B. M. J.; Cadenhead, D. A. *J. Colloid Interf. Sci.* **1977**, *63*, 452.
28. Siegel, S.; Vollhardt, D.; Cadenhead, D. A. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2005**, *256*, 9.
29. Weidemann, G.; Brezesinski, G.; Vollhardt, D.; Möhwald, H. *Langmuir* **1998**, *14*, 6485.

30. Bloom, M.; Evans, E.; Mouritsen, O. G. *Q. Rev. Biophys.* **1991**, *24*, 293.
31. Spink, J. A. *J. Coll. Sci. Imp. U. Tok.* **1963**, *18*, 512.
32. Brzozowska, I.; Figaszewski, Z. A. *Colloid Surface B* **2003**, *30*, 187.
33. Chen, Z.; Rand, R. P. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 267.
34. Ipsen, J. H.; Karlström, G.; Mouritsen, O. G.; Wennerström, H.; Zuckermann, M. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *905*, 162.
35. Paré, C.; Lafleur, M. *Langmuir* **2001**, *17*, 5587.
36. Ouimet, J.; Croft, S.; Paré, C.; Katsaras, J.; Lafleur, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1089.
37. Engblom, J.; Engström, S.; Jönsson, B. *J. Control. Release* **1998**, *52*, 271.
38. Kanicki, J. R.; Shah, D. O. *J. Colloid Interf. Sci.* **2002**, *256*, 201.
39. Corvera, E.; Mouritsen, O. G.; Singer, M. A.; Zuckermann, M. J. *Biophys. J.* **1992**, *1107*, 261.
40. Trandum, C.; Westh, P.; Jörgensen, K.; Mouritsen, O. G. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 2486.

Chapitre 3

Isomerization behaviour of an amphiphilic monoalkylated azobenzene derivative inserted in non- phospholipid LUVs and preliminary photo-induced release experiments

Thida Phoeung, Gauthier Rydzek and Michel Lafleur

Will be submitted

Keywords : isomerization, azobenzene, liposomes, photo-induced release

Abbreviated title : photo-sensitive liposomes

3.1 Abstract

In the field of photo-controlled release of active agents, many studies based on reversible photo-isomerization of photo-sensitive compounds have been carried out, particularly using azobenzene moieties diluted in phospholipid matrices. In this paper, we studied the photo-isomerization process of a monoalkylated azobenzene amphiphile ($\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$) mixed with cholesterol sulfate (Schol). This system belongs to the family of sterol-enriched non-phospholipid liposomes (NPLs) which were shown to be able to form stable large unilamellar liposomes (LUVs) and to be pH-sensitive when a pH-sensitive amphiphile was incorporated in the bilayer. Different batches of $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ /Schol mixtures were prepared. They were composed of 14, 23 and 24 % of the monoalkylated $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ and 86, 77 and 76 % of Schol. LUVs were formed by standard extrusion. The isomerization process of the bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ was compared to that of the free $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ solubilised in CHCl_3 . Three different batches of $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ /Schol were made and the isomerization behaviour and preliminary release experiments were compared. These batches showed different behaviour, an observation that is believed to be related to the different $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ /Schol proportions.

3.2 Introduction

It has been shown in several papers that non-phospholipid mixtures of a monoalkylated amphiphile (between 30 and 50 (mol) %) with a high quantity of sterol (70 to 50 (mol) %) are able to form stable liquid ordered (L_o) phase.¹⁻⁶ It was shown that large unilamellar vesicles (LUVs) could be prepared from several of these mixtures by simple extrusion process. These non-phospholipid LUVs showed slow passive release compared to conventional liposomes. Moreover, inserting a pH-sensitive amphiphile, such as a fatty acid leads to pH-sensitive LUVs for which the pH-release behaviour is controlled by the pKa of the included fatty acid.^{1-3,7} Non-phospholipid LUVs containing a neutral amphiphile and a cationic amphiphile were also obtained.^{4,8}

We are now exploring the possibility to make photo-sensitive non-phospholipid liposomes by the insertion of a photo-sensitive monoalkylated amphiphile. In the photo-controlled release field, several systems have been made and studied using different strategies. For example, irreversible photo-induced polymerisations were one of these strategies.^{9,10} Photo-polymerisation can cause the formation of cross-linked lipid networks or lipid domains, when polymerisable groups are attached to each chain, thus leading to domain boundaries through which encapsulated compounds can leak. Other groups chose reversible isomerization of photo-sensitive group derivatives inserted in phospholipid bilayers. For example, spiropyran isomerization causes defects in the membrane through which leakage occurs.¹¹⁻¹³ Spirooxazine isomerization induces changes in polarity of the spirooxazine moiety, thus leading to a translocation of a part of the molecule from the interior of the membrane to the surface.¹⁴ Bai *et al.* used dithienylethene to induce defects in the bilayer following photo-isomerization. Interestingly, the isomerization process was observed but was not followed by leakage of the content.¹⁵ This could be due to the different nature of the photo-sensitive molecule (non-alkylated) compared to the lipid matrix. Thus, changes in the conformation of this molecule don't lead to significant defects in the lipid chain packing. Another largely used photoisomerisable group is azobenzene

(Azo). It is known that Azo derivatives can undergo a reversible *trans-cis* isomerization under irradiation of UV or Vis light.^{16,17} For example, the isomerization process of monoalkylated Azo amphiphiles (with Azo attached at different places along the chains) forming bilayers was studied.^{16,18} These Azo derivatives were able to isomerise with different rates. The *cis* to *trans* isomerization rate seemed to be dependent on the orientation of the Azo moiety in the bilayer, an observation that could be related to the mobility of the chromophore in the bilayer. Other formulations were made mixing either monoalkylated or double chain Azo derivatives with different lipid matrices, including or not cholesterol (Chol).^{17,19-25} Photo-release was observed in some conditions and the extent of release depended on many factors. The presence of cholesterol does not have a universal effect since, depending on the formulation, it either enhances or inhibits the release. More particularly, Morgan *et al.* used double chain 1,2-bis(4-(4-*n*-butylphenylazo)phenylbutyroyl)phosphatidylcholine (Bis-AzoPC) or monoalkylated 1-hexadecanoyl-2-(4'-*n*-butylphenyl)azo-4"(γ-phenylbutyroyl))phosphatidylcholine (PazoPC) mixed with double chain phospholipid bilayers. Interestingly, replacement of 6 % of Bis-AzoPC by 12 % of PazoPC showed no release.²¹ It seems that adjacent Azo moieties were more effective at inducing leakage than isolated ones. All of these formulations are potential nanovectors for the photo-controlled release of active agents.

In this paper, we report the photo-isomeriation behaviour of a non-phospholipid mixture composed of approximately ~ 14, 23 and 24 % of a monoalkylated decyl-azobenzyl-triethylammonium (AzoC₁₀N⁺, fig. 3.1) and ~ 86, 77 and 76 % of cholesterol sulfate (Schol). This Azo derivative was chosen because its acyl chain length is around the length of Schol. Furthermore, the head group bears a positive charge that will ensure its position at the interface. Finally, the Azo moiety is located along the chain, so that isomerization can occur in the inner bilayer. The isomerization of the Azo moiety is expected to induce defects in the bilayer and trigger the photo-release of the content. Therefore we hope to obtain the combined properties of very stable liposomes, due to the high sterol content, and photo-triggered delivery of the encapsulated materials, due to the azo-containing monoalkylated agent. Preliminary release experiments were performed with this system in order to evaluate its potential.

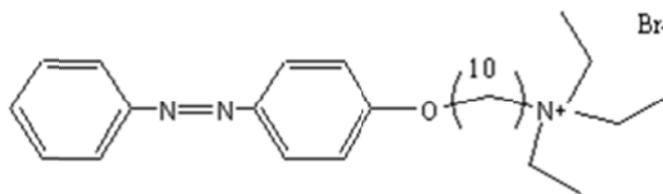


Figure 3.1 : Chemical structure of AzoC₁₀N⁺.

3.3 Materials and Methods

Cholesterol sulfate (Schol), palmitic acid (PA, approximately 99%), Triton X-100 and tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris, > 99.8%) were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 99%) was obtained from Aldrich (St Louis, MO). 3,6-dihydroxy-2,3-bis[N,N'-di(carboxymethyl)-aminomethyl]fluoran (calcein) was purchased from Invitrogen (Eugene, OR). 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid (MES, > 99%) and NaCl (> 99%) were obtained from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ) and Anachemia (Montréal, QC, Canada), respectively. The monoalkylated Azobezene derivative (AzoC₁₀N⁺) was synthesised by Qian Zhang in Prof. Géraldine Bazuin's group (Dept of Chemistry, Université de Montréal).

PA/Schol and AzoC₁₀N⁺/Schol powders were obtained by overnight-lyophilisation of weighed quantities of each compound solvated in a mixture of 75/25 (v/v) of benzene/methanol. For PA/Schol, the molar ratio is 30/70. For Azo/Schol, 3 batches were made. The exact relative composition was assessed by ¹H NMR and the average AzoC₁₀N⁺/Schol composition was 30/70.

For UV-Vis experiments, a stock liposome dispersion was prepared by hydrating mixtures of lipids in an MES/Tris buffer (140 mM NaCl, 50 mM MES, 50 mM Tris and 0.5 mM EDTA, pH 5.5 for PA/Schol and pH 7.4 for Azo/Schol). The hydration process

consisted of five freeze-and-thaw cycles (from liquid nitrogen temperature to ~ 70 °C) and vortexing between the cycles. The dispersions were then extruded 15 times through two stacked polycarbonate filters with a 100-nm pore sizes, using a handheld Liposofast extruder (Avestin Corp., Ottawa, ON, Canada). The LUVs sizes were assessed by quasielastic light scattering (QELS).

For release experiments, a fluorescent probe was added to the buffer. Release experiments were carried out using the self-quenching capacity of calcein.²⁶ Ten mg of lipid mixtures were hydrated in 300 μ L of an MES/Tris buffer containing 80 mM calcein (35 mM NaCl, 50 mM MES, 50 mM Tris, 0.5 mM EDTA) referred to as the internal buffer. Then dispersions were extruded through filters with 100-nm pore diameter in order to obtain LUVs. Free calcein was separated from the encapsulated probe by gel exclusion chromatography using a column (column diameter, 1.5 cm; length 25 cm) filled with Sephadex G-50 medium (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) equilibrated with an isosmotic MES/TRIS buffer. This external buffer was composed of 140 mM NaCl, 50 mM MES, 50 mM Tris, 0.5 mM EDTA. Internal and external buffers were set to pH 7.4 and 5.5 for Azo/Schol and PA/Schol respectively.

The isomerization of the Azo group was initiated using the fluorimeter source (75 W Xenon lamp). The bandwidth was set to 20 nm, giving a power at 350 and 450 nm of around 500 μ W/cm². The source power was measured at 400 nm and 450 nm using a powermeter. The power obtained was extrapolated at 350 nm according to the emission spectra of the source. Samples were maintained under agitation and temperature was kept at 25 °C during irradiation process and measurements.

UV-Vis measurements were carried out using a CaryWin spectrometer. Samples were diluted in order to obtain around 0.05 mM of AzoC₁₀N⁺. UV-Vis spectra of free and bilayer-inserted AzoC₁₀N⁺ before the irradiation process ($t = 0$, corresponding to the *trans*

form) and at the end of irradiation process ($t = \infty$, corresponding to the *cis* form) (see Figure 3.1) were fitted by Gaussians in order to check the relative proportions of the 2 forms in the solution. For free $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$, the spectra were fitted between 300 and 377 nm, using 2 bands : the maximums were fixed at 348 and 315 nm while the bandwidths could vary between 55 and 60 nm. For bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$, the spectra were fitted between 276 and 377 nm, using 2 bands : one centered at 333 nm with a bandwidth that could vary between 65 and 70 nm, and the second centered at 301 nm with a bandwidth that could vary between 92 and 97 nm. At $t = 0$, the spectra of $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$, free in solution or inserted in bilayers, could be reproduced with the high-wavelength component, associated with the *trans* form, the other component, associated with the *cis* form, contributing for less than 10 % of the area. From these simulations, it was inferred that, initially, almost all $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ was in the *trans* form. At $t = \infty$, for the $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ both in solution and membrane-inserted, the spectra could be simulated by the low-wavelength band, representing the *cis* form; the band associated to the *trans* form represented less than 5 % of the spectrum area. This result indicates that, in these conditions, almost all $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ was under the *cis*-form.

At each step of the irradiation process, one can write :

$$A_{tot} = l\varepsilon_t[\text{AzoC}_{10}\text{N}^+]_{tot}X_t + l\varepsilon_c[\text{AzoC}_{10}\text{N}^+]_{tot}(1 - X_t) \quad \text{Equation 3.1}$$

where A_{tot} is the absorbance measured at 350 nm at a time t , l is the length of the cell, ε_t and ε_c are the absorptivity coefficient of the *trans* and the *cis* forms respectively, $[\text{AzoC}_{10}\text{N}^+]_{tot}$ is the total concentration of $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ and X_t is the molar fraction of $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ in its *trans* form. Because X_t is considered equal to 1 at $t = 0$ and to 0 at $t = \infty$, this equation can be re-written as :

$$A_{tot} = A_0 [F + X_t (1 - F)] \quad \text{Equation 3.2}$$

where A_0 is the absorbance measured at 350 nm at $t = 0$, $F = \frac{\varepsilon_c}{\varepsilon_t} = \frac{A_\infty}{A_0}$ and A_∞ is the absorbance measured at 350 nm at $t = \infty$. The percentage of $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ in *trans* form is given by X_t .

For each batch, experiments were made in 2 or 3 replicates. The percentages and the uncertainties reported here are the average values and the standard errors respectively.

Isomerization kinetics were fitted (according to eq. 3.3 for *trans* to *cis* isomerization or eq. 3.4 for *cis* to *trans* isomerization) in order to obtain the half-reaction time, $t_{1/2}$, which is the time needed to reach 50 % of *trans* form.

$$AzoC_{10}N^+_{trans} = AzoC_{10}N^{+0}_{trans} \cdot e^{-kt} \quad \text{Equation 3.3}$$

$$AzoC_{10}N^+_{trans} = AzoC_{10}N^{+\infty}_{trans} \cdot (1 - e^{-kt}) + AzoC_{10}N^{+0}_{trans} \cdot e^{-kt} \quad \text{Equation 3.4}$$

where $AzoC_{10}N^+_{trans}$ is the percentage of $AzoC_{10}N^+$ in *trans* form, $AzoC_{10}N^{+0}_{trans}$ is the percentage of $AzoC_{10}N^+$ in *trans* form at $t = 0$, $AzoC_{10}N^{+\infty}_{trans}$ is the percentage of $AzoC_{10}N^+$ in *trans* form at $t = \infty$, k is the isomerization rate of the considered isomerization process and t is the time.

Fluorescence measurements were carried out using a PTI fluorimeter. Lipid suspensions were diluted in order to obtain ~ 0.07 mM of lipid concentrations. For calcein fluorescence, excitation and emission bandwidths were set to 1 to 1.6 nm respectively. The percentage of release was calculated according to :

$$\% \text{ of release} = 100 - \left(\frac{((I_T - I_F)/I_T)}{((I_{T,0} - I_{b,0})/I_{T,0})} \right) \times 100 \quad \text{Equation 3.5}$$

$I_{b,0}$ and $I_{T,0}$ are the fluorescence intensities obtained at the beginning of experiments before and after the addition of Triton X-100 respectively. Triton leads to the complete release of the probe. I_F and I_T are the fluorescence obtained during experiments, before and after addition of Triton. For each batch, experiments were made in triplicates. The percentages and the incertitudes reported here correspond to the average values and the standard errors of the triplicates.

Proportions of Azo and Schol were assessed by ^1H NMR. 1 mL of each $AzoC_{10}N^+$ /Schol batches used for UV-Vis experiments was lyophilised overnight. Then, each sample was diluted in 200 μL of $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ mixtures (2/1 vol/vol). The spectra

were acquired on a 500 MHz spectrometer. For each samples, 1024 scans were performed. ^1H NMR spectra of pure $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ was recorded by Qian Zhang.²⁷ The attribution of the peaks was :

^1H NMR (CDCl_3 , ppm) : $\delta = 7.9$ (m, 4H, Ar-N=), 7.6-7.4 (m, 3H, Ar-N=N-), 7.1-7.0 (m, 2H, Ar-O), 4.1 (t, 2H, $J=6.5$ Hz, OCH_2), 3.5 (q, 6H, $J=7.3$ Hz, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.3 (t, 2H, $J=8.1$ Hz, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.8 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.7 (m, 4H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$ and $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.6-1.3 (m, 19H, $\text{CH}_2\text{-(CH}_2)_5\text{-CH}_2$ and $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_3$).

For pure Schol, 128 scans were used to record ^1H NMR spectra and the attribution of the peaks was :

^1H NMR (CD_3OD) : $\delta = 5.4$ ($\text{HC}=\text{}$, 1H, m), ~ 4.9 (HC-O , 1H), 2.6-2.5 ($\text{OCCH}_2\text{C}=\text{}$, 2H, 2dd), 2.1-1.8 ($\text{H}_2\text{CC}=\text{}$ and H_2CCO , 3H, m), 1.7-1.0 (26H, m), 1.0 ($\text{H}_3\text{C-alkyl}$, 3H, d), 0.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$, 6H, dd), 0.7 ($\text{H}_3\text{CC-alkyl}$, 3H, s).

Size measurements were performed on a Coulter N4 Plus quasi-elastic light-scattering apparatus coupled with a Malvern autocorrelator (BeckmanCoulter, Fullerton, CA) at 25 °C. The lipid concentration was adjusted to approximately 20 μM for the measurements.

3.4 Results and Discussion

The isomerization behaviour of free $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ and bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ is presented in fig. 3.2. Before any irradiation, the UV-Vis spectrum of free $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ solubilised in CHCl_3 showed 2 maxima at 348 and 440 nm (fig. 3.2A). The most intense absorption band observed at 348 nm corresponds to the Azo *trans*-form. This band is associated with the $\pi \rightarrow \pi^*$ transition.^{28,29} The weakest band observed at 440 nm corresponds to the $n \rightarrow \pi^*$ transition of the *trans* form.³⁰⁻³² When a 350-nm irradiation is applied, the

intensity of the band at 348 nm decreased, whereas the intensity of the 2 weak bands at 315 and 440 nm increased ; these 2 bands correspond respectively to the $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$ transitions of the *cis* isomer.¹⁶ For the bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ (fig. 3.2B), a similar pattern was observed. The band characteristic of the *trans* form was blue-shifted to 330 nm whereas the bands characteristic of the *cis* form were observed at 300 and 440 nm. The blue-shift observed for the $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions is usually associated with a parallel stacking of the Azo moieties when they are sufficiently close to each other.^{16,18,29} This is consistent with a lamellar-type packing²⁹ of the Azo moieties when $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ amphiphiles are inserted in the bilayer.

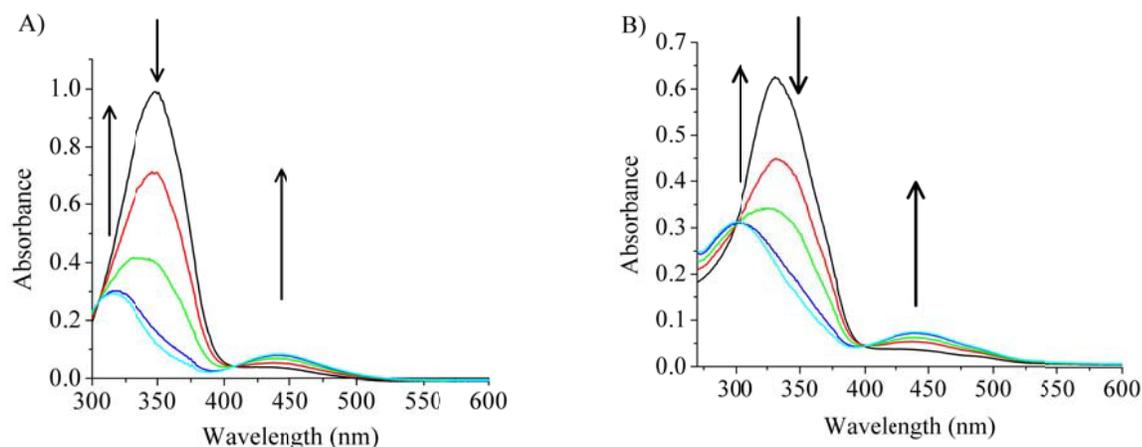


Figure 3.2 : UV-Vis spectra of $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$. Black line are the spectra obtained at $t = 0$ (before irradiation). Turquoise line are the spectra obtained at $t = \infty$ (at the end of the irradiation process). Arrows showed the direction of the intensity changes upon the irradiation at 350 nm. A) $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ in the free form. B) $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ inserted in the bilayer.

Isomerization was performed by irradiating at 350 nm in order to induce a *trans* to *cis* isomerization whereas irradiation at 450 nm induced *cis* to *trans* isomerization (fig. 3.3A). The irradiation at 350 nm was twice more effective at isomerizing the bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ compared to 330 nm. This is likely associated with the fact that this wavelength is further away from the *cis*-form-absorption band located at 300 nm and related to *cis-trans* isomerisation (fig. 3.2B). Irradiation at 450 nm was chosen instead of

440 nm in order to increase the difference between the 2 irradiation wavelengths. The kinetics of isomerization are presented in Fig. 3.3. The curves were fitted and the corresponding $t_{1/2}$ s are presented in table 3.1. For the first 350 nm-irradiation of both free and bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ (fig. 3.3A), the percentage of *trans* $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ dropped from 100 to 0 % in less than 3 min and 5 min respectively. The $t_{1/2}$ calculated of *trans* to *cis* isomerizations were longer in the case of bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ compared to free $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ (0.66 ± 0.02 min compared to 0.45 ± 0.02 min respectively). This is likely related to the free volume accessible to $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ when inserted in the bilayer which is expected to be lower than that of the free form. However, it is not excluded that the lesser absorption of bilayer-inserted- $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ at 350 nm also contributes to the lower *trans-cis* isomerization rate.

Table 3.1 : Values of $t_{1/2}$ calculated for *trans* to *cis* and *cis* to *trans* isomerizations and for the thermal relaxation of free and bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$.

	Free $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$	$\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ /Schol Batch 1
<i>Trans</i> to <i>cis</i> (min)	0.45 ± 0.02	0.66 ± 0.02
<i>Cis</i> to <i>trans</i> (min)	2.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1
Thermal relaxation (days)	2.3 ± 0.1	1.5 ± 0.1

For the reverse process (the *cis-trans* isomerization induced by irradiation at 450 nm) (fig. 3.3B), a photostationary state was reached after ~ 9 min and 70 % of the initial *trans* $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ content was observed in the case of free $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$. In the case of bilayer-

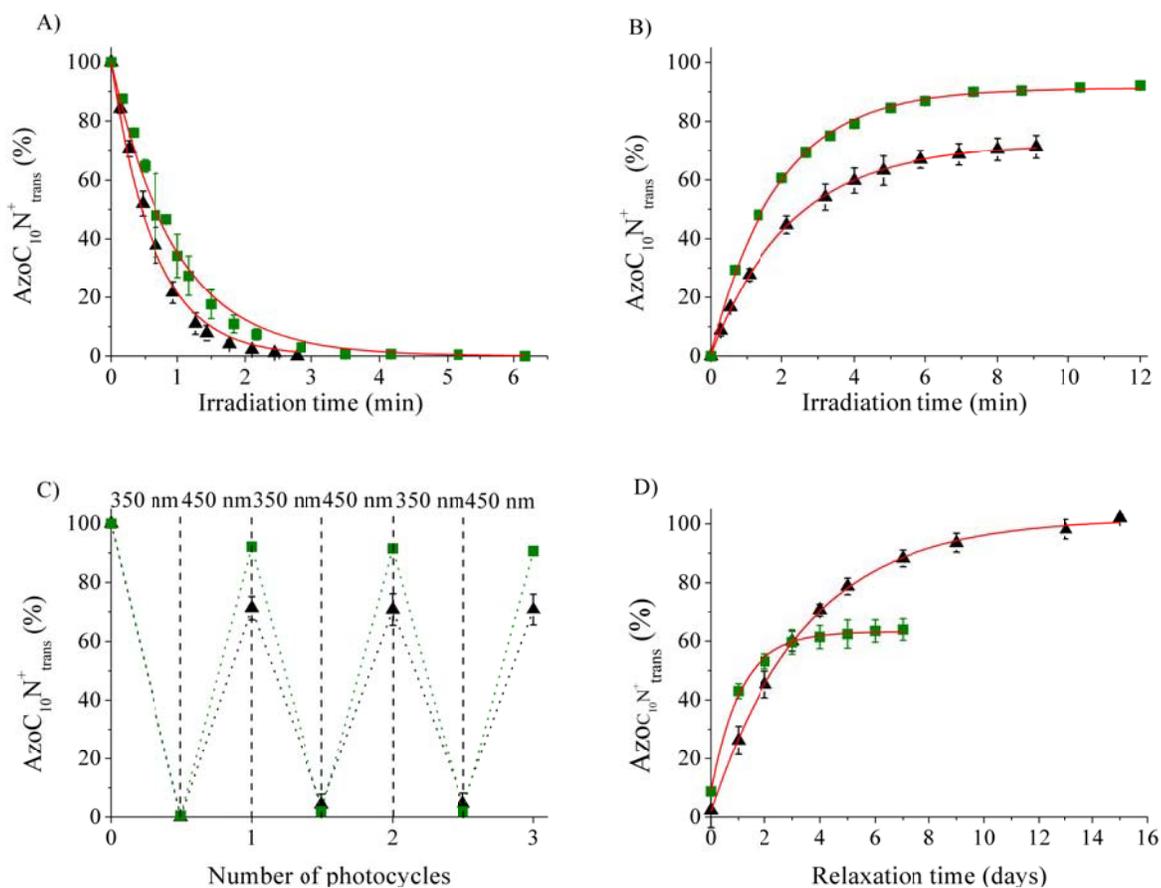


Figure 3.3 : Kinetics of the isomerization of free $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ (▲) and bilayer-inserted- $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ (batch 1) (■). Red lines (□) are the fitted curves. A) Irradiation at 350 nm to induce the *trans-cis* isomerization. B) Irradiation at 450 nm to induce the *cis-trans* isomerization. C) 350-450-nm photo-cyclization. D) Thermal relaxation after an 350-nm irradiation.

inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$, the photostationary state was achieved in 9 min and the maximum proportion of photoinduced *trans* $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ was around 90 %. The *cis* to *trans* isomerization was faster for bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ compared to the free form ($t_{1/2} = 1.5 \pm 0.1$ and 2.6 ± 0.1 min respectively). This increase in isomerization rate could be due to the fact that Azo moiety is surrounded by molecules when inserted in the bilayer compared to the free form. To a thermodynamic point of view, its neighbouring could favour the relaxation of the *cis* form because Schol has the ability to order chains and to enhance the chain packing. It is likely that Schol are more accommodated with the *trans* form than with the *cis* form. To a kinetic point of view, the insertion of $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ in the bilayer could modify the energy levels of the *trans* and *cis* forms. This change could lead to a lower activation energy E_a when inserted in the bilayer compared to the free form. For both free $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ and bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$, the isomerization process was not completely reversible.^{28,33} This is likely due to the proximity and the width of the 2 absorption bands associated to each form : both forms can absorb at 350 nm or 450 nm. As a consequence, there could be a steady-state exchange between the 2 isomers. In the photostationary state obtained after the second irradiation at 450 nm, the *cis-trans* isomerization was more complete for bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ compared to free $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$. This is correlated with the *trans*-form band at 330 nm for the $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ inserted in the bilayer, whereas it absorbs at 350 nm for the free form. Thus, in bilayers, the band maxima of each isomer are more separated and the *cis-trans* isomerization performed at 450 nm was more effective in the case of bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$.

Fig. 3.3C shows a multi-isomerization of $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$. For free $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$, the sample was irradiated during 3 min at 350 nm, the proportion of *trans* form was measured, the reverse process was achieved by a 10-min irradiation at 450 nm, and then, the proportion of *trans* form was measured again. This cycle was repeated 3 times. A similar cycling protocole was used for bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ except that the illumination at 350 nm was 5 min. For both systems, the cycling led to practically no change in the shape of the UV-Vis spectra and in the percentage of *trans* $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$. This means that the photoisomerization is reversible and that no photodegradation of $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ occurred during

3 cyclisations. Such a reversibility was observed for a monoalkylated Azo derivative inserted in a dihexadecyl phosphate (DHP) matrix after 10 cyclisations.²⁵ Moreover, our results indicate that the illumination by several consecutive short periods (for example, 11 periods of a few seconds for the photoisomerization in fig. 3.3A) led to the very similar result than a continuous illumination (for example, 3 min in fig. 3.3C). This is associated with a slow thermal relaxation as described below.

Fig. 3.3D shows the thermal relaxation when the samples are kept in the dark. Contrary to *cis-trans* photo-isomerization, 100 % of *trans* AzoC₁₀N⁺ was recovered after 14 days for free AzoC₁₀N⁺. For bilayer-inserted AzoC₁₀N⁺, after 7 days, 63 % of AzoC₁₀N⁺ was recovered. These results showed that after formation of the *cis* AzoC₁₀N⁺ by an 350 nm-irradiation, the *cis* form of AzoC₁₀N⁺ remains stable for several hours. The relaxation was faster for bilayer-inserted AzoC₁₀N⁺ compared to the free form : $t_{1/2}$ were equal to 1.5 ± 0.1 and 2.3 ± 0.1 days respectively. This observation is similar to that made for the *cis-trans* photoisomerization.

The isomerization kinetics were determined for 3 batches of AzoC₁₀N⁺/Schol (fig. 3.4, including the one presented in fig. 3.3). The calculated $t_{1/2}$ values are given in table 3.2. Initially, UV-Vis spectra of the 3 batches showed no difference (data not shown). The *trans* to *cis* photoisomerization (fig. 3.4A) led to a *trans* AzoC₁₀N⁺ content of 0 %, for the 3 batches. The isomerization rate of batches 2 and 3 were identical but differed from batch 1 : the $t_{1/2}$ for these batches were equal to 1.4 ± 0.1 and 1.3 ± 0.1 min for batches 2 and 3 respectively compared to 0.66 ± 0.02 min for batch 1.

For the reverse process, i. e. *cis* to *trans* photoisomerization (fig. 3.4B), the kinetics were identical for batches 2 and 3 (15 min to reach the plateau and $t_{1/2} = 2.3 \pm 0.1$ min) but slower than that of batch 1 (10 min to reach the maximum of *trans* content value and $t_{1/2} = 1.5 \pm 0.1$ min). The extent of AzoC₁₀N⁺ isomerization at the end of the process was however identical for the 3 batches (90 %).

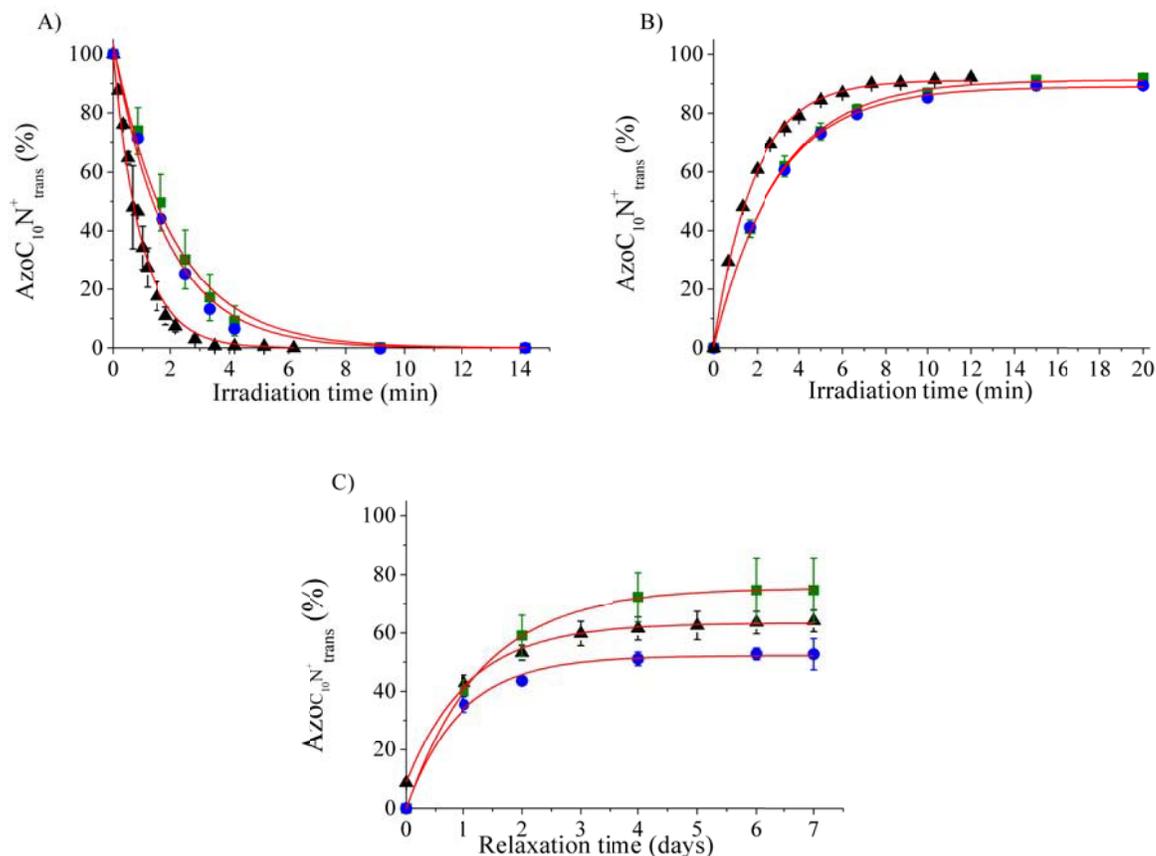


Figure 3.4 : Isomerization behaviour of the 3 batches of AzoC₁₀N⁺/Schol mixtures. Batch 1 (▲); Batch 2 (■); Batch 3 (●); Red lines (□) are the fitted curves calculated according to Eq. 3.3 for *trans-cis* isomerization and to Eq. 3.4 for *cis-trans* isomerization. A) *Trans* to *cis* isomerization induced by 350-nm irradiation. B) *Cis* to *trans* isomerization induced by 450-nm irradiation. C) Thermal relaxation.

Table 3.2 : Values of $t_{1/2}$ calculated for the photo-isomerizations and for the thermal relaxation of 2 different batches of $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ inserted in $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+/\text{Schol}$ bilayers.

	Batch 1	Batch 2	Batch 3
<i>Trans</i> to <i>cis</i> (min)	0.66 ± 0.02	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1
<i>Cis</i> to <i>trans</i> (min)	1.5 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1
Thermal relaxation (days)	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	3.1 ± 0.2

Finally, the thermal relaxation behaviour was similar for the 3 batches. First, 7 days were needed to reach the maximum recovery of the *trans* form (fig. 3.4C). Second, the thermal relaxation allowed to recover 75 and 53 % of *trans* $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$ for batches 2 and 3 respectively compared to 63 % for batch 1 : the maximum of recovered *trans* form was similar. In conclusion for bilayer-inserted $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+$, it seems that batches 2 and 3 are able to isomerise as well as batch 1. The rate of isomerization seems to be identical for these 2 batches but is slowest than that of batch 1.

After studying the isomerization behaviour of bilayer-inserted Azo, release experiments were performed on Azo/Schol LUVs for each batch (fig. 3.5). For batch 1 (fig. 3.5A), the first 50-s irradiation at 350 nm induced no release of the probe. After this time lag, a release was observed and reached a plateau at 40 % after 200 s. For batches 2 and 3, very limited release was induced by light. After 500 s, less than 5 % of the content had leaked out. According to fig. 3.4A, 500 s is sufficient to induce complete isomerization. In order to validate that this release is correlated to the isomerization process, the passive release of each batch kept in the dark was measured. Less than 10 % of release was observed after at least one month (fig. 3.5B). This indicates, first, that the $\text{AzoC}_{10}\text{N}^+/\text{Schol}$ LUVs are very stable from an encapsulation point of view and, second, the release observed upon illumination is indeed photo-triggered. PA/Schol LUVs were used as additional control. The 350-nm-irradiation of PA/Schol did not lead to significant release (fig. 3.5A). It rules out, for example, the possibility that calcein weakly absorbs the radiation to cause

an internal thermal increase that could lead to a release. Hence, the release observed in the case of AzoC₁₀N⁺/Schol LUVs is due to isomerization of inserted Azo.

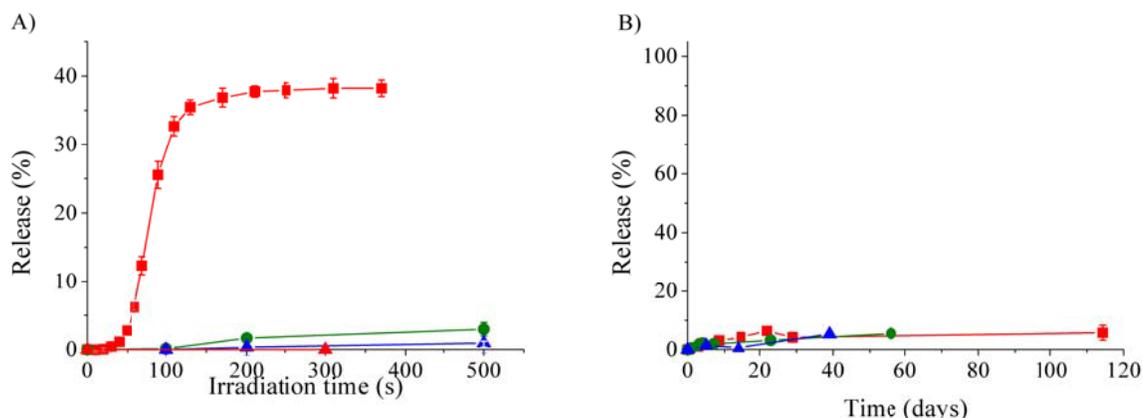


Figure 3.5 : Release behaviour of 3 batches of AzoC₁₀N⁺/Schol. AzoC₁₀N⁺/Schol batch 1 (■); AzoC₁₀N⁺/Schol batch 2 (●); AzoC₁₀N⁺/Schol batch 3 (▲); PA/Schol (◆). A) Photo-induced release by 350-nm irradiation. B) Passive release of AzoC₁₀N⁺/Schol batches.

Therefore, a clear difference in photo-sensitivity was observed between batches 1 and batches 2 and 3. However, some remarks have to be noted. First, for batch 1 release behaviour, it seems that a threshold level of isomerization is required in order to observe a leakage, as observed by Morgan *et al.* and Sato *et al.*^{17,19,20} Moreover, for batch 1, the time needed to achieve the release plateau (40 % after 200 s) corresponds to the time required to complete the *trans* to *cis* isomerization. And third, the release behaviour is somehow correlated with the isomerization process as batch 1 showed isomerization and release behaviours different from batches 2 and 3 that share the same isomerization and release behaviours.

QELS measurements were carried out on the 3 AzoC₁₀N⁺/Schol LUV batches (table 3.3). These systems were extruded through 100-nm pore size. Batch 1 included 2 populations of LUVs : one with a diameter around 60 ± 10 nm (63 ± 15 % of the total

population) and the other with a diameter around 438 ± 137 nm (35 ± 17 % of the total population). For batches 2 and 3, the LUV size was homogeneous, at around 137 nm. Therefore QELS measurements showed differences between batch 1 and batches 2 and 3.

Table 3.3 : AzoC₁₀N⁺/Schol LUV size measurements for the 3 batches.

	Batch 1		Batch 2	Batch 3
LUVs diameter (nm)	60 ± 10	438 ± 137	144 ± 9	130 ± 20
Proportion of each population (%)	63 ± 15	35 ± 17	100	100

In order to identify the origin of these discrepancies, ¹H NMR spectra were recorded in order to assess more precisely the relative compositions of the different batches (Fig. 3.6). Batch 1 showed a different composition compared to batches 2 and 3. Two regions of the ¹H NMR spectra of the mixtures were chosen to assess their chemical composition. From 5 to 6 ppm, the only peak observed was the one attributed to Schol peak at 5.4 ppm associated to 1 H (HC= near the sulfate group). The AzoC₁₀N⁺ aromatic protons were found in the region between 7 and 8 ppm; this region was free of Schol contribution. The two doublets at 7.9 and 7.0 ppm and the triplet at 7.5 ppm, representing 9 aromatic H, were integrated to infer the amount of AzoC₁₀N⁺. These AzoC₁₀N⁺/Schol integration ratios were equal to 1.44, 2.68 and 2.78 for batch 1, 2 and 3 respectively. Batches 2 and 3 had comparable integration ratios, whereas the integration ratio of batch 1 corresponded roughly to the half. This would mean that batch 1 was poorer in AzoC₁₀N⁺ than to the two other batches. From the proton assignment, the relative proportions of AzoC₁₀N⁺ and Schol in the bilayer could be calculated. The inferred composition was 14, 23 and 24 % of AzoC₁₀N⁺ for batches 1, 2 and 3 respectively. Due to the small quantity of AzoC₁₀N⁺ that was given, very small masses of AzoC₁₀N⁺ were weighed in order to prepare the mixtures. Combined to the big uncertainties due to the balance, it is probable that a smaller quantity of AzoC₁₀N⁺ has been weighed for batch 1. This difference in the percentage of inserted

AzoC₁₀N⁺ could explain the differences in the isomerization kinetics and release behaviour observed for the 3 batches. Additional experiments are required to identify the release behaviour as a function of the AzoC₁₀N⁺/Schol composition.

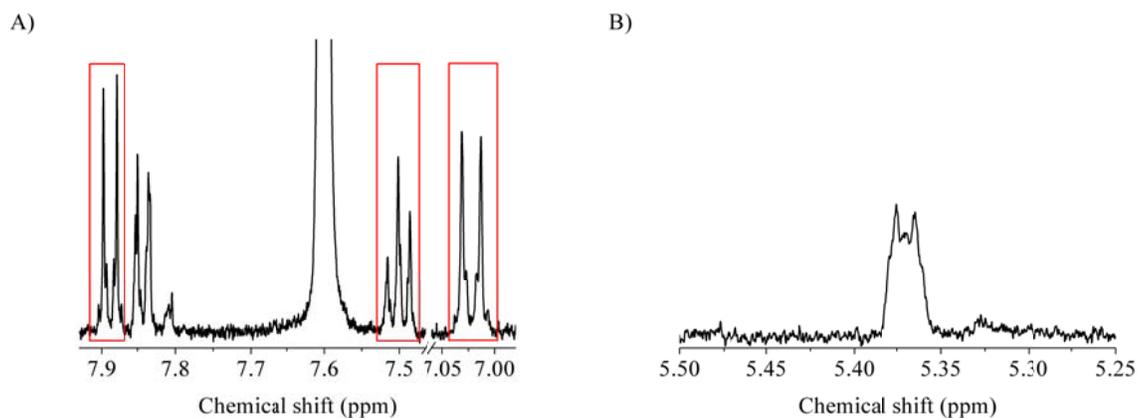


Figure 3.6 : ¹H NMR spectra of AzoC₁₀N⁺/Schol batch 3. A) AzoC₁₀N⁺ peaks. The red rectangles show the AzoC₁₀N⁺ peaks that were integrated. B) Schol peak.

3.5 Conclusion

In conclusion, we have shown that it is possible to form liposomes with a monoalkylated azobenzene derivative amphiphile and Schol, in a molar ratio of 20-30/80-70. This new formulation extends the chemical composition leading to these non-phospholipid liposomes as previously found in other studies.^{1-4,7,8} Particularly, this mixture was made in order to form photo-sensitive non-phospholipid LUVs. This Azo derivative can exist in 2 forms : *trans* form isomerisable to the *cis* form after irradiation at 350 nm (corresponding to the *trans* form absorption). The reverse process is also possible when irradiating at 450 nm (corresponding to the *cis* form absorption) or by thermal relaxation. Three batches were made. In each batch, AzoC₁₀N⁺ was able to isomerise and LUVs could be obtained by extrusion. However, LUVs formed from batch 1 were more photosensitive than batches 2 and 3. Thus, it is concluded that isomerization is not sufficient to explain the leakage behaviour. It has been shown previously for another liposomal formulation,¹⁵ that

the photo-isomerization of inserted dithienylethene, another photo-sensitive group, was not sufficient to induce the release of the content. This fact was related to the very different structure of their dithienylethene sensitive group compared to the lipid membrane structure : their dithienylethene was not alkylated. Thus, the authors suggested that defects created by the change in dithienylethene conformation due to isomerization were not sufficiently big (compared to the initial state) to perturb the membrane and induce a leakage. Even though our AzoC₁₀N⁺ isomerization should introduce a larger perturbation, photo-induced release was not systematically observed despite the systematic photo-isomerization. Using Bis-AzoPC (two adjacent azo groups on a given molecule) and PAzoPC (a single azo group per molecule) in phospholipid bilayers, Morgan *et al.* showed that the proximity of the azo groups has an influence on the release. For the same azo content, PAzoPC formulation did not photorelease its content, whereas the Bis-AzoPC formulation did. This was explained by the proximity of the *cis* Azo isomers in the Bis-AzoPC formulation which led to more effective defects. In our case, the most sensitive formulation is the one containing the least photo-sensitive material. Thus, in batch 1, the Azo moiety should be more isolated than in batches 2 and 3. It could be possible that the higher proportion of monoalkylated amphiphile in batches 2 and 3 led to a formulation that can better accommodate the defects created by the *cis* conformers, maybe due to a lesser dense chain packing. This hypothesis must be verified by additional experiments.

The formulations found in the literature were able to photo-release their content. Release levels depend on many factors like the use of a laser or a lamp, the power of the source,^{21,24} the time of irradiation,¹⁹ the number of successive irradiations,^{24,25} the temperature,^{21,24,25} the presence of Chol,^{21,24} the concentration of photo-sensitive elements in the membrane,^{21,24} etc. Thus it is hard to compare the performances of the different formulations. This being said, batch 1 could photorelease 40 % of its content in 5 min, using a lamp, at 25 °C. This is a good performance compared to those reported previously. Moreover, this formulation showed a passive release lower than that of the formulations in the literature, which are generally leakier. For example, other photosensitive liposomes have shown 10 % leakage over 20 h¹⁷ and between 10 and 30 % of release over

1.5 days.^{23,24} This last point is important for long industrial storage. Therefore, if this type of formulation can be reproduced in a controlled manner, it would be a good candidate for applications requiring photosensitive LUVs.

3.6 Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Qian Zhang and Pr. Géraldine Bazuin for their help and gift of $\text{AzOC}_{10}\text{N}^+$, and NMR personnel (C. Malveau and G. Beaudry-Dubois) for carrying out ^1H NMR experiments. T. Phoeung is grateful to Université de Montréal for her Scholarships (direct shift to Ph. D. and Charron-Lam). This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies through its financial support to the Center for Self-Assembled Chemical Structures (CSACS).

3.7 References

1. Bastiat, G.; Oliger, P.; Karlsson, G.; Edwards, K.; Lafleur, M. *Langmuir* **2007**, *23*, 7695.
2. Bastiat, G.; Lafleur, M. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 10929.
3. Cui, Z.-K.; Bastiat, G.; Jin, C.; Keyvanloo, A.; Lafleur, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 1144.
4. Cui, Z.-K.; Bastiat, G.; Lafleur, M. *Langmuir* **2010**, *26*, 12733.
5. Ramakrishnan, M.; Tarafdar, P. K.; Kamlekar, R. K.; Swamy, M. J. *Curr. Sci. India* **2007**, *93*, 234.
6. Gater, D. L.; Seddon, J. M.; Law, R. V. *Soft Matter* **2008**, *4*, 263.
7. Phoeung, T.; Aubron, P.; Rydzek, G.; Lafleur, M. *Langmuir* **2010**, *26*, 12769.

8. Phoeung, T.; Morfin Huber, L.; Lafleur, M. *Langmuir* **2009**, *25*, 5778.
9. Mueller, A.; Bondurant, B.; O'Brien, D. F. *Macromolecules* **2000**, *33*, 4799.
10. Bondurant, B.; Mueller, A.; O'Brien, D. F. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1511*, 113.
11. Khairutdinov, R. F.; Hurst, J. K. *Langmuir* **2001**, *17*, 6881.
12. Koçer, A.; Walko, M.; Meijberg, W.; Feringa, B. L. *Science* **2005**, *309*, 755.
13. Ohya, Y.; Okuyama, Y.; Fukunaga, A.; Ouchi, T. *Supramol. Sci.* **1998**, *5*, 21.
14. Khairutdinov, R. F.; Giertz, K.; Hurst, J. K.; Voloshina, E. N.; Voloshin, N. A.; Minkin, V. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12707.
15. Bai, Y.; Louis, K. M.; Murphy, R. S. *J. Photoch. Photobio. A* **2007**, *192*, 130.
16. Shimomura, M.; Kunitake, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5175.
17. Sato, T.; Kijima, M.; Shiga, Y.; Yonezawa, Y. *Langmuir* **1991**, *7*, 2330.
18. Shimomura, M.; Kunitake, T. *Chem. Lett.* **1981**, 1001.
19. Morgan, C. J.; Bisby, R. H.; Johnson, S. A.; Mitchell, A. C. *FEBS Letters* **1995**, *375*, 113.
20. Bisby, R. H.; Mead, C.; Mitchell, A. C.; Morgan, C. G. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **1999**, *262*, 406.
21. Bisby, R. H.; Mead, C.; Morgan, C. G. *FEBS Letters* **1999**, *463*, 165.
22. Bisby, R. H.; Mead, C.; Morgan, C. G. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *72*, 57.
23. Liu, X.-M.; Yang, B.; Wang, Y.-L.; Wang, J.-Y. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 2792.
24. Liu, X.-M.; Yang, B.; Wang, Y.-L.; Wang, J.-Y. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1720*, 28.
25. Lei, Y.; Hurst, J. K. *Langmuir* **1999**, *15*, 3424.
26. Chen, R. F.; Knutson, J. R. *Anal. Biochem.* **1988**, *172*, 61.
27. Zhang, Q. Chemistry Ph. D. degree, Université de Montréal, Montréal, **2010**.
28. Xue, X.; Zhu, J.; Zhang, W.; Zhang, Z.; Zhu, X. *Polymer* **2009**, *50*, 4512.

29. Zhang, Q.; Bazuin, C. G. *Macromolecules* **2009**, *42*, 4775.
30. Bandara, H. M. D.; Friss, T. R.; Enriquez, M. M.; Isley, W.; Incarvito, C.; Frank, H. A.; Jose, G.; Burdette, S. C. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4817.
31. Wang, A.; Li, Y.-Y.; Ru, J. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1463.
32. Diau, E. W.-G. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 950.
33. Qu, J.; Qiu, Z.; Chen, H.; Ogata, N.; Masuda, T. *Polymer* **2009**, *50*, 5398.

Chapitre 4

Cationic detergent/sterol mixtures can form fluid lamellar phases and stable unilamellar vesicles

Thida Phoeung, Liliana Morfin Huber, Michel Lafleur

Reproduced with permission from

Langmuir, **25** (10), 5778–5784, 2009

Copyright 2010 American Chemical Society

Keywords : cationic detergent, cholesterol, sterol, liposomes, ^2H -NMR, fluorescence, IR.

Abbreviated title : Cationic detergent/sterol mixtures

4.1 Abstract

In recent studies, it has been shown that mixtures of palmitic acid (PA), and cholesterol or cholesterol sulfate (Schol), in a PA/sterol molar ratio of 30/70, lead to the formation of liquid ordered (lo) lamellar phases. Extrusion of these systems gave large unilamellar vesicles (LUVs) that displayed a very limited passive permeability, a property associated with their high sterol content. In this study, we showed that the formation of lo phase bilayers was also possible when mixing a cationic detergent (cetylpyridinium chloride, CPC) and sterol, in a 30/70 molar ratio. The existence of this phase was established using IR and ^2H -NMR spectroscopies. Moreover, ^2H -NMR allowed us to study the orientations and dynamics of CPC and cholesterol in these self-assemblies. The extrusion of the CPC/Schol bilayers lead to the formation of LUVs and their passive permeability was found to be very limited, making them interesting candidates as nanovectors.

4.2 Introduction

It is well established that cholesterol (chol) affects profoundly the phase behavior of phospholipids (for review, see 1-3). More recently, it has been shown that cholesterol can induce the formation of fluid lamellar phases when mixed with palmitic acid (PA).⁴⁻⁶ Even though PA and cholesterol do not form a fluid lamellar phase once hydrated individually, they lead to the formation of bilayers in the liquid ordered (lo) phase when mixed together in a PA/chol molar ratio of 30/70. The formation of lo phase bilayers has been extrapolated to systems that include cholesterol sulfate (Schol).⁷ It has been shown that the stability of these bilayers is intimately associated to their surface charge density. In the case of the PA/chol system, the fluid bilayers are stable at $\text{pH} \geq 7.5$, when a significant proportion of PA molecules is unprotonated. Conversely, the PA/Schol system forms fluid bilayers only for $\text{pH} \leq 7$, when most of the PA molecules are protonated. The stability of the lo phase bilayers as a function of pH can be modulated by varying the proportion of cholesterol and Schol in PA/chol/Schol systems.⁷

It was also found that PA/chol and PA/Schol fluid bilayers could be extruded to form large unilamellar vesicles (LUVs) using conventional extrusion techniques.^{6,7} Compared to conventional liposomes made of phospholipids, the passive release of these systems was considerably improved. For example, most of the encapsulated material remained inside the PA/chol (30/70) LUVs after 40 days whereas only 20% of the content was still entrapped after 14 days in the case of POPC/chol (60/40) LUVs. This reduced permeability was associated to the high sterol content of these bilayers. Sterols are known to order the hydrophobic core of bilayers^{4,8-10} and, consequently, to reduce the permeability of the LUVs.^{11,12} The modulation of the bilayer stability by the pH has been exploited to create pH-sensitive LUVs. Because of the different pH stability of the bilayers including cholesterol and Schol, it was possible to modulate the effect of pH stimuli: the release of the content was triggered by a decrease of pH for LUVs prepared from PA/chol mixtures

whereas the release was triggered by high pH with PA/Schol LUVs. This behavior was related to the pH modulation of the protonation state of palmitic acid, and of the electrostatic interactions between palmitic acid and the sterol.⁷

The presence of cationic molecules in liposomes has been found advantageous in some applications related to vectorisation and delivery. For example, cationic lipids interact and complex with DNA or oligonucleotides, preventing nuclease degradation and enhancing cellular uptake.¹³⁻¹⁵ Liposomes containing cationic lipids were also shown to improve the stability of the formulation of some drugs, to improve the liposome uptake by some cancer cells, and to allow targeting tumor microvasculature endothelial cells.¹⁶⁻¹⁸ In the present paper, we examine the possibility to use a positively charged monoalkylated amphiphile to form fluid bilayers with large sterol contents. Cetylpyridinium chloride (CPC) ($T_m = 79\text{ }^\circ\text{C}$) is a cationic detergent that forms micelles in water.¹⁹ In conditions similar to those used in the present work, its critical micellar concentration (cmc) is $\sim 80\text{ }\mu\text{M}$.²⁰ This amphiphile was selected because it includes a positive charge that is stable over a wide range of pH and that the length of its alkyl chain matches with the hydrophobic section of cholesterol and Schol, a prerequisite that was shown to be essential for the formation of high sterol-content bilayers.²¹ In addition, it was shown that aromatic amino acids of transmembrane proteins are preferentially located at the membrane/water interface;^{22,23} similar interactions may favor the positioning of the pyridinium group at the interface of the putative l_o phase bilayers. First we characterized the phase behavior of mixtures prepared with CPC and sterol, using infrared and $^2\text{H-NMR}$ spectroscopy, in order to assess the possibility of forming l_o phase bilayers. Second we show the possibility to extrude the CPC/Schol system to form LUVs with unusually low passive permeability. The mixture examined in this study was composed of a CPC/sterol molar ratio of 30/70. This ratio was shown to correspond to an eutectic composition for PA/chol mixture, at pH 5.5⁴, and to lead to the formation of stable fluid bilayers for various PA/sterol systems^{4-7,21}. Therefore it was selected for the CPC/sterol system, anticipating an analogous behavior.

4.3 Materials and Methods

CPC (monohydrate), cholesterol (chol, > 99%), Schol (sodium salt), Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS, > 99.8%) and Triton X-100 (99%) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 99%) was obtained from Aldrich (St. Louis, MO). 2-[*N*-morpholino]ethanesulfonic acid (MES, > 99%) and NaCl (> 99%) were obtained from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ) and Anachemia (Montréal, QC, Canada), respectively. Calcein was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR), and *n*-cetylpyridinium bromide- d_5 deuterated on the polar head group (CPB- d_5 , 99.2 atom % D) was purchased from CDN isotopes (Pointe-Claire, QC, Canada). Cholesterol 2,2,4,4,6- d_5 (chol- d_5 , 95 atom % D) was purchased from Medical Isotopes Inc. (Pelham, NH) and was recrystallized twice in ethanol prior to its use.

CPC/chol and CPC/Schol (30/70, mol/mol) mixtures were obtained by mixing weighed amounts of each compound in a benzene/methanol solution (95/5 (v/v) for CPC/chol and 75/25 (v/v) for CPC/Schol). The samples were then freeze-dried for at least 16 h. A multilamellar vesicle (MLV) dispersion was obtained by hydrating the powder with a MES/TRIS buffer (see below for the exact composition). The suspension was subjected to five freeze-and-thaw cycles (from liquid nitrogen temperature to ~ 70 °C) and was vortexed between the cycles.

For the IR experiments, the buffer, prepared in deuterated water, included 50 mM TRIS and 50 mM MES, 10 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 5.5 or 7.4. The amphiphile (CPC + chol) concentration was about 250 mg/mL. An aliquot of the sample was placed between two BaF₂ windows separated by a 5- μ m thick Teflon ring and inserted in a brass sample holder. The temperature (from 10 to 70 °C, by 2 °C steps) was controlled using Peltier thermopumps. The IR spectra were recorded on a Thermo Nicolet 4700

spectrometer equipped with a KBr beam splitter and a DTGS-L-alanine detector. For each temperature, 40 scans were co-added to obtain a spectrum with a nominal resolution of 2 cm^{-1} . A 5-min incubation period was set prior to the acquisition of each spectrum in order to equilibrate the temperature. The reported band positions correspond to the centers of gravity calculated from the top 5% of the band.²⁴

For the ^2H -NMR experiments, the buffer, prepared in deuterium-depleted water, included 50 mM TRIS, 100 mM NaCl, and 1 mM EDTA, pH 7.4. The CPB-d₅ final concentration was about 30 mg/mL for the CPB-d₅/sterol systems whereas the chol-d₅ final concentration was 70 mg/mL for the CPC/chol-d₅ mixtures. After hydration, ~1 mL of the sample was transferred to a home-made Teflon holder. The spectra were recorded on a Bruker AV-400 spectrometer, using a Bruker static probe equipped with a 10 mm coil. A quadrupolar echo sequence was used with a pulse width of 4.5 μs and an interpulse delay of 26 μs . Typically 6 000 scans were coadded; in the case of solid CPB-d₅, 80 scans were sufficient to obtain a good signal-to-noise ratio since a large amount of solid deuterated material was used. For samples with a solid CPB-d₅ component, the intersequence delay was 18 min, its T_1 being estimated to 3.5 min. In the absence of a solid CPB-d₅ component, the intersequence delay was reduced to 500 ms because the T_1 of CPB-d₅ inserted in fluid bilayers was found to be 30 ms. For samples containing chol-d₅, the intersequence delay was 500 ms, corresponding to approximately 5 T_1 of the deuterated sterol in fluid bilayers.⁴ Initially an intersequence delay of 50 s was used to verify that the sample did not contain solid cholesterol. The temperature was controlled by a Bruker VT-3000 controller. The spectra were dePaked²⁵ and the calculated components representative of bilayers perpendicular to the magnetic field are presented.

Permeability measurements of the LUVs were carried out by fluorescence spectroscopy, using a method based on the self-quenching of calcein at high concentration.^{26,27} Calcein was dissolved, at a concentration of approximately 80 mM, in a buffer containing 50 mM Tris, 50 mM MES, 5 mM NaCl, and 0.5 mM EDTA, pH 7.4 or

5.5, referred to as the internal buffer. The CPC/sterol powder mixture was hydrated with this internal buffer to obtain MLVs, with an amphiphile concentration of ~20 mM. Large unilamellar vesicles (LUVs) were obtained, at room temperature, by classical extrusion (10 times through two stacked polycarbonate filters with a 100-nm pore size) using a handheld Liposofast extruder (Avestin Corp., Ottawa, ON, Canada). Calcein-containing LUVs were separated from free calcein, at room temperature, by gel permeation chromatography, using Sephadex G-50 medium gel (column diameter, 1.5 cm; length, 25 cm) equilibrated with an isosmotic buffer composed of 50 mM Tris, 50 mM MES, 130 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, pH 7.4 or 5.5, referred to as the external buffer. The collected calcein-loaded LUVs were diluted with the external buffer whose pH was adjusted at the desired value (the investigated pH range was between 5.5 and 9), in order to obtain a final amphiphile concentration of about 20 μ M. This dilution defined the time equal to 0. It was assumed that there was no release of the probe at this point, a hypothesis largely confirmed by the high self-quenching factors (≥ 70 %).²⁶ The variations of the proportion of calcein entrapped in the LUVs, as a function of time were determined according to an established protocol.^{6,7} Briefly, immediately after the final dilution, the calcein fluorescence was measured on a 1.5-mL aliquot before ($I_{i,pH}$), and after ($I_{i+T,pH}$) the addition of Triton X-100 (10 μ L, 10% v/v). The addition of Triton X-100 detergent led to the complete release of the loaded calcein and the resulting fluorescence intensity was used to normalize the subsequent measurements. After a time t , the fluorescence intensity of another aliquot of the diluted LUVs was measured before ($I_{f,pH}$), and after ($I_{f+T,pH}$) the addition of Triton X-100. The percentage of encapsulation was calculated using:

$$\% \text{ of encapsulated probe} = \left(\frac{(I_{f+T,pH} - I_{f,pH}) \cdot I_{i+T,pH}}{(I_{i+T,pH} - I_{i,pH}) \cdot I_{f+T,pH}} \right) \times 100 \quad (4.1)$$

The fluorescence intensities were recorded using a SPEX Fluorolog spectrofluorometer ($\lambda_{exc} = 490$ nm; $\lambda_{em} = 513$ nm).

The hydrodynamic diameters of the LUVs were measured at 25 °C using a Coulter N4 Plus quasi-elastic light-scattering apparatus coupled with a Malvern autocorrelator (BeckmanCoulter, Fullerton, CA). The lipid concentration was adjusted to approximately 20 μM for the measurements.

4.4 Results and discussion

First, the alkyl chain order of CPC was assessed using IR spectroscopy. The position of the symmetric C-H stretching mode of methylene groups (ν_{CH_2}) was shown to be sensitive to the chain conformational order and to the interchain coupling^{28,29} and therefore is a useful probe to characterize lipid phases. The ν_{CH_2} variations as a function of temperature for CPC micelles and CPC/sterol suspensions are shown in Figure 4.1. The ν_{CH_2} position of CPC micelles was observed at $\sim 2854 \text{ cm}^{-1}$, over the entire range of studied temperature. This value was indicative of disordered hydrocarbon chains and consistent with the micellar phase. For example, the ν_{CH_2} position of CPC and cetyltrimethylammonium sulfate micelles was 2854 ,¹⁹ and 2853 ³⁰ cm^{-1} respectively. In the CPC/sterol 30/70 mixtures, the ν_{CH_2} band was observed between 2851 and 2852 cm^{-1} over the investigated temperature range (10 - 70 °C). Such position has been observed for cholesterol-containing bilayers in the l_o phase prepared from fatty acids,^{4,7,21} and from phospholipids.^{28,31,32} The fairly temperature-independent position suggested the absence of phase transition in these 2 systems.

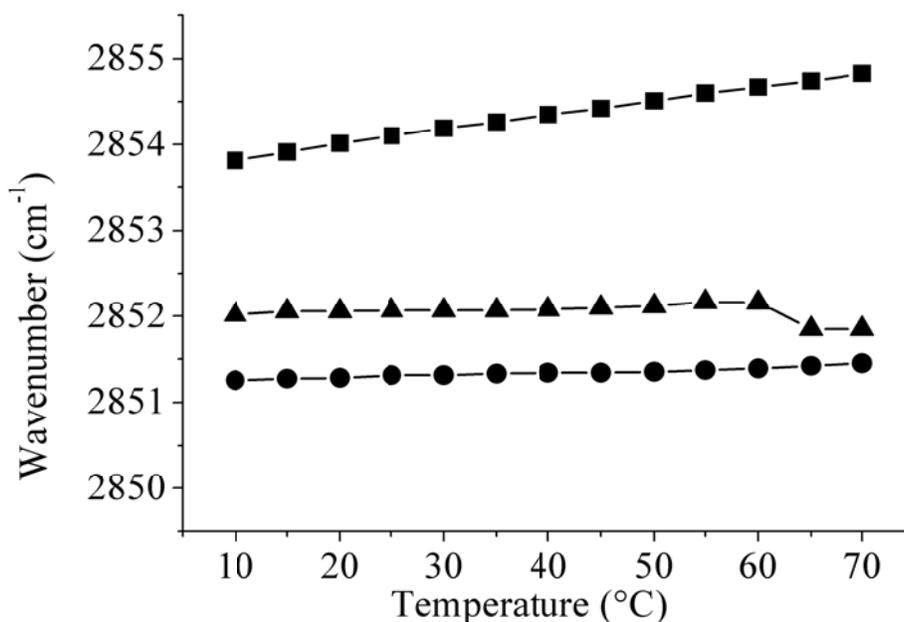


Figure 4.1 : Influence of the sterol on the CPC alkyl chains as probed by the ν_{CH_2} position: CPC in buffer (■), CPC/chol (▲) and CPC/Schol suspension (●), pH 7.4.

Figure 4.2 shows the ^2H -NMR spectra of solid CPB- d_5 , CPB- d_5 micelles, and of a CPB- d_5 /sterol (30/70) mixture, recorded at 25 °C, pH 7.4. The spectrum of solid CPB- d_5 was typical for a randomly-oriented solid sample giving rise to a single powder pattern with a quadrupolar splitting measured between the 2 maxima ($\Delta\nu_Q^m$) of 130 kHz. All the 5 deuterated positions led to identical powder patterns with maximum quadrupolar splittings associated to static molecules.³³⁻³⁶ The spectrum of CPB- d_5 micelles was a single narrow peak, typical of an isotropic phase and consistent with the fast tumbling of micelles on the NMR time scale. When mixed with sterol, the shape of the CPB- d_5 spectrum changed radically.

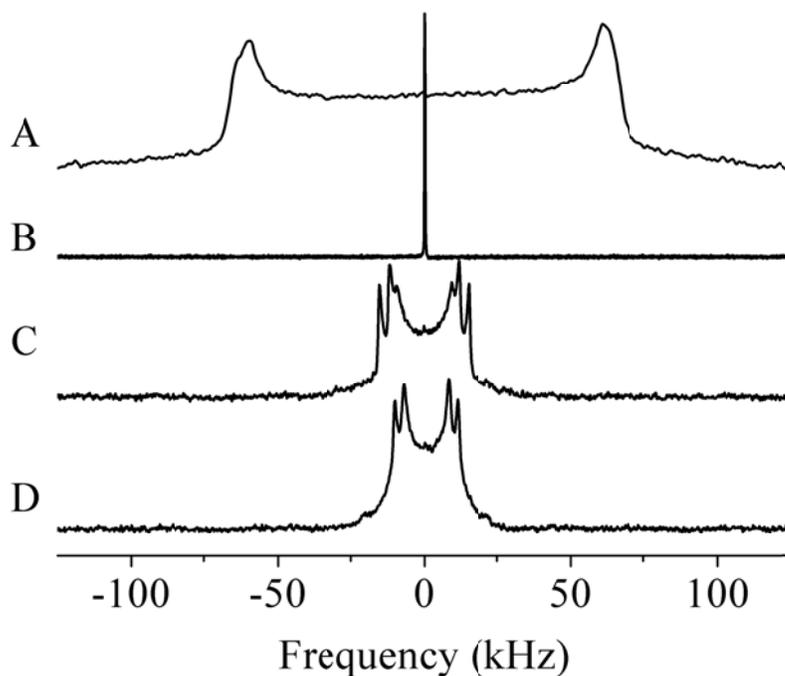


Figure 4.2 : ^2H -NMR spectrum of (A) solid CPB- d_5 , (B) CPB- d_5 micelles, (C) CPB- d_5 /Schol (30/70) and (D) CPB- d_5 /chol (30/70) suspensions, at 25 °C, pH 7.4.

The spectra of CPB- d_5 /Schol mixtures gave rise to 3 superimposed powder patterns with $\Delta\nu_{\text{Q}}^{\text{m}}$ of 30, 24, and 19 kHz (Table 4.1); these contributions can be clearly seen on the dePaked spectrum, showing 3 relatively well resolved doublets (Figure 4.3). The relative deuterium nucleus number contributing to these 3 doublets corresponded, on the basis of their relative areas, to 2, 2, and 1 respectively. In the spectra of the CPB- d_5 /chol mixture at 25 °C, 2 superimposed powder patterns with $\Delta\nu_{\text{Q}}^{\text{m}}$ of 22, and 17 kHz were observed. The doublet integration on the dePaked spectra indicated a relative contribution of 3, and 2, respectively. These spectra indicated that, in the presence of sterol, the pyridinium cycle of CPC experienced motions that led to the partial averaging of the quadrupolar interactions associated to the deuterium nuclei. These motions displayed an axial symmetry. Therefore we can conclude that the CPB- d_5 molecules

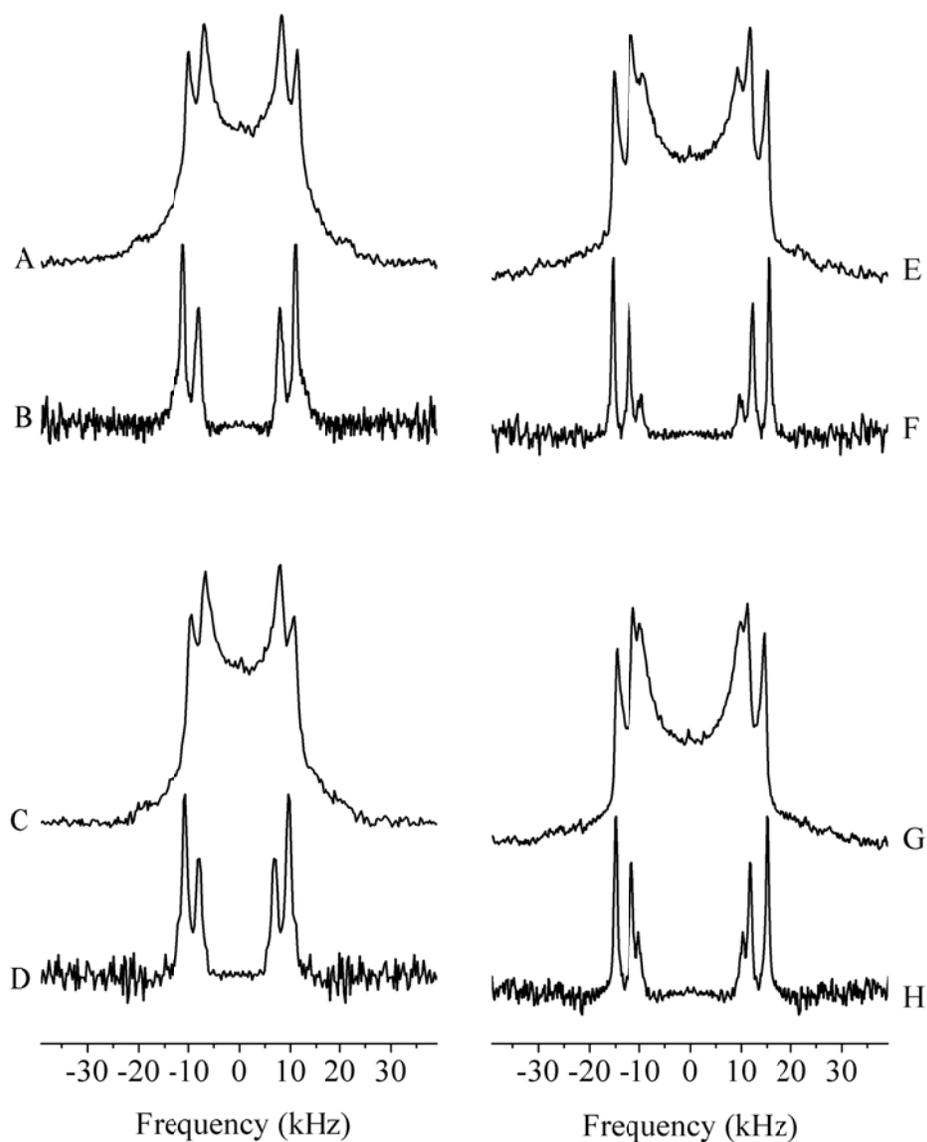


Figure 4.3 : ^2H -NMR spectrum and the corresponding dePaked spectrum of the CPB- d_5 /chol (30/70) suspension at 25 (A and B) and 55 °C (C and D) and CPB- d_5 /Schol (30/70) suspension at 25 (E and F) and 55 °C (G and H).

were solubilized in a novel lamellar phase formed by cetylpyridinium, and cholesterol. It should also be pointed out that the spectra indicated that all the CPB-d₅ molecules were solubilised in these bilayers as no signal characteristic of solid or micellar CPB-d₅ was observed.

Table 4.1 : $\Delta\nu_Q^m$ observed for various systems including CPB-d₅.

		Solid CPB-d ₅	CPB-d ₅ /chol (30/70)	CPB-d ₅ /Schol (30/70)
$\Delta\nu_Q^m$ (kHz)	25 °C	130.0	21.8 (3)*	30.9 (2)
			17.5 (2)	24.3 (2)
	55 °C			19.2 (1)
				29.8 (2)
			20.8 (3)	23.2 (2)
			15.1 (2)	20.3 (1)

* Relative areas determined on the dePaked spectra.

²H-NMR spectra of the CPC/chol-d₅ (30/70) system were also recorded (Figure 4.4). They were composed of 4 superimposed powder patterns with $\Delta\nu_Q^m$ of 50, 46, 34, and 4 kHz, with relative areas of 1:1:2:1 respectively, as measured on the dePaked spectra (Table 4.2). These values were in fact similar to those previously obtained for chol-d₅ inserted in PA/chol bilayers,⁴ DMPC/chol bilayers,^{34,37} red blood cell plasmic membranes,³⁸ model mixtures mimicking stratum corneum lipid lamellar phases,³³ and in *Acholeplasma laidlawii* membranes,³⁹ all these systems existing in a lo phase. These results reinforced the hypothesis of the formation of a lamellar lo phase by cholesterol, and CPC. Moreover the fact that no solid cholesterol was detected in the spectra indicated that cholesterol was completely solubilised in this phase when the chol/CPC proportions were 70/30.

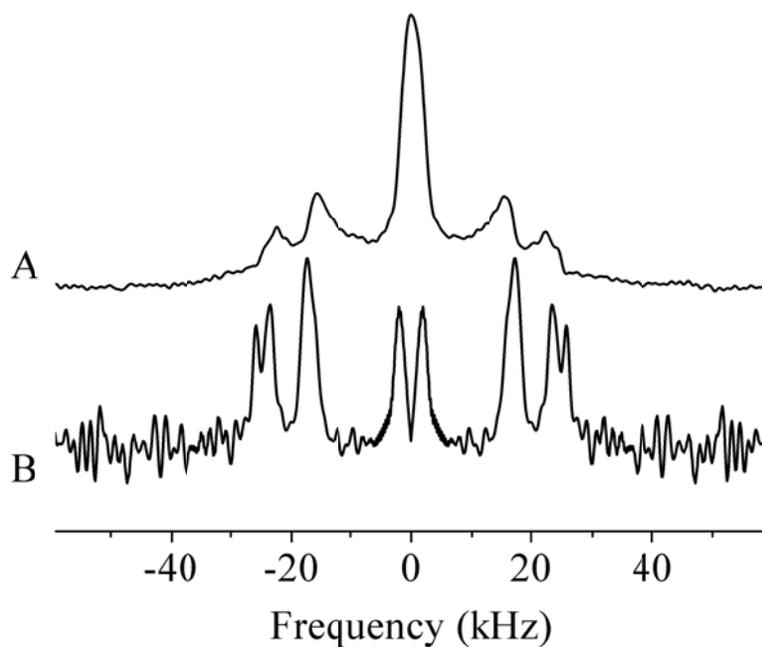


Figure 4.4 : ^2H -NMR spectrum of CPC/chol- d_5 (30/70) suspension (A) and its dePaked spectrum (B), pH 7.4, 25 °C.

Table 4.2 : ^2H -NMR parameters associated to cholesterol in CPC/chol- d_5 (30/70) mixtures, 25 °C.

Deuterated position	Experimental $\Delta\nu_{\text{Q}}^{\text{m}}$ (kHz)	θ obtained from ³⁷	Calculated S_{mol}	Calculated $\Delta\nu_{\text{Q}}^{\text{m}}$ (kHz)
2 or 4- ^2H ax	50.3 (1)*	74.1	0.90	50.6
2 or 4- ^2H ax	46.4 (1)	74.1		50.6
2,4- $^2\text{H}_2$ eq	34.3 (2)	66.2		33.4
6- ^2H	3.7 (1)	55.8		3.4

* Relative areas obtained from the dePaked spectrum.

The $\Delta\nu_Q$ values contain information about the orientation and the dynamics of the deuterated moiety in the fluid bilayers. Powder patterns typical of axially symmetric systems^{35,36} were observed, indicating that the motions partially averaging the quadrupolar interactions were associated to a symmetry axis. The magnitude of $\Delta\nu_Q$ is associated to:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} A_Q \left\langle \frac{3 \cos^2 \chi - 1}{2} \right\rangle \quad (4.2)$$

where A_Q is the static quadrupolar constant, and χ , the angle between the magnetic field and the C-D bond, at the origin of the electric field gradient.^{35,36} In the case of aromatic C-D bonds, A_Q was estimated to 193 kHz.³⁵ The brackets indicate that the term is averaged over the time scale of the measurement. Equation 4.2 describes the spectrum of solid CPB-d₅ where $\chi = 0^\circ$ led to the largest splitting, and $\chi = 90^\circ$, the most probable orientation, to the most intense. It is possible to propose a model describing the orientation and the dynamics of the labelled groups in the bilayers. Because the spectra showed a partial averaging of the quadrupolar interactions and that they were typical of axially symmetric systems, it was proposed that cholesterol, in the case of chol-d₅, or the pyridinium cycle, in the case of CPB-d₅, experienced a fast rotation, on the ²H-NMR time scale, around a rotation axis, \hat{r} . Equation 4.2 can be expressed by:^{35,40}

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} A_Q \left| \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right| \left\langle \frac{3 \cos^{-1} \alpha - 1}{2} \right\rangle \left\langle \frac{3 \cos^{-1} \phi - 1}{2} \right\rangle \quad (4.3)$$

where θ is the angle between the magnetic field and the mean direction of \hat{r} , α , the angle associated to the instantaneous fluctuations of \hat{r} from its mean direction, and Φ , the angle between the instantaneous orientation of \hat{r} , and the considered C-D bond (Figure 4.5). The reported $\Delta\nu_Q^m$ correspond to $\theta = 90^\circ$. The term including α defines the fluctuations relative to the \hat{r} involving the whole moiety and is referred to as the molecular order parameter, S_{mol} . The term including Φ determines the orientational order parameter, S_{C-D} of the various deuterated positions. Equation 4.3 can be then rewritten:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} A_Q S_{mol} S_{C-D} \quad (4.4)$$

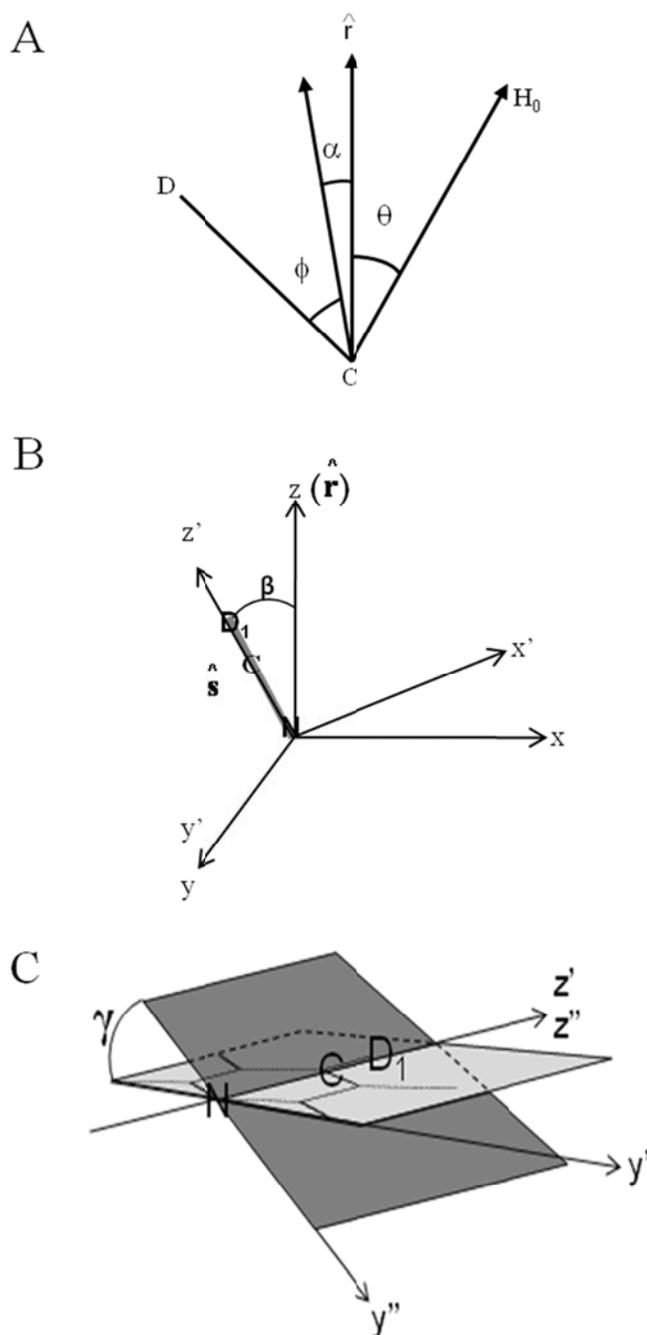


Figure 4.5 : Schematic representation of the different angles associated to the motions leading to the averaging of the quadrupolar interactions. Definition of Φ , α and θ (A). Rotation around the y axis defining β (B), subsequently around \hat{s} , defining γ (C). Initially, the pyridinium cycle is located in the (y,z) plane.

The $\Delta\nu_Q^m$ values obtained for CPC/chol-d₅ mixtures were reproduced, taking into account the fast rotation of cholesterol along its long axis, as described previously.^{34,37} The labelled C-D groups on cholesterol were located on the steroid rigid cycle network. As consequence, S_{C-D} was essentially associated to the orientation of the C-D bond relative to \hat{r} and no intramolecular fluctuations were considered. In a previous study,³⁷ the orientation of the cholesterol axis of rotation was determined to reproduce the experimental values of $\Delta\nu_Q^m$. It was then found that this axis corresponded to the long axis of cholesterol. In addition, this axis was practically parallel to the bilayer normal and the calculated S_{mol} was close to 1. This value also indicated that there was very little molecular wobbling of cholesterol in the fluid bilayers. The θ values previously identified for the DMPC/chol-d₆ (70/30) system³⁷ are reproduced in Table 4.2. This model was also appropriate to reproduce the $\Delta\nu_Q$ values obtained for PA/chol-d₅ bilayers.⁴ If one assumes that cholesterol experienced an equivalent rotation in the CPC/chol bilayers, one can define S_{mol} that minimizes the difference between the calculated and the experimental $\Delta\nu_Q^m$. Table 4.2 shows that such dynamics was appropriate to describe the orientation and the dynamics of cholesterol in the CPC/chol fluid bilayers. A S_{mol} value of 0.90 allowed us to reproduce the experimental measurements within 5%. This S_{mol} value indicated that the axis of rotation of cholesterol was similar to that determine for cholesterol in other lamellar phases, that this axis was close to be parallel to the bilayer normal and that motions other than the molecular rotation were limited. The shape of the ²H-NMR spectra did not change considerably between 25 and 55 °C, the main difference being a reduction of $\Delta\nu_Q^m$ by about 3% (data not shown). This is likely associated to additional temperature-induced wobbling of the cholesterol molecules.

In the case of CPB-d₅, two angles were defined to describe the orientation of the cycle relative to its rotation axis, on the basis of the Euler angles. First, β was the angle between the \hat{r} and \hat{s} , a segment in the pyridinium cycle going through the N atom and the deuterium nucleus labelled as D₁ (at the *para* position). Second, γ defines the rotation of the pyridinium cycle around \hat{s} (see Figure 4.5). Other orientations of \hat{s} in the pyridinium cycle were excluded because of the symmetry of the pyridinium group, and because the relative contributions of the nuclei to the doublets were 2:2:1 and 3:2, compatible again

with the pyridinium symmetry. The orientation of the different C-D bonds relative to \hat{r} could be defined as a function of γ , and β .³⁷

$$\cos \phi_i = \frac{(l_i \cdot \cos \gamma_i \cdot \sin \beta_i + m_i \cdot \sin \gamma_i \cdot \sin \beta_i + n_i \cdot \cos \beta_i)}{\sqrt{l_i^2 + m_i^2 + n_i^2}} \quad (4.5)$$

where l_i , m_i , and n_i are the direction cosines of the C-D_i bond vector.

The labelled C-D groups of the pyridinium group were located on the rigid aromatic cycle and, as a consequence, no significant intramolecular (intracycle to be more specific) motions were expected. Consequently, the different S_{C-D} of CPB-d₅ solubilized in sterol-rich fluid bilayers, responsible for the different values of $\Delta\nu_Q^m$, were associated to different orientation of the C-D bonds relative to the rotation axis. The ratios of two $\Delta\nu_Q^m$ were directly proportional to the ratios of their associated S_{C-D} . The $\Delta\nu_Q^m$ ratios could therefore be used as constraints to identify values of β , and γ reproducing the experimental values of $\Delta\nu_Q^m$. In an initial step, we examined the results obtained for a fast rotation around \hat{s} . This solution had to be excluded because it led to the same $\Delta\nu_Q^m$ for 4 deuterium nuclei, a solution incompatible with the experimental results. The values of β , and γ were then systematically varied, by 0.1° step, in order to identify the (γ , β) pairs reproducing the $\Delta\nu_Q^m$ ratios; the results obtained for the CPB-d₅/sterol systems at 25 °C are presented in Figure 4.6. Once S_{C-D} were identified from β , and γ , the only unknown in Equation 4.4 was S_{mol} . The S_{mol} values calculated for the identified (γ , β) solutions were also included in the figure. These solutions described the orientation and dynamics of the pyridinium group that reproduced the experimental results. First of all, by contrast with cholesterol, there was no solution with S_{mol} close to 1, indicating that, in this model, the axis of rotation should experience considerable wobbling relative to \hat{r} , a behavior that would contrast with that of cholesterol and also that of palmitic acid in the PA/chol mixtures.⁷ Alternatively, the pyridinium group may experience additional motions that would reduce quadrupolar interactions. It must be reminded that, in the present model, S_{mol} included the motions of the whole pyridinium group but not the whole CPC molecule as there is likely significant flexibility at the alkyl chain level. If the rotation is proposed to occur around the C2-C1 (numbering relative to the nitrogen in the pyridinium cycle), this leads to $\beta = 70^\circ$. Actually,

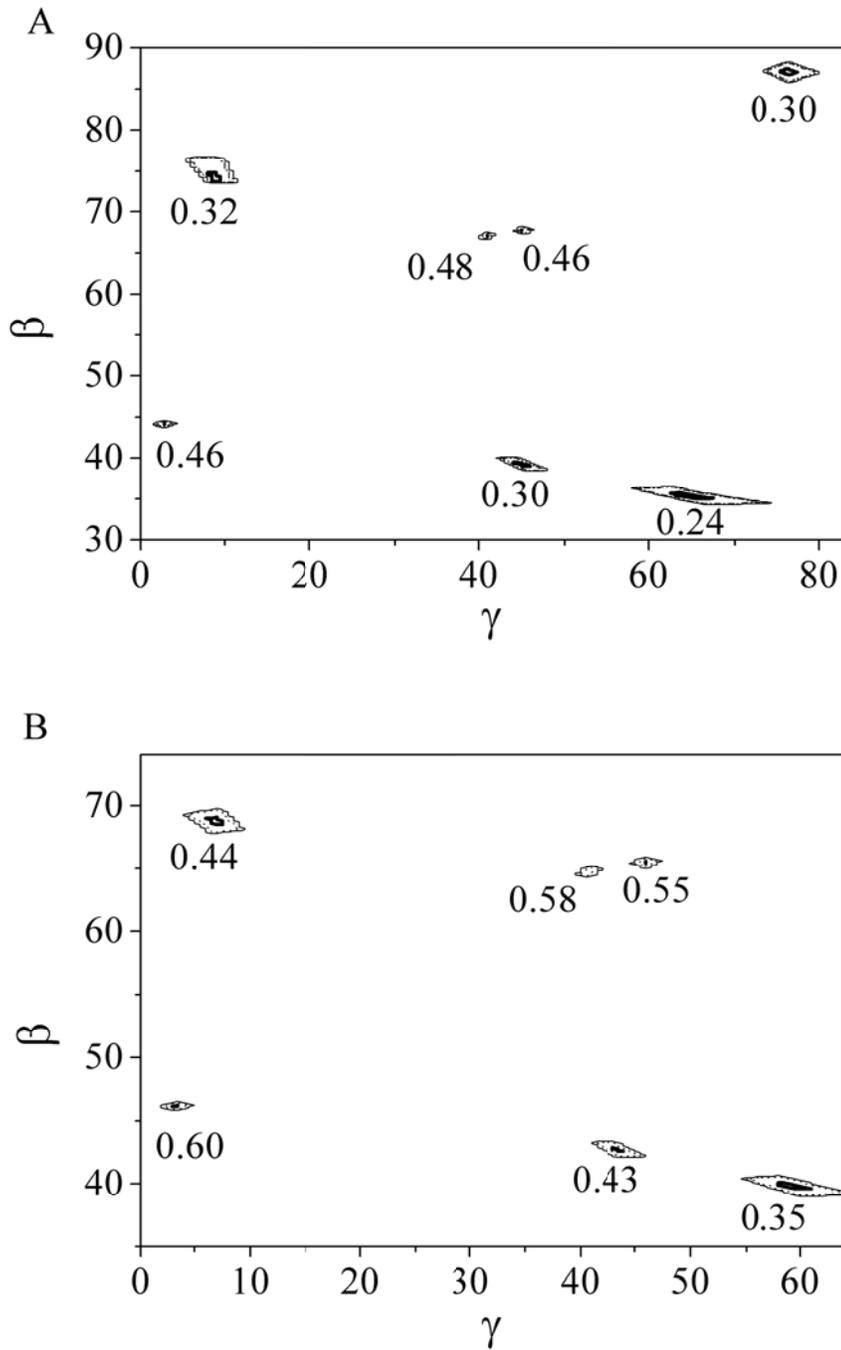


Figure 4.6 : Representation of the (γ, β) solutions for CPB-d₅/chol (30/70) (A), and CPB-d₅/Schol (30/70) (B) mixtures, 25 °C and pH 7.4. The contours define the solutions reproducing the experimental Δv_Q^m values within $\pm 1\%$ (inner contour) and $\pm 2.5\%$ (outer contour).

for both systems, a solution for this value of β could be found and the associated S_{mol} were actually similar, about 0.45. At this point, it is practically impossible to identify the best solution among the possible ones but we can conclusively state that the measurements show considerable fluctuations of the pyridinium cycle, leading to an extensive averaging of the quadrupolar interactions.

For the two sterol-containing systems, the shape of the spectra did not change significantly when varying the temperature between 25 and 80 °C, confirming the absence of phase transition inferred from IR spectroscopy. The evolution of the $\Delta\nu_Q^{\text{m}}$ values as a function of temperature is reproduced in Figure 4.7. Most $\Delta\nu_Q^{\text{m}}$ values measured for CPB-d₅/chol, and CPB-d₅/Schol mixtures decreased as a function of increasing temperature. This is likely related to enhanced thermal fluctuations that caused an increased averaging of the quadrupolar interactions, an explanation supported by the $\Delta\nu_Q^{\text{m}}$ reduction also observed for cholesterol. It is interesting to point out however that the splitting at ~20 kHz observed for the CPB-d₅/Schol system (represented by ● in Figure 4.7B) slightly increased upon heating. This indicates that, in addition to increased motional averaging, there is a change in the orientation of the pyridinium cycle relative to the bilayers upon heating.

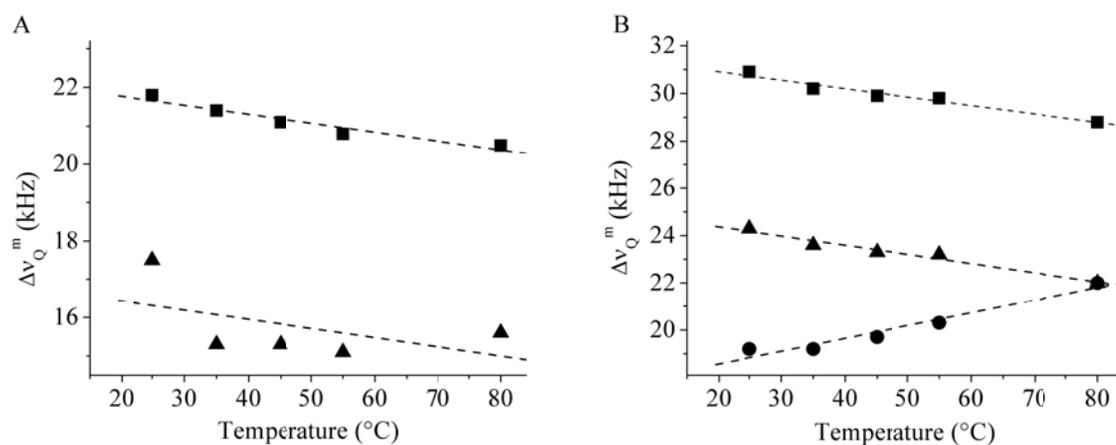


Figure 4.7 : Evolution of the different $\Delta\nu_Q^{\text{m}}$ values as a function of temperature for the CPB-d₅/chol (A), and CPB-d₅/Schol (B) mixtures.

The spectroscopic results indicated that CPC/chol and CPC/Schol mixtures with a molar CPC/sterol ratio of 30/70 formed lo phase bilayers that appeared to be stable between 20, and 80 °C. We used conventional extrusion techniques to assess the formation of LUVs with these systems. After extrusion at ambient temperature through polycarbonate filters with 100-nm pore size, QELS measurements showed for the CPC/Schol system the formation of a single LUV population with an average size of 110 nm. This behavior was observed at pH 5.5, and 7.4. The LUV size was stable, as assessed by QELS, for at least 1 month. The CPC/chol mixture also formed LUVs at pH 5.5 and 7.4. However, these were found to aggregate/fuse during the first 2 days. Even though the mixtures with both sterols led to the formation of lo phase bilayers, it appeared that LUVs formed with the CPC/Schol mixtures were more stable than those prepared with cholesterol. Therefore, we focussed the characterization of the permeability on the CPC/Schol LUVs.

The passive calcein release of this system is presented in Figure 4.8. The LUVs showed very limited permeability; after 4 months, at least 90% of the calcein remained inside the LUVs. The data at pH 5.5 were recorded over a 1-year period and still 90 % of the calcein was found encapsulated in CPC/Schol LUVs. This very limited passive permeability was analogous to that previously observed for PA/chol (70/30) LUVs,⁶ another system with high-sterol content, for which a release of about 10% was observed after 30 days. These characteristics compared very advantageously to conventional liposomes, and even to those formed with bologform bacterial lipids that are recognized as having limited passive permeability.^{41,42}

The pH stability of the LUVs was also characterized. Calcein-loaded LUVs prepared at 7.4 were exposed to an external pH varying between 5.5, and 9. First, QELS measurements carried out on the first day of the pH variation of the external milieu indicated that the size of most LUVs (> 90%) remained around 110 nm. Second, the encapsulation of calcein was not affected by the pH of the external milieu (Figure 4.9). No significant leakage was observed between pH 5.5 and 9, even over a 6-month period. This

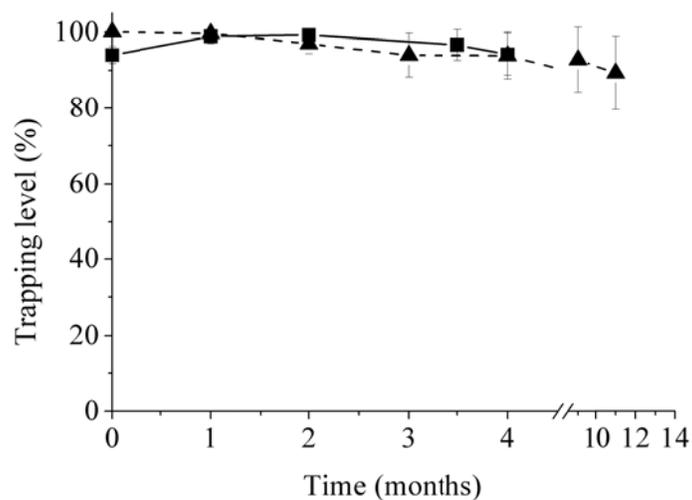


Figure 4.8 : Passive release of calcein from CPC/Schol LUVs at ambient temperature, pH 7.4 (■), and pH 5.5 (▲); n = 3.

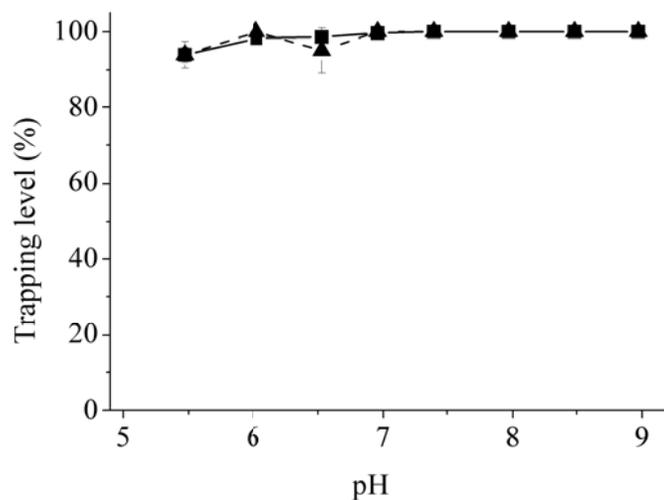


Figure 4.9 : Effect of the external pH on the permeability of CPC/Schol LUVs. The trapping levels were measured the first day of the external-pH change (■) and after 6 months (▲); n = 3.

finding contrasts with the behaviour of LUVs made of PA and sterol.⁷ For PA/chol and PA/Schol LUVs, it was shown that the content release could be triggered by a pH variation. The stability of the LUVs was intimately related to the protonation/unprotonation state of the carboxylic group that modulated the interfacial electrostatic interactions. Between pH 5.5 and 9, neither CPC nor Schol is sensitive to pH; the stability of the CPC/Schol LUVs over the investigated pH range reinforced the idea that the interfacial surface charge dictates the stability of these sterol-rich LUVs.

4.5 Conclusion

This paper reports the possibility to form lo phase bilayers with sterol, and CPC, a cationic detergent. These self-assembled structures include a large amount of sterol, 70 (mol) %. The fluid aspect of these bilayers is demonstrated by ²H-NMR spectroscopy of deuterated cholesterol and deuterated pyridinium cycle. The high chain order is inferred from IR spectroscopy. The resulting extruded LUVs show very low passive permeability and an excellent stability between pH 5.5, and 9. This work extends the new family of non-phospholipid liposomes with high cholesterol content previously reported with fatty acids.^{4-7,21} The components of these systems display an hydrophobic matching between the length of the monoalkyl amphiphile and the hydrophobic part of the sterol, a proposed key parameter in the formation of these fluid bilayers.²¹ It was previously suggested that an interfacial H-bond network between the constituents is required to form such bilayers.⁴³ This hypothesis is not supported by the present findings because CPC, despite the fact that it cannot be involved in strong H bond as donor or acceptor, forms lo bilayers with cholesterol and Schol. The idea that interfacial H bonds are not an absolute requirement for the bilayer formation is also reinforced by the fact that PA/chol bilayers are more stable at pH ≥ 7.5 , when the carboxylic group of the acid is deprotonated and therefore cannot act anymore as a H bond donor. A more detailed investigation is required to determine the significant interfacial interactions.

We conclude that liposomes formed by sterol and monoalkylated amphiphiles are not limited to fatty acids but we show, for the first time, that it is also possible to make them with a cationic detergent. This new system opens the door to applications where the presence of cationic molecules has been shown to have specific advantages¹³⁻¹⁸ while it maintains the very limited passive permeability associated to the liposomes with high sterol content. On the basis of our work and the literature, it appears more common than first anticipated to form lo phase bilayers with a monoalkyl amphiphile and sterol. In addition to fatty acid/sterol, and CPC/sterol, it is also possible to form this type of bilayers with lyso-palmitoylphosphatidylcholine (lyso-PPC) and cholesterol.⁴⁴ Typically lyso-PPC forms micelles. When mixed with cholesterol, the formation of a lamellar phase was recently observed, using ³¹P-NMR. Interestingly micelles were no longer observed and all the lyso-PPC participated in the lamellar phase when the cholesterol proportion reached 70 %, a content very reminiscent of that identified for CPC/sterol, and PA/sterol systems.^{4,6,7} An analogous behavior was somehow reported for mixtures formed with cholesterol and N-acetyethanolamine (NAE),⁴⁵ the latter being a derivative of 2-ethanolamine, where the amide group is linked to a long acyl chain. These monoalkylated amphiphiles are found in plants and animals and they display interesting biological properties. As observed by DSC, the addition of cholesterol to NAE led to a new phase transition that coexisted with the solid-liquid transition of NAE. The area of this peak increased with increasing amount of chol and reached a maximum when the cholesterol content was 50 %. The authors attributed this new transition to the formation of a complex between NAEs and cholesterol; this may be reminiscent of the lamellar phases discussed in the present article. As monoalkylated amphiphatics are present in several biological systems, the formation of high-sterol lamellar phases as those reported here should be seriously considered. For example, it was reported that the introduction of lysophosphatidylcholine in red blood cells reduces the susceptibility of cholesterol to cholesterol oxidase, presumably by associating with the sterol.⁴⁶ The formation of an ordered and fluid lamellar phase by these 2 constituents would be compatible with this observation. Therefore, in addition to providing novel nanomaterials for the formation of

LUVs with distinct properties, these high sterol-content phases may exhibit some biological relevance.

4.6 Acknowledgments

The authors would like to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for its financial support. They also thank Cédric Malveau, Department of Chemistry, Université de Montréal for his technical support during the NMR experiments. T. Phoeung is grateful to Université de Montréal for her Scholarship*. This work was also funded by Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies through its financial support to the Center for Self-Assembled Chemical Systems (CSACS).

4.7 Reference List

1. McMullen, T. P. W.; McElhane, R. N. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, *1*, 83.
2. Mouritsen, O. G.; Zuckermann, M. J. *Lipids* **2004**, *39*, 1101.
3. Bloom, M.; Mouritsen, O. G. *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 706.
4. Paré, C.; Lafleur, M. *Langmuir* **2001**, *17*, 5587-5594.
5. Ouimet, J.; Croft, S.; Paré, C.; Katsaras, J.; Lafleur, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1089.
6. Bastiat, G.; Oligier, P.; Karlsson, G.; Edwards, K.; Lafleur, M. *Langmuir* **2007**, *23*, 7695.
7. Bastiat, G.; Lafleur, M. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 10929.

8. Vist, M. R.; Davis, J. H. *Biochemistry* **1990**, *29*, 451.
9. Lafleur, M.; Cullis, P. R.; Bloom, M. *Eur. Biophys. J.* **1990**, *19*, 55.
10. Thewalt, J. L.; Bloom, M. *Biophys. J.* **1992**, *63*, 1176.
11. Filippov, A.; Orädd, G.; Lindblom, G. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 2086.
12. Chachaty, C.; Rainteau, D.; Tessier, C.; Quinn, P. J.; Wolf, C. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 4032.
13. Xu, Y.; Szoka, F. C. Jr. *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616.
14. Zelphati, O.; Szoka, F. C. Jr. *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 1367.
15. Hong, K.; Zheng, W.; Baker, A.; Papahadjopoulos, D. *FEBS Lett.* **1997**, *400*, 233.
16. Campbell, R. B.; Balasubramanian, S. V.; Straubinger R. M. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1091.
17. Campbell, R. B.; Balasubramanian, S. V.; Straubinger, R. M. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1512*, 27.
18. Dabbas, S.; Kaushik, R. R.; Dandamudi, S.; Kuesters, G. M.; Campbell, R. B. *Endothelium* **2008**, *15*, 189.
19. Bhat, M.; Gaikar, V. G. *Langmuir* **2000**, *16*, 1580.
20. Marcotte, L.; Barbeau, J.; Lafleur, M. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *292*, 219.
21. Ouimet, J.; Lafleur, M. *Langmuir* **2004**, *20*, 7474.
22. Ulmschneider, M. B.; Sansom, M. S. P. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1512*, 1.
23. Deisenhofer, J.; Michel, H. *Science* **1989**, *245*, 1463.
24. Cameron, D. G.; Kauppinen, J. K.; Moffatt, D. J.; Mantsch, H. H. *Appl. Spectrosc.* **1988**, *36*, 245.
25. Sternin, E.; Bloom, M.; MacKay A. L. *J. Magn. Reson.* **1983**, *55*, 274.
26. Allen, T. M., Calcein as a tool in liposome methodology. In *Liposome technology*, Gregoriadis, G., Ed. CRC Press: Boca Raton, FL, **1984**; pp 177.

27. Benachir, T.; Lafleur, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1235*, 452.
28. Mantsch, H. H.; McElhaney, R. N. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *57*, 213.
29. Kodati, V. R.; El-Jastimi, R.; Lafleur, M. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 12191.
30. Wong, T. C.; Wong, N. B.; Tanner, P. A. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *186*, 325.
31. Paré, C.; Lafleur, M. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 899.
32. Chen, H.-C.; Mendelsohn, R.; Rerek, M. E.; Moore, D. J. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1468*, 293.
33. Fenske, D. B.; Thewalt, J. L.; Bloom, M.; Kitson, N. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1562.
34. Dufourc, E. J.; Parish, E. J.; Chitrakorn, S.; Smith I. C. P. *Biochemistry* **1984**, *23*, 6062.
35. Seelig, J. *Q. Rev. Biophys.* **1977**, *10*, 353.
36. Davis, J. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *737*, 117.
37. Marsan, M. P.; Muller, I.; Ramos, C.; Rodriguez, F.; Dufourc, E. J.; Czaplicki, J.; Milon A. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 351.
38. Kelusky, E. C.; Dufourc, E. J.; Smith, I. C. P. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *735*, 302.
39. Monck, M. A. ; Bloom, M.; Lafleur, M.; Lewis, R. N. A. H.; McElhaney, R. N.; Cullis, P. R. *Biochemistry* **1993**, *32*, 3081.
40. Davis, J. H. *Biophys. J.* **1979**, *27*, 339.
41. Choquet, C. G.; Patel, G. B.; Beveridge, T. J.; Sprott, G. D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, *42*, 375.
42. Elferink, M. G. L.; De Wit, J. G.; Driessen, A. J. M.; Konings, W. N. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1193*, 247.
43. Hargreaves, W. R.; Deamer, D. W. *Biochemistry* **1978**, *17*, 3759.
44. Gater, D. L. ; Seddon, J. M.; Law, R. V. *Soft Matter* **2008**, *4*, 263.

45. Ramakrishnan, M.; Tarafdar, P. M.; Kamlekar, R. K.; Swamy, M. J. *Curr. Sci.* **2007**, *93*, 234.
46. Lange, Y.; Ye, J.; Steck, T. L. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 36126.

Chapitre 5

SERS et ITC. Essais d'une nouvelle méthode de détermination des constantes d'affinité : cas du CPC sur des membranes de POPC

Thida Phoeung, Aline Percot et Michel Lafleur

Mots-clefs : SERS, ITC, détergent, lipide, affinité

Abbréviation du titre : SERS et ITC

5.1 Résumé

Cette étude porte sur le développement d'une méthode pour la détermination de la constante d'affinité entre un détergent et une bicouche lipidique. La spectroscopie Raman de surface exaltée (SERS) a été choisie parce que, par amplification du signal Raman, elle permet d'atteindre de faibles concentrations. Le système choisi pour établir la validité de cette approche est l'insertion d'un bactéricide (chlorure de cétypyridinium, CPC) dans des membranes modèles de 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (POPC). En effet, le CPC présente des bandes actives en Raman qui peuvent être amplifiées en présence de colloïdes d'argent. La méthode repose sur l'hypothèse de l'incapacité du CPC à interagir avec le colloïde lorsqu'il est inséré dans la membrane. Ainsi, le CPC inséré ne pourrait plus participer plus au signal SERS. Cette technique apporterait donc l'avantage de ne pas impliquer de séparation physique de phase entre la molécule liée et la molécule non-liée et de travailler avec de très faibles concentrations de détergent. Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus par une méthode largement utilisée pour la détermination de constante d'affinité, la calorimétrie à titration isotherme (ITC). Les résultats obtenus par ces deux méthodes présentent des écarts importants. Des propositions sont émises pour expliquer ce phénomène.

5.2 Introduction

De nos jours, les produits antibactériens occupent une place de plus en plus grande dans nos habitudes de consommation. Par exemple, outre les applications médicales, ils sont présents dans les produits de nettoyage, ou encore dans la nourriture comme conservateurs. Afin d'optimiser l'action des bactéricides, il est nécessaire d'étudier leurs mécanismes. Parmi les bactéricides se trouvent les détergents. Dans le cas des détergents, il est proposé que la mort des bactéries soit due à une perturbation de la membrane bactérienne par insertion de la molécule antibactérienne.¹⁻³ Dans ce cas, un paramètre fondamental définissant l'activité bactéricide est l'affinité entre le détergent et une membrane lipidique. Cependant, peu de techniques ont été mises en place pour déterminer le partage d'un détergent entre la phase aqueuse et la membrane constituant la phase lipidique.⁴ Une des difficultés majeures est que la plupart des détergents et des lipides interagissent peu avec la lumière (absorption et fluorescence), empêchant leur détection par les méthodes spectroscopiques courantes. De plus, il faut pouvoir distinguer les détergents associés aux membranes des détergents libres. Parmi les méthodes mises en place pour les molécules non-optiquement actives, certaines demandent au préalable une séparation physique entre les molécules liées à la membrane et les molécules libres.^{5,6} Cependant, il peut être difficile de séparer complètement les deux espèces. De plus, une perturbation de l'équilibre de phase peut se produire. Les méthodes n'incluant pas de séparation sont donc préférées. Parmi celles-ci, la titration calorimétrique isotherme (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) est la plus connue et la plus utilisée dans le cas détergent/membrane lipidique.⁴ Comme la plupart des associations moléculaires entraînent un dégagement ou absorption de chaleur, il est possible de les détecter par calorimétrie. L'ITC présente donc l'avantage de ne pas avoir besoin de marqueurs spectroscopiques, elle utilise des bicouches non supportées et elle permet de déterminer les paramètres thermodynamiques d'une réaction. Cependant, la détermination de l'affinité entre un détergent et une membrane par cette méthode peut ne pas être aisée lorsque les enthalpies de transfert sont faibles, ce qui est souvent le cas pour les systèmes détergents/lipides.⁷

Cette étude a donc porté sur la mise en place d'une nouvelle méthode ne demandant pas de séparation de phase pour déterminer des constantes d'affinité. L'effet d'exaltation du signal Raman (Surface Enhanced Raman Scattering ou SERS) est un atout pour les molécules possédant des bandes actives en Raman. Cette exaltation a lieu lorsque la molécule s'adsorbe sur un colloïde métallique. Grâce à cette amplification, il est possible d'obtenir un spectre Raman avec des analytes en faibles concentrations. Étant donné la sensibilité du SERS, cette approche a donc été choisie. L'hypothèse sur laquelle se base la méthode est que seules les molécules dans l'eau peuvent interagir avec le métal et voir leur signal exalté. Ainsi, les molécules participant à des agrégats (incluses dans la membrane ou dans une micelle) ne participeraient pas au signal SERS. Une telle méthode permettrait de doser le détergent dans l'eau et d'en déduire la quantité de détergent inséré dans la membrane. À titre de preuve de concept, l'insertion du chlorure de cétypyridinium (CPC) dans des membranes de 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (POPC), composante majoritaire de plusieurs membranes cellulaires, a été étudiée. Le CPC est un antibactérien déjà commercialisé dans certains rince-bouches (Cepacol[®] et Scope[®]). Il est composé d'une tête polaire pyridinium qui possède des bandes de vibrations actives en Raman. Ces bandes, notamment celle centrée à 1028 cm^{-1} , peuvent être amplifiées en présence d'un colloïde d'argent.⁸ Pour valider la méthode, la première étape consiste en l'étude de la variation du signal SERS avec la concentration en CPC. Le signal SERS devrait varier linéairement en fonction de la concentration en monomère dans la solution. Ensuite, la variation du signal en fonction de la concentration au-delà de la CMC est examinée. Si l'intensité Raman demeure constante, cela validerait que seules les molécules libres participent au signal. Finalement, des expériences ont aussi été menées avec le CPC monomère en présence de diverses concentrations de POPC. Pour ce faire, une solution de CPC sera incubée dans une suspension de POPC et le tout sera mis en présence de colloïdes d'argent. Le retrait de monomères du milieu aqueux vers la membrane devrait conduire à une diminution du signal SERS. Ainsi, il serait possible de déterminer la constante d'affinité caractérisant cet équilibre. Les constantes d'affinité seront comparées à

celles obtenues par ITC. Initialement, l'influence du NaCl sur l'intensité des signaux SERS et ITC est examinée de manière à établir les conditions optimales d'analyse.

5.3 Matériels et méthodes

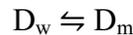
La POPC a été achetée chez Northern Lipids Inc. (Vancouver, Canada). L'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) (99.4 %), le CPC, le NaCl (99.5 %) et le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris) (99 %) ont été achetés chez Sigma Aldrich (St Louis, MO). Le chlorure de dodécylpyridinium a été commandé chez Aldrich (Milwaukee, WI).

Préparation des LUVs de POPC

Une suspension-mère de POPC (40 mM) est préparée dans un tampon contenant 100 mM NaCl, 10 mM Tris et 50 μ M EDTA (pH 7.6). Les lipides sont hydratés en procédant par 5 cycles gel-dégel (azote liquide-35 °C). Puis les LUVs (Large Unilamellar Vesicles) sont obtenues par extrusion à température ambiante à travers des filtres de polycarbonate (15 passages) dont les pores sont de l'ordre de 100 nm de diamètre. Cette suspension est ensuite diluée de manière à obtenir une concentration en POPC entre 1 et 30 μ M pour le SERS et entre 1 et 35 mM pour l'ITC. Les concentrations réelles sont déterminées par un test au phosphore.⁹ Pour examiner l'influence du sel NaCl sur le signal SERS, le même protocole est suivi sauf que les expériences sont effectuées en présence de 10 mM NaCl (10 mM Tris et 50 μ M EDTA, pH 7.6). La suspension-mère de POPC est diluée afin d'obtenir une concentration entre 0.6 et 40 μ M pour le SERS et entre 3 et 4 mM en ITC. Les expériences sont réalisées à 2 concentrations en NaCl à savoir 10 et 100 mM.

Constante de partage K

En présence de vésicules de POPC, une partie du CPC s'insère dans la membrane. Il existe alors un équilibre de partage entre le détergent libre (D_w dans l'eau) et le détergent inséré dans la membrane D_m .^{4,10,11} Cet équilibre peut être défini par :



La constante de partage K_w de cet équilibre est donnée par :

$$K_w = \frac{\frac{n_{d,m}}{n_{d,m} + n_L}}{\frac{n_{d,w}}{n_{d,w} + n_w}} = \frac{\frac{C_{d,m}}{C_{d,m} + C_L}}{\frac{C_{d,w}}{C_{d,w} + C_w}} \quad \text{Équation 5.1}$$

où $C_{d,m}$: concentration de détergent inséré dans la membrane ; $C_{d,w}$: concentration de détergent libre ; C_L : concentration de lipides ; C_w : concentration de l'eau soit 55 M. On peut considérer que $C_{d,w} \ll C_w$ ce qui donne :

$$K_w = \frac{C_{d,m} \cdot C_w}{C_{d,w} \cdot (C_{d,m} + C_L)} \quad \text{Équation 5.2}$$

Ou encore :

$$K = \frac{C_{d,m}}{C_{d,w} \cdot (C_{d,m} + C_L)} = \frac{K_w}{C_w} \quad \text{Équation 5.3}$$

avec K en M^{-1} et K_w est sans unité.

Si on trace $\frac{C_{d,m}}{C_{d,w}}$ en fonction de $(C_{d,m} + C_L)$, la pente de cette droite correspond à la constante d'affinité K .

$$\frac{C_{d,m}}{C_{d,w}} = K \cdot (C_{d,m} + C_L) \quad \text{Équation 5.4}$$

Surface –Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)

Une suspension de colloïde d'argent est préparée selon la méthode Creighton par Sophie Lecomte (Unité mixte CNRS/Université Ladir, Thiais, France). La taille des colloïdes d'argent est estimée à 1 à 50 nm, voire pour certaines préparations de 1 à 10 nm.¹² Les spectres SERS sont enregistrés à l'aide d'un microscope à imagerie Raman (WiRE System 3000 et Renishaw, Gloucestershire, UK) comprenant un réseau holographique (réseau de 1800 traits mm⁻¹), un microscope Leica, une caméra CCD et un laser à Argon délivrant une radiation à 514.5 nm. Le microscope est, de plus, équipé d'un objectif coudé à 90° (lentille de longueur focale 30 mm) qui permet d'analyser les échantillons dans un capillaire de verre placé à 90° par rapport au faisceau. La puissance du laser est fixée à 60 mW pour 100 mM NaCl ou 100 mW pour 10 mM NaCl afin d'obtenir une puissance à l'échantillon de 9-10 ou 15-20 mW, respectivement. Tous les spectres sont enregistrés à température ambiante. Les expériences ont été réalisées en triplicata sauf indications contraires. Les valeurs moyennes sont reportées et les incertitudes données correspondent à l'écart-type à la moyenne.

Pour déterminer l'influence du sel NaCl sur le signal SERS, à 90 µL de solution colloïdale sont ajoutés 5 µL de NaCl à différentes concentrations (0 à 5 M) puis 5 µL d'une solution de chlorure de dodécylpyridinium (DPC) à 100 µM. Les spectres sont enregistrés immédiatement après le mélange. L'acquisition s'est faite pendant 30 s pour une puissance de 50 mW à la sortie du laser (8 mW à l'échantillon).

Pour déterminer la CMC du CPC à 100 mM NaCl, 10 µL de CPC (1 µM à 900 µM dans l'eau) sont mélangés à 10 µL de tampon. Immédiatement après, à 45 µL de colloïde, sont ajoutés 5 µL de NaCl (1.1 M solubilisé dans l'eau) puis 10 µL de la solution de CPC précédente. Le tout est incubé pendant 10 min et l'acquisition des spectres s'est faite pendant 30 s. Pour la CMC du CPC à 10 mM NaCl, 5 µL d'une solution de NaCl (0.11 M) ont été ajoutés aux colloïdes. L'acquisition des spectres s'est faite pendant 60 s pour des solutions de 1 µM à 2.2 mM en CPC. L'intensité du signal à 1028 cm⁻¹ est tracée en fonction de la concentration totale de CPC.

Pour déterminer la constante d'affinité K_{SERS} entre le CPC et les LUVs de POPC à 100 mM NaCl, 10 μL de CPC (60 μM dans l'eau) sont mélangés à 10 μL de LUVs de POPC (1 à 80 μM dans le tampon) : le mélange est incubé pendant 5 min. Puis, à 45 μL de colloïde, sont ajoutés 5 μL de solution de NaCl dans l'eau (1.1 M) puis 10 μL du mélange précédent. Ceci assure des concentrations finales de 100 mM NaCl et 5 μM de CPC dans 60 μL de solution colloïdale. L'échantillon est incubé pendant 10 min et l'acquisition des spectres se fait pendant 30 s. Pour une meilleure reproductibilité, la solution de NaCl doit être ajoutée aux colloïdes et la solution vortexée avant l'introduction du mélange CPC/POPC à la solution colloïdale. Pour les expériences effectuées à une concentration de 10 mM en NaCl, 5 μL de solution NaCl (0.11 M solubilisé dans l'eau) sont ajoutés aux 45 μL de colloïdes (toujours dans l'idée d'assurer une concentration de 10 mM en NaCl dans 60 μL de solution colloïdale). L'acquisition des spectres se fait pendant 60 s.

Titration Calorimétrique Isotherme (ITC)

Pour la détermination de la CMC du CPC à 100 mM NaCl, le CPC (5 mM dans le tampon) est injecté dans la cellule contenant du tampon, par pas de 3 μL . La CMC du CPC a aussi été déterminée pour une concentration de 100 mM en NaCl. Dans ce cas, le CPC concentré à 5 mM est injecté par pas de 3 à 6 μL .

Pour la détermination de la constante K_{ITC} , le CPC, dans la cellule, est titré par une suspension de POPC dans la seringue. À 100 mM NaCl, le volume d'injection est de 10 μL pour une concentration en POPC de 10 mM et une concentration de CPC de 40 μM . Ces deux préparations sont faites dans le même tampon. À 10 mM en NaCl, le volume d'injection est de 5 ou 10 μL pour des concentrations en POPC allant de 1 à 35 mM et des concentrations de CPC allant de 20 à 100 μM .

Les mesures sont réalisées à 25 °C sur un calorimètre VP-ITC de Microcal Inc. (Northampton, MA, USA). Le volume de la cellule V_{cell} est de 1.4527 mL. Le volume de la seringue d'injection est de 290 μL . Les expériences ont été réalisées en triplicata sauf indications contraires. Les valeurs moyennes sont données et les incertitudes correspondantes représentent les écart-types à la moyenne.

5.4 Résultats

5.4.1 Expériences SERS

5.4.1.1 Spectre SERS du CPC

Le CPC possède plusieurs bandes en spectroscopie Raman dont la plus intense, centrée à 1028 cm^{-1} , représente le mode de respiration associé au cycle (trigonal ring-breathing, deformation).^{8,13} L'intensité Raman de ce mode de vibration peut être amplifiée en présence de colloïdes d'argent (fig. 5.1). L'effet SERS est démontré dans le cas du chlorure de dodécylpyridinium (DPC). En effet, la figure 5.1a montre le spectre Raman d'une solution aqueuse de DPC concentrée à 0.12 M. Le rapport signal sur bruit de ce spectre est d'environ 7. Pour le spectre SERS d'une solution de DPC concentrée à $1.4\ \mu\text{M}$ (fig. 5.1b), ce rapport est estimé à 130. Si la concentration est prise en compte, l'effet SERS augmente le signal/bruit d'un facteur $\sim 1.5 \cdot 10^6$. Ce facteur d'exaltation est du même ordre de grandeur que ceux généralement observés en présence de colloïdes d'argent, incluant celui précédemment déterminé pour ce mode de vibration dans le cas de la pyridine sur une électrode d'argent.¹⁴⁻¹⁶ La fig. 5.1c montre le spectre SERS du CPC concentré à $5\ \mu\text{M}$: le spectre obtenu est très similaire à celui du DPC et on infère une exaltation similaire du signal Raman.

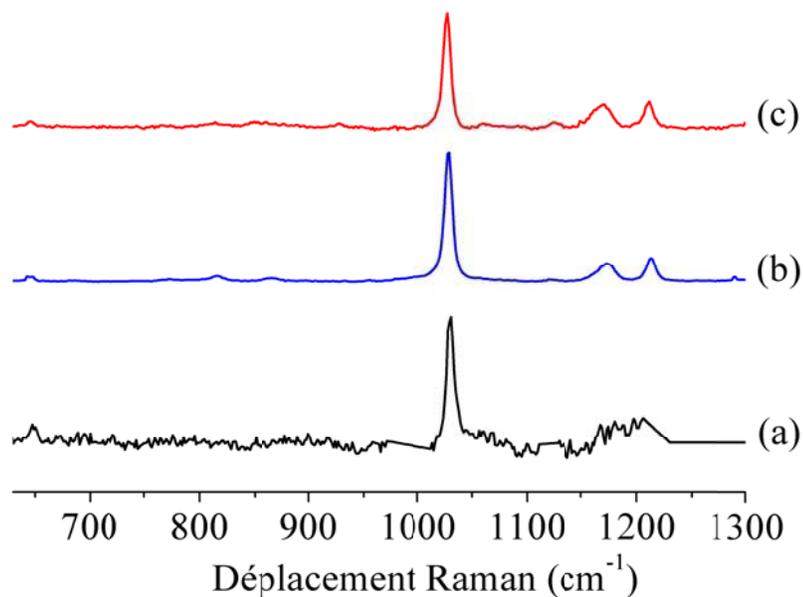


Figure 5.1 : Spectres (a) Raman du DPC à 0.12 M, (b) SERS du DPC à 1.4 μM et (c) SERS du CPC à 5 μM . Les intensités sont normalisées de manière à ce que la bande centrée vers 1028 cm^{-1} soit de même hauteur. Les spectres (a) et (b) ont été enregistrés par E. Auvrouin.

5.4.1.2 Influence du sel NaCl sur le signal SERS

La présence de NaCl a une influence sur l'intensité du signal SERS à 1028 cm^{-1} (fig. 5.2). Le signal maximal est obtenu pour des concentrations de 50 à 100 mM NaCl alors qu'il est plus faible à 10 mM NaCl. Même si l'effet SERS est encore mal compris, il a été remarqué que la formation d'un complexe entre la molécule adsorbée et la surface du métal était requise pour l'obtention d'une exaltation pour le système métal-pyridine.¹⁴ Les ions hautement polarisables comme l'ion Cl^- peuvent fortement interagir avec une surface métallique aussi bien qu'avec le cycle pyridinium.^{17,18} Il est alors possible que la formation d'un complexe métal-anion-pyridinium adsorbée à la surface du métal mène à une exaltation accrue de la bande à 1028 cm^{-1} .¹⁴ L'augmentation de la quantité de NaCl en

solution pourrait favoriser cette interaction. Au-delà d'une certaine concentration en NaCl, la force ionique de la solution peut mener à une association réduite entre le colloïde et le CPC, à cause de l'écrantage des interactions électrostatiques. Ceci aurait comme conséquence une diminution du facteur d'exaltation. Même si les phénomènes menant à cette variation de l'effet SERS ne sont pas clairement identifiés, ces résultats guident notre choix des conditions pour les expériences subséquentes.

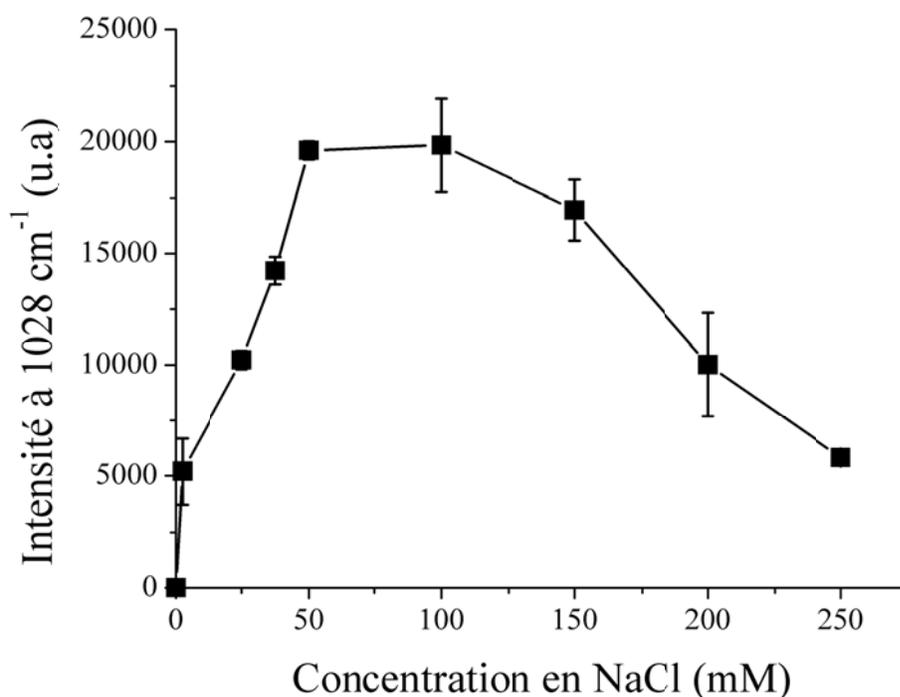


Figure 5.2 : Effet du sel sur l'intensité de la bande SERS à 1028 cm⁻¹. Le signal SERS atteint un maximum entre 50 et 100 mM en NaCl. Ces données ont été réalisées par A. Percot sur le DPC à 5 μM.

Il est à noter que ces expériences ont été menées sur le DPC mais les spectres SERS du DPC et CPC sont similaires et les conclusions faites sur le DPC sont extrapolées au cas du CPC.

5.4.1.3 Variation de la bande à 1028 cm^{-1} avec la concentration de CPC

L'intensité du signal SERS à 1028 cm^{-1} a été tracée en fonction de la concentration totale de CPC (fig. 5.3) à 100 mM NaCl . Il est à noter que cette concentration en NaCl mène à une intensité optimale du signal du CPC. Dans cette figure, trois régimes sont observables dans la variation du signal, chacun séparés par une cassure de la pente. Dans le régime I, jusqu'à une concentration limite de $5\text{ }\mu\text{M}$ en CPC, la pente observée est très abrupte (fig. 5.3B). Dans la zone de régime II, les intensités sont beaucoup moins reproductibles (données non montrées) mais elles augmentent en fonction de la concentration en détergent. Cette augmentation est plus faible que celle observée dans le régime I mais elle est non nulle. Cette zone s'étend jusqu'à une valeur limite de $50\text{ }\mu\text{M}$ (fig. 5.3A). Dans le régime III, l'intensité semble atteindre un plateau. La variation du signal SERS en fonction de la concentration de CPC présente une certaine analogie avec la variation de la concentration en monomères. On observe une augmentation du signal aux plus faibles concentrations en CPC (régimes I et II), suivie d'un plateau, le régime III. Ce changement de mode pourrait être relié à la CMC. Celle-ci est déterminée par ITC et correspond à $68\text{ }\mu\text{M}$ (voir section 5.4.2.1). Cette concentration correspond donc à l'atteinte du plateau d'intensité. Cette observation supporte l'hypothèse que le CPC inclus dans des micelles ne participe pas au signal SERS, son adsorption à la surface du colloïde étant plus difficile; ainsi, seul le CPC monomère serait détecté. Le régime I, avec une pente forte, correspondrait au CPC purement sous forme de monomère. Dans ce régime, le signal est directement proportionnel à la quantité de CPC totale dans la solution. Le régime III, avec une pente quasi-nulle, correspondrait à la formation de micelle de CPC. Quant au régime II, il pourrait correspondre à un état intermédiaire entre la forme monomère et la forme micellaire tel que discuté à la section 5.5.

Cette expérience a été reproduite avec une concentration en NaCl de 10 mM . Dans ces conditions, le régime I s'étend jusqu'à $1.25\text{ }\mu\text{M}$ en CPC. Le régime III débiterait à $175\text{ }\mu\text{M}$ (fig. 5.3C et 5.3D).

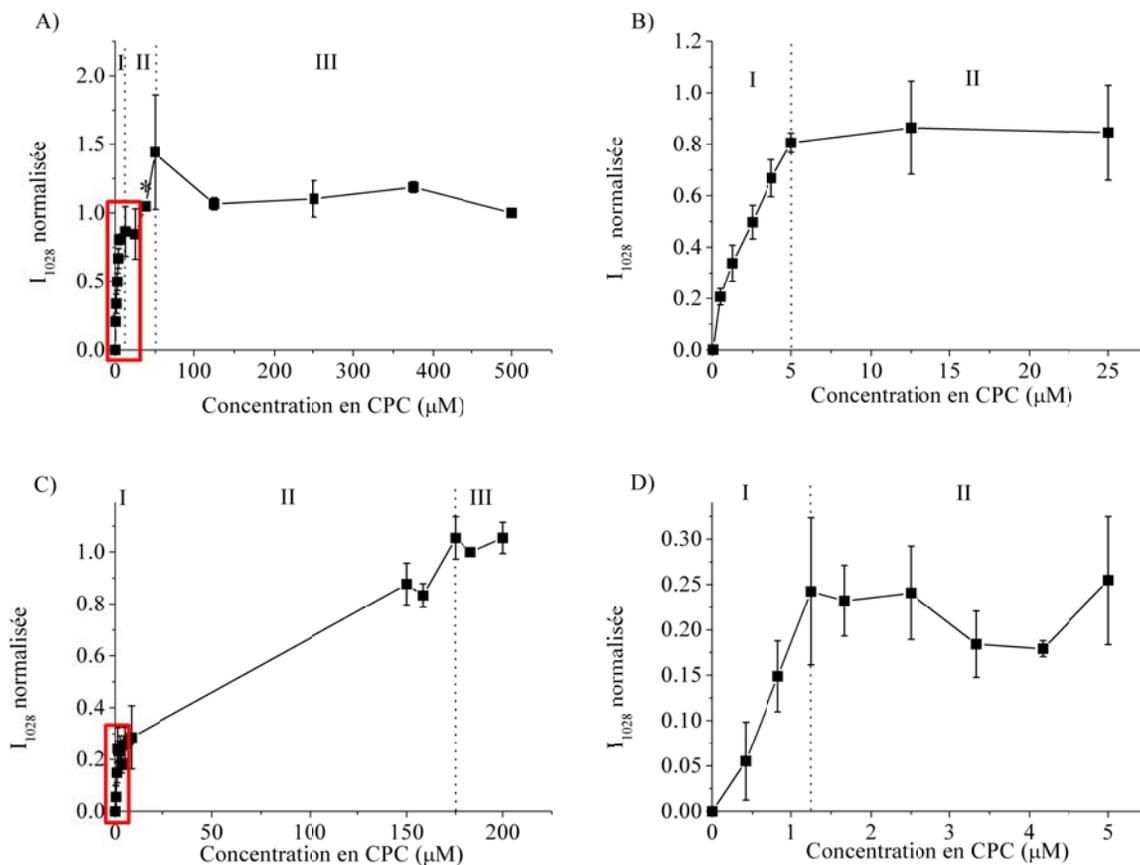


Figure 5.3 : A) Variation de l'intensité normalisée (par rapport à l'intensité à 500 μM) de la bande centrée autour de 1028 cm^{-1} avec la concentration en CPC à 100 mM en NaCl. B) Agrandissement de la partie encadrée en A). Les régimes I, II et III sont directement identifiés sur les figures. $n = 2$ sauf les points assignés d'un * correspondant à $n = 1$. C) Variation de l'intensité normalisée (par rapport à l'intensité à 183 μM) de la bande centrée autour de 1028 cm^{-1} avec la concentration en CPC à 10 mM en NaCl. D) Agrandissement de la partie encadrée en C). Les régimes I, II et III sont directement identifiés sur les figures. Les points assignés d'un * correspondent à $n = 1$.

5.4.1.4 Variation du signal SERS en présence de POPC

En se basant sur l'hypothèse que le CPC inclus dans des micelles ne participe plus au signal SERS, il est attendu que le CPC inclus dans une membrane lipidique ne participe pas au signal non plus. En utilisant une concentration de CPC vers la limite supérieure du régime I, la concentration de CPC monomère dans l'eau pourrait être obtenue à partir du signal SERS tandis que la concentration de CPC lié à la membrane serait obtenue par différence entre la concentration de CPC total et la concentration de CPC monomère dans l'eau. Il serait alors possible de déterminer la constante de partage K_{SERS} du CPC entre l'eau et la membrane. En effet, dans ce régime, une concentration de CPC monomère constante devrait donner un signal d'intensité constante. Si une diminution du signal est observée après l'ajout de lipides, il est proposé que cette diminution soit due au CPC qui s'insère dans la membrane, laissant une quantité moindre de CPC monomère dans l'eau. Cette quantité de CPC monomère serait dans le régime I et donc l'intensité du signal serait directement proportionnelle avec la concentration. L'intensité du signal a donc été enregistrée lorsqu'une quantité de POPC est ajoutée à une solution de CPC de 5 μM , c'est-à-dire dans le régime I (fig. 5.4). L'ajout de POPC fait diminuer le signal SERS du CPC et cette diminution est proportionnelle à la quantité de POPC. Lorsqu'une grande quantité de POPC est ajoutée (0.925 μM en POPC, fig. 5.4Ae), la quasi-extinction du signal a été obtenue, soutenant l'hypothèse que le CPC inséré dans la membrane ne participe plus au signal SERS. Il est donc proposé que la diminution de l'intensité du signal SERS correspondrait au transfert du détergent depuis l'eau vers la membrane, ce qui permettrait d'obtenir la constante d'affinité K_{SERS} du CPC pour les membranes de POPC.

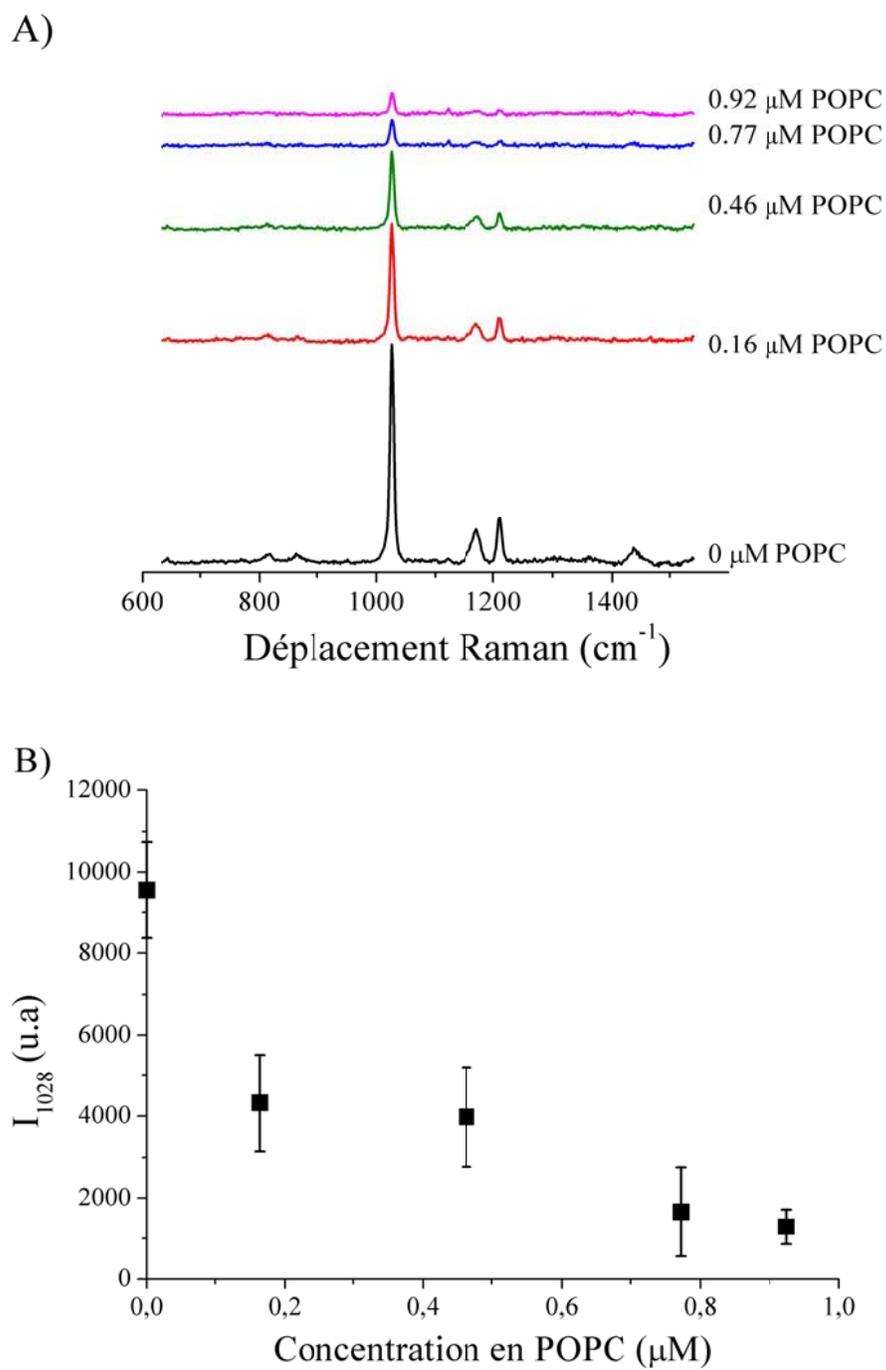


Figure 5.4 : Diminution de l'intensité de la bande centrée autour de 1028 cm^{-1} lorsque la concentration en lipides augmente. A) Spectres SERS du CPC après ajout de différentes concentrations en POPC. Pour plus de clarté, les spectres ont été décalés. B) I_{1028} en fonction de la concentration en POPC.

5.4.1.5 K_{SERS} du transfert du CPC vers des membranes de POPC

Si on considère que le détergent inséré dans la membrane ne participe plus au signal SERS, et que dans le régime I, la variation de l'intensité de la bande à 1028 cm^{-1} du CPC est linéaire en fonction de la concentration totale, alors on peut déduire en se basant sur l'équation 5.4, que :

$$\frac{C_{d,m}}{C_{d,w}} = \frac{I_0 - I}{I} = K_{SERS} \cdot (C_{d,m} + C_L) \quad \text{Équation. 5.5}$$

où I_0 est l'intensité initiale du détergent monomère dans l'eau; I est l'intensité du détergent monomère dans l'eau dans le mélange (détergent + lipide). Dans ce cas $(I_0 - I)$ est l'intensité du détergent lié à la membrane dans le mélange (détergent + lipide).

Et si on trace $\frac{I_0 - I}{I}$ en fonction de $(C_{d,m} + C_L)$, on devrait obtenir une droite passant par 0 dont la pente donne la constante K_{SERS} . Un exemple, pour une concentration NaCl de 100 mM, est donné dans la figure 5.5. Les données ont été simulées en forçant la droite à passer par 0 et en pondérant chacune des valeurs à partir de leur incertitude. À 100 mM NaCl, la concentration de CPC est maintenue constante à 5 μM . La constante d'affinité obtenue par cette approche pour le système CPC/POPC est de $550 \pm 210\text{ mM}^{-1}$ ($n = 4$).

Les résultats SERS obtenus à 100 mM en NaCl sont regroupés dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1 : Bilan des résultats obtenus pour la constante d'affinité entre le CPC et le POPC et pour la CMC du CPC à 100 mM NaCl selon le SERS.

SERS	NaCl 100 mM
CPC total (μM)	5
K (mM^{-1})	550 ± 210
CMC CPC (μM)	50

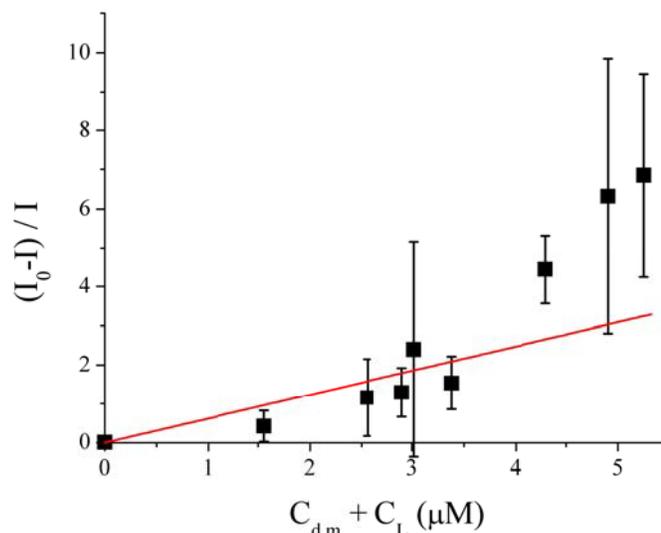


Figure 5.5 : Détermination de la constante d'affinité CPC/POPC par SERS. La droite est donnée par l'équation 5.5 de pente K_{SERS} . $[\text{CPC}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$. K_{SERS} est évaluée à 550 mM^{-1} .

5.4.2 Résultats obtenus par ITC

5.4.2.1 CMC du CPC

Dans un premier temps, la CMC du CPC est déterminée par ITC pour une concentration en NaCl de 100 mM. Une titration typique est montrée dans la figure 5.6. Les premières injections correspondent à la démicellisation dans le tampon des micelles de CPC contenues dans la seringue. Dans le cas présenté, la démicellisation est un processus endothermique. Au fur et à mesure que le CPC micellaire est injecté, sa concentration dans la cellule augmente. À un certain point, les micelles de CPC injectées ne se démicellent plus puisque la concentration dans la cellule a atteint la CMC. Subséquemment, la chaleur détectée à chaque nouvelle injection atteint un plateau qui correspond à l'enthalpie de dilution des micelles de CPC dans la cellule. La dérivée première de cette titration peut être

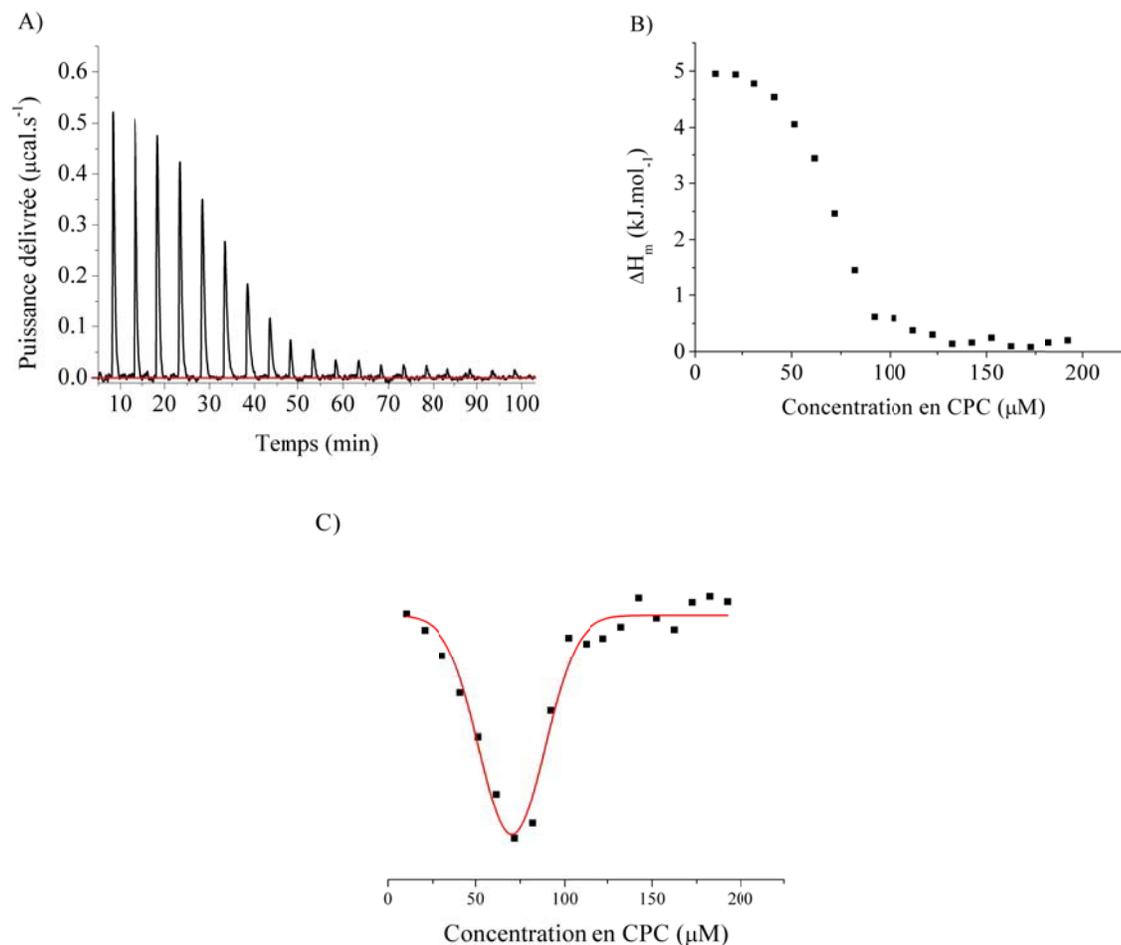


Figure 5.6 : Expérience ITC pour la détermination de la CMC du CPC à 100 mM en NaCl. La concentration de CPC dans la seringue est de 5 mM et 3 μL de cette solution sont injectés dans la cellule qui contient initialement le tampon. A) Titrage isotherme. B) Valeurs d'enthalpie enregistrées (par mole d'injectant) en fonction de la concentration de CPC dans la cellule après chaque injection. Le point d'inflexion donne la CMC. C) Dérivée première de cette courbe dont le maximum donne la CMC qui est évaluée à 67.9 μM .

simulée par une gaussienne et la CMC est évaluée par son maximum. Ainsi, la CMC du CPC est estimée à $67.9 \pm 1.5 \mu\text{M}$ ($n = 5$).

De cette titration, l'enthalpie de micellisation (ΔH_{mic}) peut aussi être déterminée : elle correspond à la différence entre l'enthalpie molaire des premières injections (dilution et démicellisation) et l'enthalpie molaire des dernières injections (dilution des micelles) et est égale à $-4.63 \pm 0.09 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

À 10 mM en NaCl, la CMC est évaluée à $184 \pm 9 \mu\text{M}$ ($n = 4$) avec une enthalpie de micellisation ΔH_{mic} de $-4.8 \pm 0.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Cette valeur d'enthalpie est égale à la valeur déterminée par L. Marcotte *et al.* bien que la CMC était dans ce cas de $84 \pm 8 \mu\text{M}$. Il faut noter cependant que la force ionique était plus grande que celle de la présente étude (10 mM NaCl, 10 mM Mes, 5 mM EDTA, pH 6.5).¹⁹ En accord avec les résultats déterminés par Varade *et al.* et Simončič *et al.*, l'augmentation dans la quantité de NaCl fait diminuer la CMC du CPC. La présence du NaCl écrante les charges portées par les groupements polaires et réduit les répulsions électrostatiques entre les têtes polaires, ce qui a pour effet de favoriser la micellisation.^{20,21}

5.4.2.2 K_{ITC} du transfert du CPC vers des membranes de POPC

La constante de partage K_{ITC} du CPC entre la phase aqueuse et la phase lipidique est déterminée selon une méthode établie.^{4,10,11,22-24} Dans un premier temps, la constante d'affinité et l'enthalpie molaire de transfert ΔH_{m} ont été déterminées par ITC à 100 mM en NaCl. Une suspension de POPC contenue dans la seringue est injectée dans la cellule contenant le CPC concentré à $40 \mu\text{M}$. Cette concentration est la concentration maximale à laquelle le CPC est encore principalement sous forme de monomère, ce qui maximise le signal détecté. Une titration typique est montrée dans la figure 5.7A. Lors des premières injections de lipides dans la cellule, le détergent s'insère dans la membrane et provoque une variation de la chaleur de réaction h_i . Au fur et à mesure que la POPC est injectée, de moins en moins de CPC monomère libre en solution est disponible et la

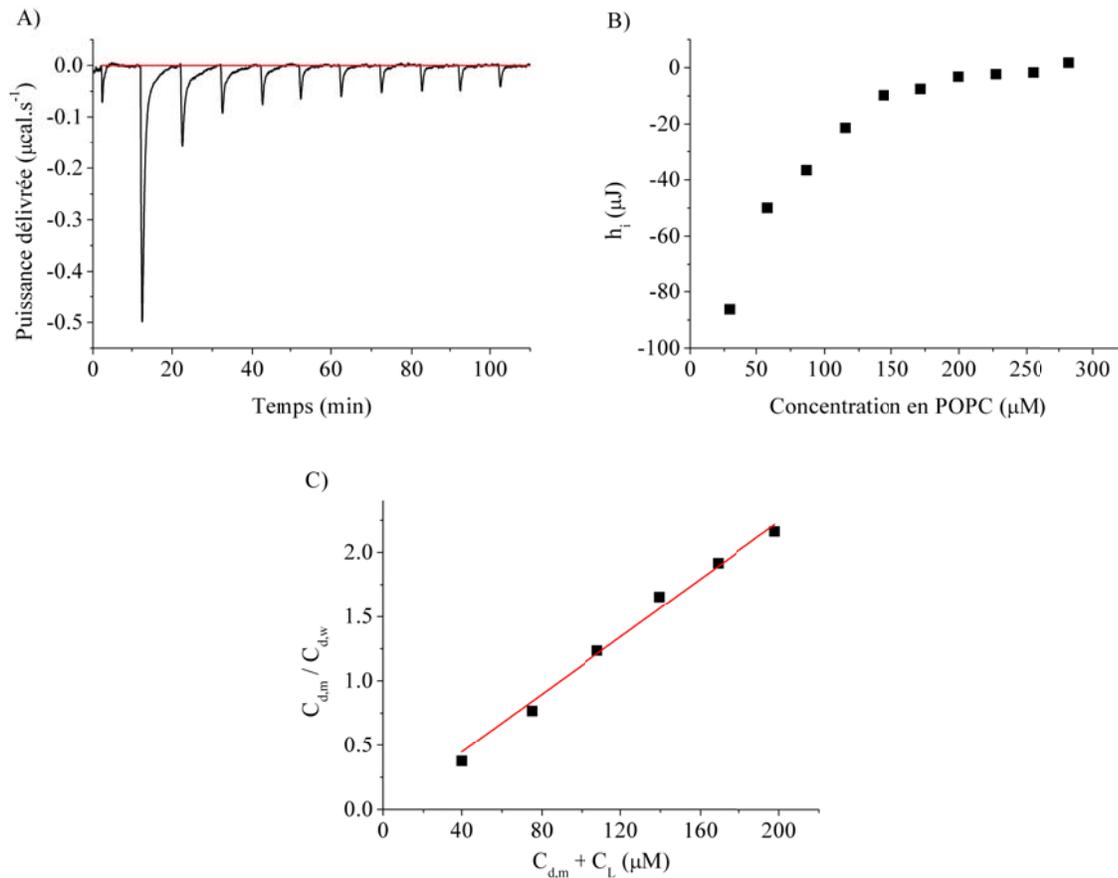


Figure 5.7 : Expérience ITC typique pour la détermination de la constante d'affinité K du CPC (40 μM dans la cellule) pour une membrane de POPC (100 mM en NaCl). A) Titrage isotherme tel qu'enregistré. Puissance délivrée en fonction du temps. Les derniers pics représentent l'enthalpie de dilution. B) Enthalpie h_i (après soustraction de l'enthalpie de dilution) en fonction de la concentration en lipides injectés. C) Détermination de la constante K selon l'équation 5.4. ΔH_m a été optimisé afin d'obtenir une droite; sa pente représente K.

quantité de chaleur détectée h_i diminue, jusqu'à atteindre un plateau lorsque la totalité du détergent disponible est inséré dans les bicouches. Une fois ce plateau atteint, les chaleurs de réaction détectées correspondent à la dilution des différents composés dans la cellule. La moyenne des 3 à 5 derniers pics donne l'enthalpie de dilution (dh_{dil}).

L'enthalpie h_i associée à chaque injection est obtenue par intégration de chaque pic de l'isotherme (fig. 5.7B). Chaque valeur de h_i est proportionnelle à la quantité de détergent transféré vers la membrane. Dans le modèle utilisé par Heerklotz et Seelig⁴ et Hoyrup *et al.*,¹¹ la concentration de détergent insérée dans la membrane était négligée par rapport à la concentration de lipide constituant la membrane ($C_{d,m} \ll C_L$). Cependant, dans nos conditions, celle-ci n'est pas négligeable et il faut modifier le modèle pour en tenir compte. Pour définir la constante d'affinité K_{ITC} à partir de la pente de la droite donnée par l'équation 5.4, il faut calculer $C_{d,m}$ et $C_{d,w}$. La concentration de CPC lié à la membrane est reliée à l'enthalpie molaire de transfert du CPC de l'eau vers la membrane (ΔH_m) et à la somme des enthalpies associées à chaque injection i ($\sum h_i$) selon l'équation suivante :

$$\sum h_i = n_{d,m} \cdot \Delta H_m = C_{d,m} \cdot V_{tot,cell} \cdot \Delta H_m \quad \text{Équation 5.6}$$

où $n_{d,m}$ est le nombre de moles de CPC inséré dans la membrane. Chaque valeur d'enthalpie h_i a été au préalable corrigée pour la dilution du CPC et du POPC dans la cellule. Par la suite :

$$C_{d,m} = \frac{\sum h_i}{(\Delta H_m \cdot V_{tot,cell})} \quad \text{Équation 5.7}$$

$C_{d,w}$ est calculé à partir de $C_{d,m}$, sachant que :

$$C_{d,w} = C_{CPC,cell} - C_{d,m} \quad \text{Équation 5.8}$$

Enfin, la concentration de lipide injectée dans la cellule est calculée comme telle :

$$C_L = \frac{C_{L,ser} \cdot i \cdot V_i}{V_{tot,cell}} \quad \text{Équation 5.9}$$

où $C_{L,ser}$ est la concentration de lipide dans la seringue divisée par 2 pour prendre en compte le fait que le transfert a lieu seulement dans le feuillet externe de la bicouche. En effet, il a été démontré que le flip-flop du CPC du feuillet externe vers le feuillet interne est un phénomène lent par rapport à l'échelle de temps des expériences ITC.¹⁹ V_i représente le volume d'injection et i le nombre d'injection. Parce que le calorimètre détecte la chaleur sur un volume constant et que le trop-plein est déplacé dans un capillaire, les concentrations en lipides et en CPC doivent être corrigés comme indiqué dans le manuel de l'appareil.²⁵

Un exemple est donné dans la figure 5.7C où $\frac{C_{d,m}}{C_{d,w}}$ est tracé en fonction de

$(C_{d,m} + C_L)$. Au bilan, pour la simulation des données à partir de l'équation 5.4, les seuls paramètres inconnus sont K_{ITC} et la valeur de l'enthalpie molaire de transfert ΔH_m . Celle-ci est optimisée de manière à ce que la courbe obtenue s'approche le plus possible d'une droite; la pente donne alors la constante K_{ITC} . Dans ces conditions, la constante K est évaluée à $20 \pm 12 \text{ mM}^{-1}$ avec une enthalpie molaire ΔH_m de l'ordre de $-5.2 \pm 0.3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($n = 2$). Comme il a déjà été mentionné, les enthalpies de transfert des détergents sont de faibles amplitudes. Il est donc important d'évaluer l'amplitude du signal par rapport au signal de fond. Ce signal inclut à tout le moins la chaleur due à la friction de la seringue, $dh_{friction}$. Le rapport entre cette valeur et la valeur d'enthalpie du premier pic, $dh_{i=1}$, (correspondant à la première injection) est de $1.6 \pm 0.5 \%$, ce qui semble négligeable.

Les résultats obtenus par ITC sont rassemblés dans le tableau 5.2. En comparant les résultats obtenus par chaque méthode, les CMC déterminées par ITC à 10 et 100 mM en NaCl sembleraient correspondre à l'entrée dans le régime III observé en SERS. Par contre, K_{ITC} est largement inférieure à K_{SERS} à 100 mM NaCl.

Tableau 5.2 : Bilan de la titration entre le CPC et le POPC et de la CMC du CPC déterminées à 100 mM en NaCl selon l'ITC.

ITC	NaCl 100 mM
CPC total dans la cellule (μM)	40
K_{ITC} (mM^{-1})	20 ± 12
ΔH_{m} ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	-5.2 ± 0.3
$\frac{dh_{\text{friction}}}{dh_{i=1}}$ (%)	1.6 ± 0.5
CMC CPC (μM)	67.9 ± 1.5

5.4.2.3 Détermination de la constante d'affinité par ITC pour différentes concentrations en CPC

Une différence fondamentale entre les conditions SERS et ITC est la concentration en CPC. Afin de cerner l'effet de ce paramètre, le système a été examiné par ITC pour différentes concentrations en CPC. Il est d'abord utile de mentionner que les enthalpies h_i obtenues à 100 mM NaCl pour une concentration de 40 μM en CPC (dans la cellule) sont faibles. En comparant aux résultats obtenus à 10 mM NaCl, le signal ITC est meilleur à 10 mM qu'à 100 mM NaCl, le ΔH_{m} étant plus important. Ainsi, des expériences pour tenter d'optimiser les conditions d'analyses ont été menées à 10 mM NaCl. À 10 mM en NaCl, K_{ITC} est évaluée à $6.7 \pm 1.2 \text{ mM}^{-1}$ et $\Delta H_{\text{m}} = -9.1 \pm 1.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ pour une concentration totale en CPC de 100 μM ($n = 7$). La constante K_{ITC} est différente de celle obtenue dans une étude précédente ($35 \pm 14 \text{ mM}^{-1}$) alors que ΔH_{m} est du même ordre de grandeur ($-9.3 \pm 3.3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$).¹⁹ Cette différence peut venir du fait que les tampons utilisés sont sensiblement différents (dans le cas de Marcotte *et al.*, le tampon utilisé était composé de 10 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM MES, pH 6.5). L'affinité a été caractérisée pour différentes concentrations en CPC, à savoir 20, 30 et 40 μM . Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 5.3. Ce tableau inclut

Tableau 5.3 : Valeurs des constantes d'affinité K , des enthalpies molaires de transfert ΔH_m , des énergies de Gibbs molaires de transfert ΔG_m , des entropies molaires de transfert ΔS_m , de la composante entropique, des rapports entre l'enthalpie due à la friction de la seringue ($dh_{friction}$) et l'enthalpie associée au premier pic d'injection ($dh_{i=1}$) et des rapports entre l'enthalpie de dilution (dh_{dil}) et l'enthalpie associée au premier pic d'injection ($dh_{i=1}$) déterminés pour le transfert du CPC depuis l'eau vers la membrane de POPC à différentes concentrations totales en CPC dans la cellule et pour une concentration en NaCl de 10 mM.

[CPC] _{cell,tot} (μM)	20	30	40	100
K_{ITC} (mM ⁻¹)	58 ± 30	19 ± 1	15 ± 3	6.7 ± 1.2
ΔH_m (kJ · mol ⁻¹)	-1.6 ± 1.3	-1.6 ± 0.4	-3.3 ± 2.2	-9.2 ± 1.8
ΔG_m (kJ · mol ⁻¹)	-36.9 ± 1.4	-34.3 ± 0.2	-33.8 ± 0.6	-31.8 ± 0.4
ΔS_m (J · mol ⁻¹ · K ⁻¹)	118 ± 9	110 ± 2	102 ± 9	76 ± 6
Composante entropique (%)	95 ± 4	95 ± 2	90 ± 7	71 ± 6
$\frac{dh_{friction}}{dh_{i=1}}$ (%)	17 ± 7	17 ± 3	13 ± 7	1.3 ± 0.9
$\frac{dh_{dil}}{dh_{i=1}}$ (%)	29 ± 9	40 ± 9	24 ± 10	6 ± 5

les rapports d'enthalpie $\frac{dh_{friction}}{dh_{i=1}}$ et $\frac{dh_{dil}}{dh_{i=1}}$ (qui représentent l'importance des enthalpies de friction et de dilution par rapport au signal, respectivement).

Les valeurs obtenues pour K_{ITC} ont été rassemblés dans la figure 5.8. Cette figure indique que, pour la gamme de concentration en CPC étudiée, K_{SERS} est bien plus grande que K_{ITC} .

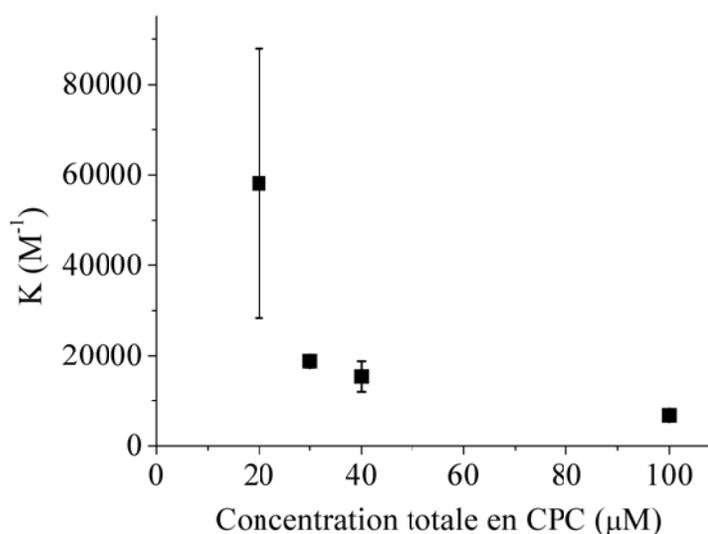


Figure 5.8 : Constante d'affinité K_{ITC} en fonction de la concentration totale en CPC.

Les résultats obtenus semblent cependant suggérer que la constante d'affinité varie avec la concentration totale en CPC. Plus la concentration totale en CPC diminue, plus la constante augmente. Un test de Student (à 95 % de confiance) réalisé sur ces valeurs montre que la valeur obtenue à 100 μM est statistiquement différente des valeurs déterminées aux concentrations plus faibles. Les valeurs de constantes déterminées à 20, 30 et 40 μM ne sont pas statistiquement différentes. Les valeurs de ΔH_m , pour les concentrations de 20 et 30 μM, sont égales et elles sont plus faibles que celles déterminées à 40 et 100 μM. Ces dernières sont du même ordre de grandeur que celle déterminée par

Marcotte *et al.* qui avaient utilisé une concentration de 20 μM en CPC.¹⁹ Le terme ΔH_m semble augmenter avec la concentration en CPC. Comme la K_{ITC} diminue avec la concentration, ceci signifie que le terme ΔS_m augmente avec la diminution de concentration de CPC. Le terme entropique associé au transfert du CPC de l'eau à la bicouche représente 71%, 90%, 95% et 95% de la variation d'énergie de Gibbs pour une concentration totale en CPC de 100, 40, 30 et 20 μM respectivement. Une croissance du terme entropique pourrait être associée à une augmentation des interactions hydrophobes, une interaction principalement entropique. Il semblerait donc que le transfert du CPC vers la membrane de POPC soit de plus en plus contrôlé par les interactions hydrophobes lorsque la concentration en CPC diminue.

Il est à noter que les rapports $\frac{dh_{friction}}{dh_{i=1}}$ et $\frac{dh_{dil}}{dh_{i=1}}$ dans ces expériences

augmentent au fur et à mesure que la concentration en CPC diminue dans la cellule. Ceci est attendu puisque la quantité de CPC transférée de la phase aqueuse à la bicouche diminue. Ainsi, la chaleur détectée associée au transfert du CPC est de plus en plus faible. Les corrections effectuées pour l'enthalpie de dilution sont alors de plus en plus importantes.

5.5 Discussion

L'ITC est une méthode bien connue pour sa capacité à déterminer la CMC d'un détergent. Par cette méthode, la CMC du CPC à 100 mM NaCl a été évaluée à 67.9 μM et à 184 μM à 10 mM NaCl. Dans l'eau, la CMC du CPC a été évaluée aux alentours de 1 mM par différentes méthodes, de 80 à 150 μM en présence de 10 mM NaCl et autour de 35 μM à 100 mM NaCl.^{19,21,26,27} Dans le cas du SERS, une brisure dans l'augmentation de l'intensité du signal du CPC concorde avec la CMC : elle a été observée à 50 et 175 μM à 100 mM et 10 mM NaCl respectivement. Il semblerait donc que l'incapacité du CPC à

interagir avec le colloïde d'argent lorsqu'il est inséré dans la micelle soit vérifiée et que celui-ci contribue d'une manière beaucoup plus limitée au signal SERS.

Le signal SERS du cycle pyridinium disparaît au fur et à mesure qu'une quantité de POPC est injectée dans la solution. L'hypothèse selon laquelle le CPC inséré dans la membrane ne peut plus interagir avec le colloïde d'argent (et mener à l'exaltation du signal) semble correcte, au même titre que dans le cas de la micelle. Ainsi, il devient possible de calculer la constante K . Cependant, les valeurs de constante calculée par les méthodes SERS et ITC sont très différentes (K_{SERS} est supérieure aux valeurs déterminées par ITC).

L'évolution du système entre les conditions SERS et ITC pourrait être à l'origine de la différence de K . Par exemple, la valeur de la constante de partage pourrait varier avec la concentration en CPC. Ce phénomène a aussi été observé par Moreno *et al.* dans le cas du dodécylsulfate de sodium (SDS) avec des membranes de POPC.⁷ Dans ces expériences ITC, des concentrations en SDS variant de 0.5 à 50 μM ont été examinées. Les auteurs ont montré que plus la concentration en SDS diminuait, plus la constante augmentait, jusqu'à atteindre un plateau. Ils ont attribué cette variation aux perturbations de la membrane lorsque la quantité de SDS insérée commence à être élevée. Ainsi, pour des concentrations élevées en SDS lié, la constante mesurée serait celle du SDS pour une membrane « perturbée » et la « constante réelle » (ou pour une bicouche intacte de POPC) serait obtenue à de plus faibles concentrations en détergent. De manière analogue, la différence entre K_{SERS} et K_{ITC} à des concentrations de CPC différentes pourrait être associée à une différence de la membrane, plus perturbée quand la concentration de CPC est élevée.

De même que la membrane lipidique pourrait être « perturbée », le détergent lui-même pourrait être « perturbé ». D'une manière générale et simple, il est communément admis qu'un amphiphile, capable de s'associer en micelles, passe brusquement de la phase monomère vers la phase micellaire. Ceci est évidemment une vision idéalisée du comportement de tels systèmes. Plusieurs études nuancent ce modèle et indiquent que le passage monomère vers micelle passe par la formation d'agrégats pré-micellaires. La

présence de ces agrégats pré-micellaires a été suggérée et mise en évidence pour différents amphiphiles,²⁸⁻³² notamment pour le CPC.³³ Ces agrégats peuvent avoir un comportement différent de la forme monomère. Le SERS permet d'atteindre de très faibles concentrations. L'expérience pour déterminer la CMC du détergent suggère la présence de trois régimes dans le comportement du CPC en fonction de sa concentration (fig. 5.5). Comme mentionné dans la section 5.4.1.3, le régime II pourrait correspondre à des agrégats pré-micellaires, état intermédiaire entre le CPC monomère et le CPC micellaire.^{28-30,32,33} Une pré-agrégation du CPC pourrait expliquer une augmentation de l'intensité plus faible dans ce régime, le contact entre le détergent et le colloïde d'argent étant potentiellement limité. Il serait alors possible que le CPC ne soit pas dans la même phase lorsque les expériences sont réalisées en SERS (5 μM , régime I) par rapport à l'ITC (40 μM , régime II). Dans les conditions SERS, le CPC est possiblement dans sa véritable forme monomère. Les chaînes alkyles hydrophobes du CPC se retrouveraient entourées d'eau et de ce fait, présenteraient une très forte affinité pour la membrane de POPC qui leur offre un environnement hydrophobe. Dans les conditions ITC, le CPC pourrait s'être pré-agrégé et, sous cette forme, le contact entre les chaînes du CPC et l'eau pourrait être limité. Donc la tendance du CPC à s'insérer dans la membrane de POPC se trouverait amoindrie. Ceci pourrait expliquer la constante K_{ITC} plus faible que K_{SERS} . La contribution entropique à la variation d'énergie libre de l'association semble augmenter avec la diminution de la concentration en CPC, suggérant que l'insertion du CPC dans la membrane de POPC est, à faible concentration en CPC, plus contrôlée par les interactions hydrophobes. Cette observation pourrait être corrélée avec l'état d'agrégation du CPC.

Il est important de noter que certains détails expérimentaux peuvent conduire à une certaine inexactitude des valeurs de constante obtenues, voire des artefacts affectant de manière significative la validité de la méthode. D'abord, il faut souligner qu'en ITC aussi bien qu'en SERS, une quantité faible de POPC est ajoutée à une grande quantité de CPC, surtout pendant les premières injections. Selon les $C_{d,m}$ calculées en SERS et en ITC (pour les plus faibles concentrations en CPC), il s'avère que l'on retrouve dans la bicouche quelques molécules de CPC pour une molécule de POPC. Par exemple, on retrouve au début du titrage ITC de 0.2 à 4 molécules de CPC par molécule de POPC. Pour le SERS,

les conditions correspondant aux plus fortes proportions de CPC mènent à 2 à 18 molécules de CPC par POPC. Ceci conduit à une grande proportion de détergent dans la membrane. Ce grand rapport soulève la question à savoir si, dans ces conditions, la membrane de POPC est encore sous forme de bicouche puisqu'il est connu qu'à un rapport $\frac{C_{d,m}}{C_L}$ élevé, la membrane saturée en détergent peut se désintégrer et former, par exemple, des micelles mixtes composées de détergents et de lipides.⁴ Dans un tel cas, les constantes d'affinité obtenues ne se réfèreraient pas au transfert du CPC vers une bicouche mais plutôt du CPC vers une phase non-lamellaire ou, à tout le moins, comme indiqué au paragraphe précédent, au transfert vers une bicouche perturbée.⁷ Pour de plus grandes concentrations en lipides, la bicouche serait vraisemblablement maintenue. Les premières injections correspondent aux premiers points de chaque droite. Or ces premiers points semblent parfaitement intégrés dans la droite, suggérant que le système reste dans le même état durant le titrage. Cette remarque pourrait être associée avec une étude menée par L. Marcotte *et al.* où ils ont mené des expériences à de hautes concentrations en CPC (15 mM) par rapport à la quantité de POPC (10 mM) ($\frac{C_{d,tot}}{C_L} = 1.5$).¹⁹ Les résultats ont montré que le changement de morphologie de la membrane de POPC était un processus très lent comparé aux expériences menées dans cette étude. Ils ont identifié qu'une incubation de 2 jours était nécessaire avant l'observation des premières vésicules perforées qui mènent subséquentement à l'obtention de micelles mixtes.¹⁹

Un deuxième phénomène pourrait affecter les résultats des expériences SERS. Lors de ces expériences, un équilibre entre le CPC dans l'eau et le CPC dans la membrane est considéré. Cependant, il n'est pas exclu qu'il existe aussi un équilibre entre le CPC dans l'eau et le CPC adsorbé à la surface du colloïde d'argent. Ainsi si cette dernière quantité est significative, ce phénomène mène à une concentration de CPC libre en solution plus petite que calculée et aurait pour effet de diminuer la quantité de CPC réellement inséré dans la membrane. On ne peut pas exclure que la présence des colloïdes vient perturber les équilibres en jeu mais, si ce phénomène contribue à l'écart observé entre K_{ITC} et K_{SERS} , il le fait d'une manière complexe.

Un troisième point doit être pris en considération dans l'exactitude des résultats concerne l'évaluation des enthalpies en ITC. Même si K_{ITC} semble augmenter lorsque la concentration en CPC diminue, il faut noter que le rapport $\frac{dh_{friction}}{dh_{i=1}}$ est important pour les faibles concentrations en CPC, affectant considérablement les valeurs de K_{ITC} . En effet, dans les conditions où les rapports $\frac{dh_{friction}}{dh_{i=1}}$ s'élèvent à environ 20% (tableau 5.3), la correction associée à l'enthalpie de dilution devient capitale pour une bonne évaluation de la constante d'affinité. Une surévaluation de l'enthalpie de dilution peut faire artificiellement augmenter cette constante.

5.6 Conclusion

En conclusion, un essai de mise en place d'une méthode de détermination de constante d'affinité entre le CPC et la POPC, sans séparation de phase, a été décrit. Cette méthode, basée sur l'exaltation du signal Raman (SERS) du cycle pyridinium du CPC centré à 1028 cm^{-1} , a été comparée à la méthode ITC. Les premiers résultats ont montré que, comme pour la pyridine,¹² le signal Raman du cycle pyridinium lié à une chaîne alkyle peut être exalté par un colloïde d'argent et qu'il est possible d'enregistrer des spectres de qualité à des concentrations de CPC de l'ordre du μM . L'hypothèse de base permettant la détermination de la constante par SERS est que le CPC inséré dans la membrane de POPC (ou dans une micelle) ne peut s'adsorber à la surface du colloïde d'argent afin d'obtenir une exaltation du signal, et donc ne participe pas au signal SERS. Un deuxième résultat a montré une dépendance de l'intensité du signal SERS et des signaux ITC avec la concentration en NaCl. Concernant la CMC, les résultats ont montré des similarités. La variation du signal SERS en fonction de la concentration totale en CPC a permis de proposer 3 régimes dans le comportement du détergent : le régime I correspondant au CPC monomère s'étend jusqu'à $5\ \mu\text{M}$ à $100\ \text{mM NaCl}$ ($1.25\ \mu\text{M}$ à $10\ \text{mM NaCl}$). Le régime III commence aux alentours de $50\ \mu\text{M}$ à $100\ \text{mM NaCl}$ ($175\ \mu\text{M}$ à $10\ \text{mM NaCl}$) et correspondrait à la formation des micelles. Entre les deux se trouverait

le régime II, correspondant à un état intermédiaire. Il a été proposé que cet état intermédiaire corresponde à la formation d'agrégats pré-micellaires. Concernant la constante d'affinité, bien que l'hypothèse de départ semble refléter une certaine réalité, le modèle SERS montre des divergences avec le modèle ITC. Les K_{SERS} sont bien supérieurs aux K_{ITC} . Étant donné que la seule différence entre les deux types d'expériences en est la concentration totale en CPC, des expériences ont été menées en ITC pour cerner l'effet de ce paramètre. Les résultats ont montré une dépendance de la constante avec la concentration en CPC : plus la concentration est basse, plus la constante est élevée. Ce phénomène a aussi été observé pour le SDS.⁷ Dans le cas du SERS, le CPC serait possiblement sous forme de monomère, ce qui pourrait favoriser son insertion dans un environnement hydrophobe et mener à un K_{SERS} élevé. Dans le cas de l'ITC, le CPC pourrait être sous forme d'agrégats pré-micellaires, ce qui pourrait pré-stabiliser les chaînes. Par rapport aux conditions utilisées dans les expériences SERS, leur tendance à vouloir s'insérer dans un milieu hydrophobe pourrait être amoindrie et donc K_{ITC} serait plus faible. Selon cette hypothèse, il se pourrait que le SERS soit un outil sensible pour l'étude des agrégats pré-micellaires. Il faut tout de même garder en tête que les valeurs de constante calculées par les deux méthodes peuvent être erronées au vu des conditions expérimentales utilisées. Pour pouvoir se faire une idée plus précise, il faudrait soit refaire les expériences ITC en utilisant un nanocalorimètre, soit éprouver ces résultats à l'aide d'une troisième méthode. Dans tous les cas, il faut que la méthode soit suffisamment sensible pour atteindre de très faibles concentrations.

5.7 Références

1. Denyer, S. P. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **1995**, 36, 227.
2. Przystalski, S.; Sarapuk, J.; Kleszczynska, H.; Gabrielska, J.; Hladyszowski, J.; Trela, Z.; Kuczera, J. *Acta Biochim. Pol.* **2000**, 47, 627.
3. Denyer, S. P. *Int. Biodeterior.* **1990**, 26, 89.

4. Heerklotz, H.; Seelig, J. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1508, 69.
5. le Maire, M.; Møller, J. V.; Champeil, P. *Biochemistry* **1987**, 26, 4803.
6. Kragh-Hansen, U.; le Maire, M.; Møller, J. V. *Biophys. J.* **1998**, 75, 2932.
7. Moreno, M. J.; Bastos, M.; Velazquez-Campoy, A. *Anal. Biochem.* **2010**, 399, 44.
8. Muniz-Miranda, M. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 340, 437.
9. Bartlett, G. R. *The Journal of Biological Chemistry* **1958**, 234, 466.
10. Wenk, M. R.; Seelig, J. *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 5224.
11. Høyrup, P.; Davidsen, J.; Jørgensen, K. *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 2649.
12. Creighton, J. A.; Blatchford, C. G.; Albrecht, M. G. *J. Chem. Soc. Farad. T 2* **1979**, 75, 790.
13. Koglin, E.; Tarazona, A.; Kreisig, S.; Schwuger, M. *J. Colloid Surface A* **1997**, 123-124, 523.
14. Wenning, U.; Pettinger, B.; Wetzel, H. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 70, 49.
15. Xu, H.; Aizpurua, J.; Käll, M.; Apell, P. *Phys. Rev. E* **2000**, 62, 4318.
16. Moskovits, M. *Rev. Mod. Phys.* **1985**, 57, 783.
17. Nie, S.; Emory, S. R. *Science* **1997**, 275, 1102.
18. Julien, C. *Physics Ph. D. degree, Université Paris-Sud 11, Paris*, **2004**.
19. Marcotte, L.; Barbeau, J.; Edwards, K.; Karlsson, G.; Lafleur, M. *Colloid Surface A* **2005**, 266, 51.
20. Varade, D.; Joshi, T.; Aswal, V. K.; Goyal, P. S.; Hassan, P. A.; Bahadur, P. *Colloid Surface A* **2005**, 259, 95.
21. Simončič, B.; Špan, J. *Acta Chim. Slov.* **1998**, 45, 143.
22. Tan, A.; Ziegler, A.; Steinbauer, B.; Seelig, J. *Biophys. J.* **2002**, 83, 1547.
23. Chen, X.; Kwak, S.; Lafleur, M.; Bloom, M.; Kitson, K.; Thewalt, J. *Langmuir* **2007**, 23, 5548.

24. Majhi, P. R.; Moulik, S. P. *Langmuir* **1998**, 14, 3986.
25. Microcal, ITC data analysis in Origin. Northampton, MA, **1998**.
26. Molinero, I.; Sierra, M. L.; Valiente, M.; Rodenas, E. J. *Chem. Soc. Faraday T* **1996**, 92, 59.
27. Bhat, M. A.; Dar, A. A.; Amin, A.; Rashid, P. I.; Rather, G. M. J. *Chem. Thermodyn.* **2007**, 39, 1500.
28. Kanicky, J. R.; Shah, D. O. *Langmuir* **2003**, 19, 2034.
29. Kunjappu, J. T.; Somasundaran, P. *Langmuir* **1995**, 11, 428.
30. Wängnerud, P.; Jönsson, B. *Langmuir* **1994**, 10, 3542.
31. Qian, R.-Y.; Botsaris, G. D. *Chem. Eng. Sci.* **1997**, 52, 3429.
32. Wei, D.; Ge, L. J. *Phys. Chem. B* **2010**, 114, 3472.
33. Sasaki, S. J. *Phys. Chem. B* **2009**, 113, 8545.

Chapitre 6

Conclusion

Au cours de ce projet, nous avons étendu la possibilité de former des LUVs composés d'amphiphiles monoalkylés et de stérols en utilisant d'autres amphiphiles. Cette capacité n'est donc pas confinée mais semble être relativement générale pour plusieurs mélanges amphiphiles monoalkylés/stérols. Ces mélanges doivent former une phase L_o . L'obtention de cette phase est possible lorsque plusieurs conditions sont réunies. D'abord, une proportion entre 50 et 70 % en stérol semble indiquer une proportion optimum. En-dessous de 50 %, la phase L_o est en équilibre avec d'autres phases. Au-delà de 70 %, le stérol atteint sa limite de solubilité dans la membrane et cristallise.^{1,2} Ensuite, la longueur de la chaîne alkyl de l'amphiphile doit se situer aux alentours de la longueur du stérol ($\sim 16 \text{ \AA}$).³ De plus, la chaîne alkyl du stérol ne doit pas être trop volumineuse (comme quand un substituant est placé en position C24 par exemple)⁴ car cela perturbe l'empilement entre l'amphiphile et le stérol. D'autre part, les interactions électrostatiques de surface semblent aussi contrôler les propriétés de mélange de ces systèmes, comme cela a été le cas pour les systèmes FA/stérols.^{5,6} En outre, les interactions attractives entre la charge positive portée par le CPC ou l'AzoC₁₀N⁺ et la charge négative du Schol ont favorisé le mélange de ces molécules. Ces interactions de surface entre les molécules constituant la bicouche ont aussi permis d'obtenir la phase L_o dans le cas du système CPC/Chol par mélange du CPC avec le Chol; ceci pourrait se produire afin de minimiser les répulsions électrostatiques entre les charges positives du CPC. Enfin, le rôle des interactions électrostatiques de surface peut aussi être étendu au cas du système OMSO/Chol.⁷ Dans ce mélange, un réseau de liaisons hydrogène, soit entre elles, soit par le biais des molécules d'eau environnantes

semble favoriser le mélange. Cet exemple suggère que des interactions de surface de différente nature peuvent jouer un rôle dans l'obtention de la phase L_o . Ces systèmes peuvent être extrudés pour obtenir des LUVs qui sont aussi appelés stérosomes car leur particularité majeure est d'être riche en stérol. Ces stérosomes possèdent des capacités d'encapsulation similaires aux systèmes conventionnels mais ont une faible perméabilité passive. À ce jour, les systèmes PA/Chol, PA/Chol_{0.25}/Schol_{0.75} et CPC/Schol ont gardé 65, ~ 100 et 70 % de leur contenu durant 1.5, 1 et 4.5 ans. Nous pensons que cette faible perméabilité est due à la grande quantité de stérol qui entraîne un empilement très compact entre l'amphiphile et le stérol. Dans ces systèmes, l'amphiphile pourrait remplir les interstices entre les stérols (« gap filler »). Pour le système CPC/Chol, les stérosomes obtenus ont montré une tendance rapide à l'agrégation. Il se pourrait que la répulsion électrostatique entre les liposomes soit écrantée par la force ionique de la solution, menant ainsi à leur agrégation. Au niveau de la libération induite, les systèmes incluant des amphiphiles sensibles au pH ont donné des LUVs sensibles au pH^{5,6,8} et la libération du contenu a pu être contrôlée par le pKa de l'acide gras et la nature du stérol (chapitre 2 de cette thèse).⁶ Des stérosomes incorporant des molécules portant des charges positives ont aussi été créés.^{7,9} L'insertion d'amphiphiles portant un groupement azobenzène a donné des LUVs photo-sensibles. Les propriétés de libération des stérosomes sont liées à la nature de l'amphiphile. Il serait donc possible de rendre ces stérosomes sensibles à différents types de stimuli externes en incorporant l'amphiphile approprié. Même si les stérosomes présentent une faible perméabilité passive, leur fonctionnalisation permet d'accroître la libération de l'agent encapsulé à un endroit et/ou à des moments privilégiés.

La perméabilité passive d'un système est un paramètre important pour l'industrie car une faible perméabilité permet un stockage de longue durée. D'un point de vue application, cette faible perméabilité passive constitue une amélioration par rapport aux formulations conventionnelles. Par exemple, certains médicaments hydrosolubles ne

restent pas encapsulés dans les liposomes (la vincristine, la vinorelbine et la ciprofloxacine).¹⁰ Cette incapacité à rester encapsulé peut-être cruciale pour leur efficacité thérapeutique (tel est le cas pour la vincristine). Ainsi, grâce à leur faible perméabilité passive, les stérosomes pourraient être une bonne alternative pour ce genre de médicaments. Pour certaines applications, on pourrait tirer avantage de leur faible perméabilité passive. Pour donner un exemple parmi d'autres, dans le domaine alimentaire, les liposomes sont utilisés pour encapsuler des additifs alimentaires (vitamines, enzymes, protéines, etc.) et les protéger du milieu extérieur, afin qu'ils conservent leur activité. Grâce à leur faible perméabilité, les stérosomes pourraient protéger les additifs alimentaires et leur permettraient de maintenir leur activité sur long terme.

Les stérosomes, plus particulièrement ceux formés de PA/Schol, constituent une première formulation restant stable à bas pH et libérant son contenu à haut pH. Certaines infections impliquent une augmentation de pH, comme les infections chroniques de la prostate humaine qui engendrent un pH autour de 8.4.¹¹ Le système PA/Schol pourrait être un bon candidat comme vecteur de médicament à libération contrôlée contre ce genre d'infections.

Jusqu'à présent, la majorité des stérosomes formés sont chargés. La présence de charges en surface de la bicouche peut écourter leur temps de circulation dans le corps en stimulant le système immunitaire. Si le but est de former des vaccins liposomaux, la présence des charges, surtout les charges positives, serait un avantage.

D'un point de vue fondamental, ces mélanges apportent de nouvelles connaissances sur le rôle du cholestérol dans les membranes biologiques. L'effet majeur du cholestérol est d'ordonner les chaînes lipidiques en phase fluide et de mener à la formation de la phase L_o .¹²⁻¹⁴ Cet effet entraîne des propriétés biologiques importantes comme réduire la perméabilité membranaire, réguler le comportement de phase des lipides (en l'occurrence, en faisant disparaître la T_m et donc empêcher la gélification des lipides), renforcer la membrane et mener à la formation de rafts lipidiques.¹² Les effets

du Chol sur les membranes biologiques dépendent beaucoup de la composition de la matrice lipidique et par conséquent, sa solubilité varie dans les différents types de matrices, où elle typiquement de 20-30 %.¹⁵ Dans les membranes des globules rouges, la quantité de Chol peut atteindre 50 %.¹⁶ Enfin, elle peut atteindre le seuil de 70 % dans les membranes du cristallin (situé derrière l'iris).^{17,18} Le cristallin est composé de multi-couches de lipides disposées de manières concentriques. Li *et al.* ont montré qu'une fraction du cristallin est composée de 95 % de lipides dont environ 70 % de Chol et 30 % d'un mélange formé de phospholipides double chaîne, de phospholipides monoalkylés et d'acides gras. Li *et al.* ont souligné la rigidité de cette région riche en Chol et l'ont attribuée au rapport molaire élevé entre le Chol et les lipides. Bien que le rôle du Chol ne soit pas complètement élucidé, il est possible que sa présence diminue fortement le transport de l'oxygène vers le centre des lentilles, empêchant ainsi l'oxydation des lipides, responsable de l'opacification de l'œil.¹⁸

Dans cette étude, nous montrons que le Chol peut aussi entraîner la formation de la phase L_o avec des amphiphiles monoalkylés. D'une part, la perméabilité de tels systèmes est faible et peut réduire l'oxydation des phospholipides (comme il a été suggéré dans le cas du cristallin). De même, la Lyso-PPC insérée dans les membranes de globules rouges diminue l'oxydation du Chol.¹⁹ Par extrapolation, les bicouches compactes qui peuvent être formées entre la Lyso-PPC et le Chol pourraient être à l'origine de cet effet, en défavorisant le transport de l'oxygène à travers la membrane. D'autre part, la découverte de la capacité du Chol à former des phases lamellaires avec des amphiphiles peut avoir des répercussions sur les effets d'un amphiphile monoalkylé sur les membranes biologiques. En effet, dû à leur structure, les amphiphiles monoalkylés (ou détergent) peuvent s'insérer dans une membrane et augmenter la perméabilité des cellules, jusqu'à provoquer leur lyse (comme l'effet antibactérien).²⁰⁻²² Ainsi, le fait que le Chol puisse générer des phases lamellaires avec de telles molécules pourrait empêcher ces amphiphiles de quitter la membrane, comme souligné par Gater *et al.* dans le cas de la Lyso-PPC.² Parmi toutes les activités biologiques de la Lyso-PPC, elle peut notamment agir comme un détergent. Le Chol pourrait diminuer

l'augmentation de la perméabilité créée par la présence de la Lyso-PPC dans la membrane ou encore, la piéger dans une membrane et l'empêcher de perturber d'autres cellules et, ainsi, diminuer son effet toxique. De même, les NAEs ont des effets cytoprotecteurs sur les cellules.²³ Le Chol pourrait empêcher les NAEs de quitter la membrane et donc sauvegarder l'effet protecteur des NAEs.

La formation de la phase L_o avec des amphiphiles monoalkylés pourrait aussi avoir des répercussions sur les domaines formés par les lipides du Stratum Corneum, la couche externe de l'épiderme, qui est composée en majorité de céramides, d'acide gras et de Chol.²⁴ L'image souvent donnée du SC est un mur pour lequel les cornéocytes seraient les briques, collés ensemble par une matrice lipidique jouant le rôle du mortier.²⁵ La matrice lipidique pourrait être à l'origine de la faible perméabilité de la peau. Vu que le Chol peut former des phases lamellaires très peu perméables en présence d'acide gras, cette découverte, mise en avant dans cette thèse, pourrait être reliée aux propriétés d'imperméabilité de la peau.

Ensuite, comme nous venons de le souligner, les effets d'un détergent sur une membrane peuvent avoir des répercussions importantes sur le fonctionnement de cette membrane,²⁰⁻²² comme provoquer la solubilisation des membranes.²⁶ Pour pouvoir étudier cette insertion, nous avons voulu développer une méthode permettant d'étudier de telles interactions. Les résultats entre la méthode appliquée par SERS et par la méthode ITC ont donné des valeurs de constante différentes. Ces résultats pourraient être expliqués par des hypothèses de départ erronées dans le cas du SERS, une enthalpie de dilution mal évaluée dans le cas de l'ITC, ou l'état « perturbé » du détergent et/ou de la membrane, comme il a été souligné par Moreno *et al.* pour le SDS sur des membranes de POPC;²⁷ dans ce dernier cas, les valeurs de constantes calculées seraient correctes.²⁰

Pour terminer, ces nouveaux mélanges détergent/stérol ont dévoilé des propriétés atypiques, comme l'obtention de la phase L_o , menant à la formation de LUVs à haut contenu en stérol (stérosomes) leur conférant une faible perméabilité passive. D'autre part, ces stérosomes sont fonctionnalisables et possèdent les mêmes propriétés que l'amphiphile monoalkylé incorporé. Ainsi, ces stérosomes se montrent prometteurs dans le cadre de la libération contrôlée de médicaments, de part les avantages qu'ils présentent par rapport aux liposomes conventionnels. D'autre part, ces mélanges ont mis en exergue de nouvelles propriétés, possiblement importantes dans le fonctionnement des systèmes biologiques. Quoiqu'il en soit, il devient important d'étudier et de comprendre les facteurs menant et contrôlant la formation des systèmes membranaires.

Ainsi, dans la continuité de ces travaux, d'autres expériences pourraient être réalisées. D'un point de vue application médicale, les liposomes chargés ayant tendance à se faire éliminer par le RES,²⁸ il serait utile d'étudier l'effet de la pegylation de ces systèmes sur leur perméabilité et sur leur sensibilité à des stimuli externes. Il serait aussi intéressant de voir si l'encapsulation de molécules hydrophobes est possible dans ces systèmes où la membrane est très compacte. L'insertion de molécules hydrophobes viendra-t-elle perturber leur perméabilité et leurs propriétés de mélange? Aussi, bien d'autres types d'amphiphiles pourraient être testées, notamment des amphiphiles sensibles à certains types d'ions, enzymes, protéines, anticorps, à un champ magnétique, à la température, etc., ceci dans le cadre de la libération contrôlée de médicaments.

D'un point de vue fondamental et en relation directe avec les travaux menés, il serait nécessaire de tracer le diagramme de phase du système $AzoC_{10}N^+/Schol$ afin de cerner les phénomènes physico-chimiques menant à la photo-sensibilité des LUVs formées, dans le but de contrôler le comportement de libération du système. Aussi, étant données leur compacité et leur fluidité, il serait intéressant d'étudier les propriétés mécaniques et élastiques des membranes formées par ces mélanges. Ensuite, la perméabilité des stérosomes semble être reliée aux propriétés électrostatiques de surface

de la membrane. Ces interactions électrostatiques peuvent découler directement des charges portées en surface. Hors, elles ont aussi des répercussions sur d'autres phénomènes, tels les liaisons hydrogènes et l'état d'hydratation. Il serait ainsi intéressant de voir dans quelles conditions ces différents facteurs affectent les propriétés de la membrane. Enfin, pour ce qui est de l'affinité entre un détergent et une membrane, il serait intéressant de continuer les expériences en se basant sur d'autres techniques pour valider ou invalider l'hypothèse des agrégats prémicellaires. Dans le cas où ces agrégats pourraient être présents, le SERS serait un outil de choix pour étudier le comportement et les propriétés de ces systèmes à l'échelle nanoscopique.

6.1 Références

1. Paré, C.; Lafleur, M. *Langmuir* **2001**, *17*, 5587.
2. Gater, D. L.; Seddon, J. M.; Law, R. V. *Soft Matter* **2008**, *4*, 263.
3. Ouimet, J.; Lafleur, M. *Langmuir* **2004**, *20*, 7474.
4. Cui, Z.-K.; Bastiat, G.; Jin, C.; Keyvanloo, A.; Lafleur, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 1144.
5. Bastiat, G.; Lafleur, M. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 10929.
6. Phoeung, T.; Aubron, P.; Rydzek, G.; Lafleur, M. *Langmuir* **2010**, *26*, 12769.
7. Cui, Z.-K.; Bastiat, G.; Lafleur, M. *Langmuir* **2010**, *26*, 12733.
8. Bastiat, G.; Oligier, P.; Karlsson, G.; Edwards, K.; Lafleur, M. *Langmuir* **2007**, *23*, 7695.
9. Phoeung, T.; Morfin Huber, L.; Lafleur, M. *Langmuir* **2009**, *25*, 5778.
10. Johnston, M. J. W.; Semple, S. C.; Klimuk, S. K.; Ansell, S.; Maurer, N.; Cullis, P. R. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 1121.

11. Baert, L.; Van Poppel, H.; Vandeursen, H. *Infection* **1991**, *19*, 157.
12. Rog, T.; Pasenkiewicz-Gierula, M.; Vattulainen, I.; Karttunen, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 97.
13. Bloom, M.; Evans, E.; Mouritsen, O. G. *Q. Rev. Biophys.* **1991**, *24*, 293.
14. Ipsen, J. H.; Karlström, G.; Mouritsen, O. G.; Wennerström, H.; Zuckermann, M. *J. Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *905*, 162.
15. Bach, D.; Wachtel, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1610*, 187.
16. Sackmann, E., Biological membranes architecture and function. In *Structure and Dynamics of Membranes*, Lipowsky, R.; Sackmann, E., Eds. Elsevier: Amsterdam, **1995**; pp 1.
17. Li, L.-K.; So, L.; Spector, A. *J. Lipid Res.* **1985**, *26*, 600.
18. Borchman, D.; Yappert, M. C. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 2473.
19. Lange, Y.; Ye, J.; Steck, T. L. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 36126.
20. Marcotte, L.; Barbeau, J.; Edwards, K.; Karlsson, G.; Lafleur, M. *Colloid Surface A* **2005**, *266*, 51.
21. Marcotte, L.; Barbeau, J.; Lafleur, M. *J. Colloid Interf. Sci.* **2005**, *292*, 219.
22. Denyer, S. P. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **1995**, *36*, 227.
23. Ramakrishnan, M.; Tarafdar, P. K.; Kamlekar, R. K.; Swamy, M. J. *Curr. Sci. India* **2007**, *93*, 234.
24. Kitson, N.; Thewalt, J.; Lafleur, M.; Bloom, M. *Biochemistry* **1994**, *33*, 6707.
25. Percot, A.; Lafleur, M. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 2144.
26. Heerklotz, H.; Seelig, J. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1508*, 69.
27. Moreno, M. J.; Bastos, M.; Velazquez-Campoy, A. *Anal. Biochem.* **2010**, *399*, 44.

28. Drummond, D. C.; Noble, C. O.; Hayes, M. E.; Park, J. W.; Kirpotin, D. B. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 4696.

