

UNIVERSITÉ STRASBOURG I – LOUIS PASTEUR

FACULTÉ DE CHIMIE

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR

Discipline : Chimie Physique

présentée et soutenue publiquement

le 27 Octobre 2005

par

Marc MICHEL

**FONCTIONNALISATION DE FILMS MULTICOUCHES DE
POLYÉLECTROLYTES AVEC DES LIPOSOMES
ENFOUIS : CRÉATION DE RÉACTEURS IMMOBILISÉS**

Directeur de thèse : Pr. Vincent BALL

JURY

Pr. Mir Wais HOSSEINI

Rapporteur interne

Pr. Michel NARDIN

Rapporteur externe

Pr. Wolfgang MEIER

Rapporteur externe

Pr. Thierry VANDAMME

Examineur

Pr. Vincent BALL

Directeur de thèse

Pr. Pierre SCHAAF

Membre invité

A Mireille

A mes Parents

A Eric, Daniel, Maud, Constance et Céleste

A la mémoire de mes Grands-Parents et de mon Oncle Paul

Remerciements

Ce travail a été effectué dans les laboratoires suivants : Institut Charles Sadron, UPR 22 CNRS, et unité INSERM 595, Biomatériaux : processus biophysiques et biologiques. Je tiens tout particulièrement à remercier les directeurs Messieurs Jean-Claude Wittmann, Jean-François Legrand et Jean-Claude Voegel de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires respectifs.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur Pierre Schaaf, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, de m'avoir accueilli au sein de son groupe et confié ce thème de recherche. Je le remercie également pour sa disponibilité tout au long de mon travail, son soutien et son aide toujours précieuse.

Je remercie vivement Monsieur Jean-Claude Voegel, Directeur de Recherche à l'INSERM (U 595, Strasbourg), de m'avoir accueilli dans son équipe afin de mener à bien ce travail. Je le remercie pour les discussions que nous avons eues, sa disponibilité et son soutien.

Je tiens en particulier à remercier Monsieur Vincent Ball pour m'avoir soutenu et aidé pendant toutes les épreuves que nous avons traversés ensemble lors du développement de ce projet. Il a eu à mon égard un soutien constant et fait preuve de qualités humaines pour lesquelles je lui en suis très reconnaissant. Je tiens également à saluer son humour et les idées géniales dont il a fait preuve durant ces trois années de thèse.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Messieurs Mir Wais Hosseini, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, Michel Nardin, Directeur de Recherche au CNRS à Mulhouse et Wolfgang Meier, Professeur à Université de Bâle en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je leur adresse mes sincères remerciements.

Je remercie également Monsieur Thierry Vandamme, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, qui me fait le grand honneur de faire partie du jury de cette thèse.

Je voudrais également remercier Monsieur Mathias Winterhalter, anciennement Professeur à l'Université Paul Sabatier (IPBS, Toulouse), pour son aide et son accueil lors de ma venue à Toulouse au sein de son laboratoire au début de ma thèse.

Je tiens également à témoigner ma gratitude à Youri Arntz, pour son aide précieuse en Microscopie en Champ proche, Christophe Contal et Dominique Vautier, pour les images d'AFM et Joseph Hemmerlé, pour les images de microscopie à transmission.

Rien de très inattendu si je remercie mes compagnons de café (et donc de réflexions scientifiques...) que sont Mahdi, François-Xavier, Nicolas, Benjamin, Eric, Grégory, Frédéric, Gérard et Albert. Grâce à eux, la vie quotidienne fut bercée de discussions et d'actes aussi scientifiques qu'imbéciles... J'en garderai un souvenir délicieux.

Sommaire

Introduction Générale	8
Chapitre 1. Revue Bibliographique	13
A. Liposomes	13
A.1. Lipides et liposomes	13
A.2. Physico-chimie des lipides au sein des membranes lipidiques	18
A.2.1. Dynamique des lipides dans les membranes lipidiques	18
A.2.2. Paramètres influençant la membrane lipidique	19
A.3. Perméabilité des membranes lipidiques	23
A.3.1. Canaux membranaires	23
A.3.2. Diffusion de petites molécules à travers la bicouche lipidique	25
A.4. Adsorption de liposomes à une interface solide-liquide	26
B. Stabilisation des liposomes	33
B.1. Polymérisation au sein des liposomes	33
B.1.1. Insertion de monomères dans la membrane lipidique	33
B.1.2. Insertion de copolymères en bloc dans une membrane lipidique	34
B.2. Liposomes et multicouche de polyélectrolytes	35
B.2.1. Principe de la méthode de dépôt couche par couche (LBL)	35
B.2.2. Adsorption de polyélectrolytes sur des liposomes	38
Conclusion et Stratégie	40
Références Bibliographiques	42
Chapitre 2. Matériels et Méthodes	50
A. Matériels	51
A.1. Polypeptides et polyélectrolytes	51
A.2. Les lipides et liposomes	52
A.3. Solutions de travail	54
A.4. Produits utilisés pour effectuer des réactions au sein des liposomes	55
A.4.1. Phosphatase alcaline	55
A.4.2. La spermine	57
A.5. Solvants et autres produits utilisés	57
B. Méthodes	59
B.1. Méthodes de fabrication des liposomes	59
B.1.1. Préparation des vésicules multilamellaires de grande taille (MLVs)	59
B.1.2. Préparation des vésicules unilamellaires de grande taille (LUVs)	59
B.1.3. Préparations des vésicules géantes unilamellaires (GUVs)	60
B.2. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	62
B.2.1. Principe	62
B.2.2. Déroulement de l'expérience	64
B.3. Mesure du potentiel zêta (ζ)	64
B.3.1. Modèle de la double couche ionique	65
B.3.2. Paramètres influençant la valeur du potentiel zêta	66
B.3.3. Principe de la mesure du potentiel zêta	67
B.3.4. Déroulement d'une expérience	69
B.4. Microbalance à cristal de quartz (QCM-D)	71
B.4.1. Principe	71
B.4.2. Caractéristiques de l'appareil QCM-D	73
B.4.3. Déroulement d'une expérience	75

B.5. Ellipsométrie	76
B.5.1. Principe	76
B.5.2. Déroulement d'une expérience	78
B.6. La microscopie à force atomique (AFM)	80
B.6.1. Principe	80
B.6.2. Obtention des images	81
B.6.3. Déroulement d'une expérience	82
B.7. Spectroscopie infra-rouge en mode transmission	83
B.8. Spectroscopie infra-rouge en mode réflexions totales atténuées	84
B.9. Voltampérométrie cyclique	87
B.9.1. Principe	87
B.9.2. Variation du potentiel et mesure du courant	89
B.9.3. Interprétation des mesures voltampérométriques	90
B.9.4. Signaux voltampérométriques des systèmes réversibles	90
B.9.5. Déroulement d'une expérience	92
B.10. Microscopie en champ proche (SNOM)	94
B.10.1. Principe	94
B.10.2. Déroulement d'une expérience	95
Références Bibliographiques	97
Chapitre 3. Résultats Discussions	99
A. Liposomes géants en solution : microréacteurs pour la production contrôlée de phosphates de calcium	102
A.1. Résumé	102
A.2. Article 1	104
B. Fonctionnalisation de films multicouches par des liposomes	115
B.1. Résumé	115
B.2. Article 2	116
C. Construction de films multicouches contenant des liposomes stabilisés par la méthode de nébulisation : intégrité moléculaire des liposomes	122
C.1. Résumé	122
C.2. Article 3	123
D. Liposomes incorporés dans des films multicouches de polyélectrolytes : réacteurs submicroniques pour la production de phosphates de calcium	133
D.1. Résumé	133
D.2. Article 4	134
Conclusion Générale	152
Annexes	157

Abréviations

AFM : Atomic Force Microscopy

ATR : Attenued Total Reflexion

DLS : Dynamic Light Scattering

FTIR : Fourier Transform Infrared

GUVs : Giant Unilamellar Vesicles

LUVs : Large Unilamellar Vesicles

MLUVs : Modified Large Unilamellar Vesicles

MLVs : Multilamellar Large Vesicles

PAH : Poly(allylamine chlorhydrique)

PDL : Poly(D-lysine hydrobromure)

PEI : Poly(éthylène imine) ramifiée

PGA : Poly(L-glutamate de sodium)

PLL : Poly(L-lysine hydrobromure)

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine

POPG : L- α -phosphatidyl-DL-Glycerol

QCM-D : Quartz Crystal Microbalance with Dissipation

SNOM : Scanning Near field Optical Microscopy

SUVs : Small Unilamellar Vesicles

Tampon tf : tampon Tris 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7.4

Tampon TF: tampon Tris 10 mM, NaCl 150 mM à pH 7.4

ULUVs : Unmodified Large Unilamellar Vesicles

Introduction Générale

« La nature de la surface d'un biomatériau assure le contrôle des processus impliqués dans la réponse biologique ». Cette affirmation de Ratner [1] définit largement les objectifs dans un domaine dont l'importance croît chaque année. Tout matériau interagit avec son environnement via sa surface et toutes les interactions avec cet environnement sont dictées par ses propriétés surfaciques. Ainsi, un contrôle de la chimie de surface permet un contrôle des interactions du matériau avec le milieu environnant. Différentes techniques de traitement des surfaces ont été développées dans ce but : adsorption de molécules ou de chaînes de polymères, greffage chimique (dépôt de monocouches auto-assemblées à la surface de métaux nobles et d'oxydes), dépôt de couches de Langmuir-Blodgett, etc. Depuis les années 1990, de nouvelles techniques de fonctionnalisation sont apparues permettant la construction de films par dépôt couche par couche (LBL de l'anglais "Layer-by-layer") basée sur la physisorption de polycations et polyanions [2,3]. Cette méthode simple permet de réaliser des assemblages supramoléculaires sur tout support chargé et connaît un intérêt croissant.

Le mécanisme de la croissance de ces films multicouches réside dans l'excès de charges qui apparaît après chaque nouveau dépôt d'un polyélectrolyte et qui permet ainsi une nouvelle interaction avec le polyélectrolyte de signe opposé. La croissance d'une multicouche peut ainsi se poursuivre de manière quasi illimitée. Au cours de la construction d'une multicouche de polyélectrolytes, sa masse et son épaisseur augmentent avec le nombre de dépôts réalisés. La croissance du film a longtemps été considérée linéaire avec le nombre de cycles d'adsorption. Récemment un autre type de croissance a été observé et caractérisé ; des films à croissance exponentielle [4-6].

La méthode de dépôt couche par couche permet de fonctionnaliser des supports de diverses géométries par insertion de molécules telles que (i) des protéines [7-9], (ii) de l'ADN [10] ou (iii) des nanoparticules [11] dans l'architecture. Cette stratégie permet ainsi de créer des assemblages moléculaires multicomposites et multifonctionnels. L'insertion de molécules s'effectue de façon générale par simple adsorption. Ceci est vrai à condition que les entités à insérer dans la multicouche interagissent avec les polyélectrolytes qui la constituent. Ainsi, ces surfaces fonctionnalisées connaissent des applications dans divers domaines telles que l'optoélectronique, l'adhésion, la détection chimique et biologique (capteurs), ou encore les biomatériaux. Il est également possible d'insérer des polyélectrolytes chimiquement modifiés au sein de films multicouches [12]. Cela permet en général la constitution de films plus

robustes. Dans le domaine des biomatériaux, des films ayant des propriétés antiadhésives et antimicrobiennes ont été fabriqués en utilisant cette stratégie [13]. Des films composés de chitosan (chargé positivement) et de dextran sulfate (chargé négativement) ont montré un caractère coagulant ou anticoagulant en fonction de la nature de la couche finale [14]. Des films doués de propriétés anti-inflammatoires ont également pu être fabriqués grâce à l'insertion d'interleukines dans l'édifice multicouche. Il a également été montré que des protéines immobilisées dans un film multicouche sont reconnues par les cellules qui réagissent en leur présence. Ceci montre que certaines protéines sont capables de garder leur activité même après leur insertion dans les films et cela à des profondeurs d'enfouissement variables [15].

La déposition de vésicules lipidiques intactes au sein des films multicouches de polyélectrolytes constitue un nouveau type de surface multicomposite. Cette nouvelle architecture pourrait être utilisée de deux manières. Premièrement, elle serait employée en tant que réservoir. Pour cela, des molécules seraient encapsulées dans ces liposomes immobilisés, puis pourraient être libérées dans le milieu environnant de deux manières :

- de manière passive (par simple diffusion des molécules à travers la membrane lipidique et à travers le film de multicouche)
- de manière active (par exemple sous l'effet de stimuli extérieurs tels que la température ou une action mécanique).

Deuxièmement, l'architecture liposomes/film de polyélectrolytes pourrait être utilisée en tant que réacteurs immobilisés. Une molécule contenue dans des liposomes déposés sur un film de polyélectrolytes pourrait réagir avec une molécule mise au contact de cette surface. Ceci constituerait un nouveau type de capteur chimique.

Cependant, la fragilité des vésicules lipidiques ne leur permet pas d'être déposées sur une surface sans craindre de les rompre. Une première approche concernant le dépôt puis l'enfouissement de vésicules intactes dans un film multicouche a été effectuée par Katagiri et al. [16,17]. Les auteurs de ce travail ont utilisé des vésicules qui ont été stabilisées grâce à la formation d'une couche rigide de silicates à la surface de la vésicule.

Ici, nous présentons une voie alternative permettant de stabiliser les liposomes. Ceci nous a permis :

- de créer des réservoirs suffisamment rigides dans le but de les immobiliser dans un film multicouche de polyélectrolytes.
- d'étudier leur perméabilité

- d'utiliser ces réservoirs en tant que réacteurs immobilisés, dans lesquels une réaction catalysée par une enzyme donne lieu à la production d'espèces nécessaire à la précipitation de particules inorganiques.

Ce manuscrit est divisé en plusieurs parties. Le chapitre 1 est consacré à la description des liposomes et des différents moyens de les stabiliser. Le chapitre 2 passe en revue les matériels et méthodes employés afin de mener à bien notre étude. Le dernier chapitre expose l'ensemble des résultats obtenus.

Références Bibliographiques

- [1] Ratner, B. D.; Johnston, A. B.; Lenk, T. J. Biomaterial surfaces. *J. Biomed. Mat. Res : Appl. Biomat.* **1987**, *21*, 59-90.
- [2] Decher, G.; Hong, J. D. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: I. consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles. *Makromol. Chem., Macromol. Symp* **1991**, *46*, 321.
- [3] Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* **1992**, 831-835.
- [4] Elbert, D. L.; Herbert, C. B.; Hubbell, J. A. Thin Polymer Layers Formed by Polyelectrolyte Multilayer Techniques on Biological Surfaces. *Langmuir* **1999**, *15*, 5355-5362.
- [5] Picart, C.; Lavalle, P.; Hubert, P.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G. et al. Buildup Mechanism for Poly(L-lysine)/Hyaluronic Acid Films onto a Solid Surface. *Langmuir* **2001**, *17*, 7414-7424.
- [6] Picart, C.; Mutterer, J.; Richert, L.; Luo, Y.; Prestwich, G. D. et al. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, *99*, 12531-12535.
- [7] Ladam, G.; Schaaf, P.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Voegel, J.-C. Protein Adsorption onto Auto-Assembled Polyelectrolyte Films. *Langmuir* **2001**, *17*, 878-882.
- [8] Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T. Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6117-6123.
- [9] Schwinte, P.; Ball, V.; Szalontai, B.; Haikel, Y.; Voegel, J.-C. et al. Secondary Structure of Proteins Adsorbed onto or Embedded in Polyelectrolyte Multilayers. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1135-1143.
- [10] Pei, R.; Cui, X.; Yang, X.; Wang, E. Assembly of Alternating Polycation and DNA Multilayer Films by Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 463-468.
- [11] Kotov, N. A.; Dekany, I.; Fendler, J. H. Layer-by-Layer Self-Assembly of Polyelectrolyte-Semiconductor Nanoparticle Composite Films. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 13065-13069.

- [12] Chluba, J.; Voegel, J.-C.; Decher, G.; Erbacher, P.; Schaaf, P. et al. Peptide Hormone Covalently Bound to Polyelectrolytes and Embedded into Multilayer Architectures Conserving Full Biological Activity. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 800-805.
- [13] Mendelsohn, J. D.; Yang, S. Y.; Hiller, J.; Hochbaum, A. I.; Rubner, M. F. Rational Design of Cytophilic and Cytophobic Polyelectrolyte Multilayer Thin Films. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 96-106.
- [14] Serizawa, T.; Yamaguchi, M.; Matsuyama, T.; Akashi, M. Alternating Bioactivity of Polymeric Layer-by-Layer Assemblies: Anti- vs Procoagulation of Human Blood on Chitosan and Dextran Sulfate Layers. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 306-309.
- [15] Jessel, N.; Atalar, F.; Lavalle, P.; Mutterer, J.; Decher, G. et al. Bioactive Coatings Based on a Polyelectrolyte Multilayer Architecture Functionalized by Embedded Proteins. *Adv. Mater.* **2003**, *2003*, 692-695.
- [16] Katagiri, K.; Hamasaki, R.; Ariga, K.; Kikuchi, J. Layer-by-layer self-assembling of liposomal nanohybrid "cerasome" on substrates. *Langmuir* **2002**, *18*, 6709-6711.
- [17] Katagiri, K.; Hamasaki, R.; Ariga, K.; Kikuchi, J. Layered paving of vesicular nanoparticles formed with cerasome as a bioinspired organic-inorganic hybrid. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7892-7893.

Chapitre 1. Revue Bibliographique

A. Liposomes	13
A.1. Lipides et liposomes	13
A.2. Physico-chimie des lipides au sein des membranes lipidiques	18
A.2.1. Dynamique des lipides dans les membranes lipidiques	18
A.2.2. Paramètres influençant la membrane lipidique	19
A.3. Perméabilité des membranes lipidiques	23
A.3.1. Canaux membranaires	23
A.3.2. Diffusion de petites molécules à travers la bicouche lipidique	25
A.4. Adsorption de liposomes à une interface solide-liquide	26
B. Stabilisation des liposomes	33
B.1. Polymérisation au sein des liposomes	33
B.1.1. Insertion de monomères dans la membrane lipidique	33
B.1.2. Insertion de copolymères en bloc dans une membrane lipidique	34
B.2. Liposomes et multicouche de polyélectrolytes	35
B.2.1. Principe de la méthode de dépôt couche par couche (LBL)	35
B.2.2. Adsorption de polyélectrolytes sur des liposomes	38
Conclusion et Stratégie	40
Références Bibliographiques	42

Le principal but de cette thèse est d'immobiliser des réservoirs dans un film multicouche de polyélectrolytes permettant la création de réacteurs immobilisés. Dans la littérature, divers types de réservoirs ont été envisagés et de nombreux travaux y ont été consacrés. Ce chapitre bibliographique a pour objectif de décrire un type de réservoirs qui a largement été étudié : les liposomes. Ils ont été utilisés dans ce travail de thèse et seront décrits de façon détaillée dans ce chapitre.

A. Liposomes

A.1. Lipides et liposomes

Les lipides appartiennent à une famille particulière de molécules amphiphiles qui possèdent une tête polaire, donc hydrophile, chargée ou non, et au moins une chaîne aliphatique, hydrophobe [1]. Lorsqu'ils sont mis en solution aqueuse, ces composés amphiphiles, vont dans un premier temps se positionner aux interfaces, comme à l'interface eau-air : la partie hydrophile du composé amphiphile est solubilisée dans l'eau tandis que la partie hydrophobe est exposée à l'air. Lorsque la concentration en molécules amphiphiles est augmentée jusqu'à saturation de l'interface eau-air par une monocouche adsorbée, des molécules individuelles restent en solution. Cependant, si ces molécules restaient solubilisées

de façon individuelle, cette situation serait très coûteuse en énergie libre car les parties hydrophobes de la molécule seraient alors exposées à l'eau. Afin de minimiser l'énergie libre du système, un auto-assemblage des molécules individuelles a lieu. Cet auto-assemblage peut être à l'origine de nombreuses phases de morphologie différentes [2,3].

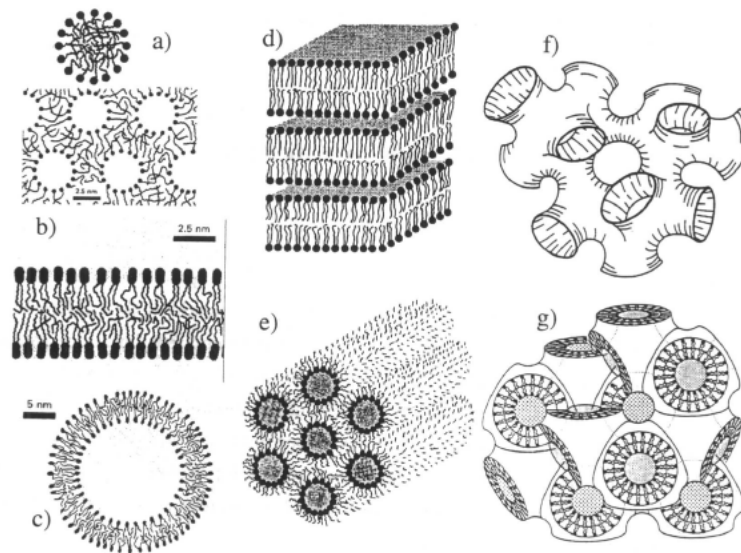
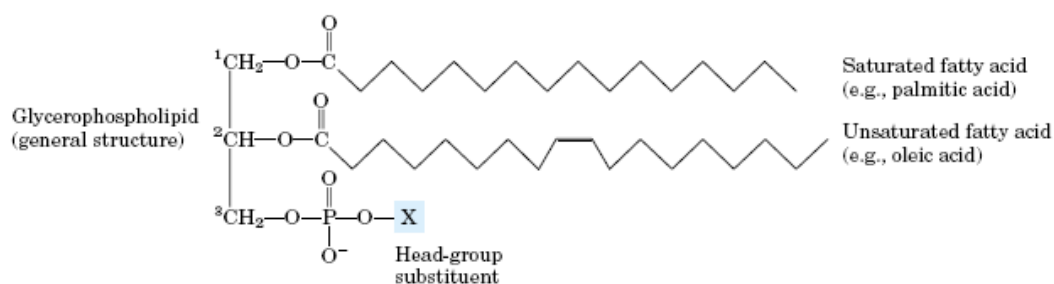


Figure 1. Exemple de phases possibles pour les molécules amphiphiles dans un solvant aqueux : a) micelles et micelles inverses, b) bicouche, c) vésicule, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse (arrangement de micelles cylindriques inverses), f) phase éponge, g) phase cubique inverse bicontinue. D'après [2,3].

La figure 1 montre l'existence de différents types d'auto-assemblages de molécules amphiphiles. Toutes ces phases ont en commun la mise en contact des parties hydrophiles avec l'eau tout en empêchant le contact des chaînes hydrophobes avec l'eau [3].

Les lipides qui nous intéressent essentiellement dans ce travail sont les phospholipides (PC) (tableau 1). La plupart des phospholipides naturels sont constitués de deux chaînes d'acides gras estérifiant les fonctions alcool du glycérol en positions 1 et 2. Les groupes polaires fixés sur le phosphate estérifient la position 3 du glycérol. Cela conduit aux diverses classes des glycérophospholipides (tableau 1). Ces molécules sont un constituant majeur des cellules vivantes, dont ils séparent le milieu intra du milieu extracellulaire par la formation d'une membrane, et peuvent représenter jusqu'à 60% des phospholipides des membranes naturelles.



Name of glycerophospholipid	Name of X	Formula of X	Net charge (at pH 7)
Phosphatidic acid	—	— H	-1
Phosphatidylethanolamine	Ethanolamine	— CH ₂ -CH ₂ -NH ₃ ⁺	0
Phosphatidylcholine	Choline	— CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ (CH ₃) ₃	0
Phosphatidylserine	Serine	— CH ₂ -CH(NH ₃ ⁺) COO ⁻	-1
Phosphatidylglycerol	Glycerol	— CH ₂ -CH(OH)-CH ₂ -OH	-1
Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	<i>myo</i> -Inositol 4,5-bisphosphate		-4
Cardiolipin	Phosphatidylglycerol	— CH ₂ -CH(OH)-CH ₂ -O-P(=O)(O ⁻)-O-CH ₂ -CH(O-C(=O)-R ¹)-CH ₂ -O-C(=O)-R ²	-2

Tableau 1. Exemple de structure de glycérophospholipides et structures des groupes polaires les plus fréquemment rencontrés dans la famille des phospholipides. D'après [1].

Cette dernière est constituée d'une bicouche lipidique, c'est-à-dire de deux feuillets composés de monocouche de phospholipides. Notons cependant qu'il existe d'autres grandes classes de lipides : les sphingolipides et le stérols [1].

Ce travail de thèse s'oriente autour d'un assemblage bien particulier de molécules lipidiques : les liposomes [4]. Ils ont longtemps été considérés comme des analogues

synthétiques de cellules vivantes. La morphologie des phases formées dépend non seulement de la concentration des molécules amphiphiles et de la température mais également de la forme géométrique des molécules considérées (figure 2). En particulier, le rapport entre le volume de la partie hydrophobe et le produit de l'aire de la tête polaire par la longueur de la molécule détermine la topologie de l'édifice auto-assemblé. Ce rapport constitue le paramètre de forme p [2]. Afin de former un liposome, il est nécessaire que l'aire de la tête hydrophile des lipides soit légèrement supérieure à la section de la chaîne aliphatique. Les molécules qui remplissent ces conditions s'auto-assemblent spontanément en vésicules, c'est-à-dire en structures fermées. Le rayon minimum de la paroi de la vésicule est alors fixé par la géométrie de la molécule : les têtes polaires des lipides sont séparées d'une distance minimale égale à deux fois l'extension des chaînes aliphatiques (figure 2). Il est donc évident que le nombre de molécules lipidiques est différent sur le feuillet lipidique externe et sur le feuillet lipidique interne. Mais dans la limite où le rayon de la vésicule devient grand par rapport à la longueur d'une molécule, le nombre de molécules lipidiques sur le feuillet interne tend à devenir égal à celui sur le feuillet externe.

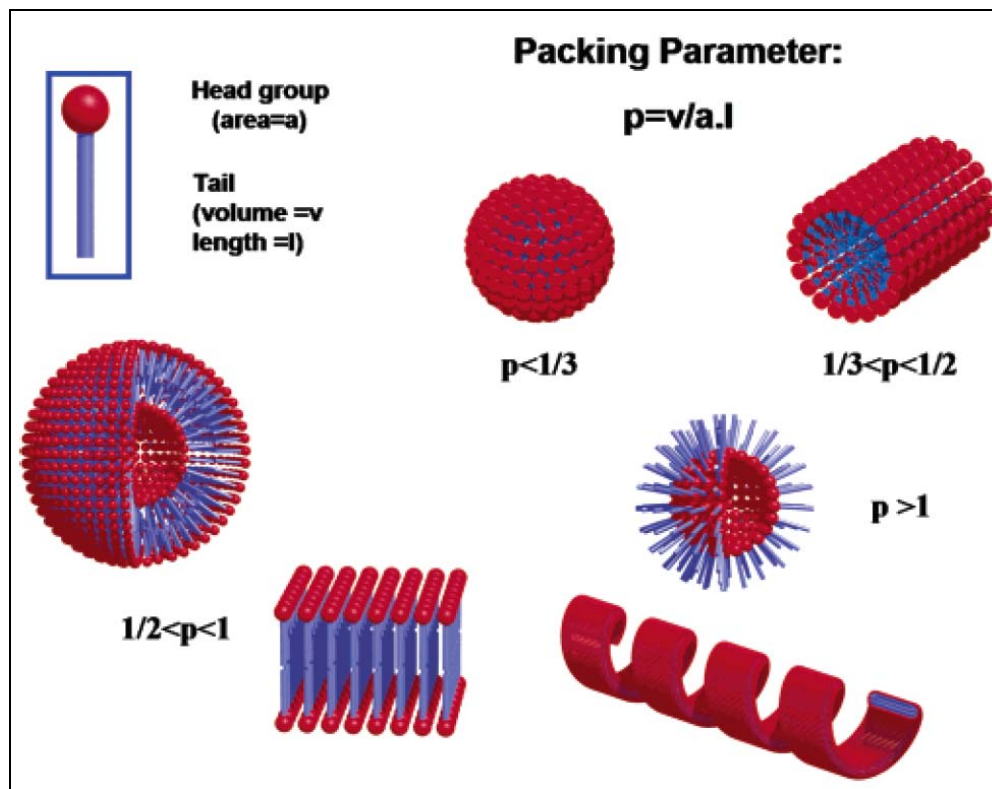


Figure 2. Différentes structures obtenues en fonction de la forme des lipides. Le paramètre important est le rapport v/a_0l . D'après [2].

Les liposomes sont classés selon leur taille et le nombre de bicouches lipidiques concentriques. On distingue (figure 3) :

- (i) les liposomes multilamellaires appelés MLVs pour “multilamellar large vesicles”,
- (ii) les liposomes unilamellaires de petite taille, appelés SUVs pour “small unilamellar vesicles” (40 à 100 nm de diamètre),
- (iii) les liposomes unilamellaires de grande taille LUVs, pour “large unilamellar vesicles” (100 à 500 nm de diamètre),
- (iv) et enfin les liposomes géants, appelés GUVs pour “giant unilamellar vesicles” (500 nm à 100 μ m de diamètre).

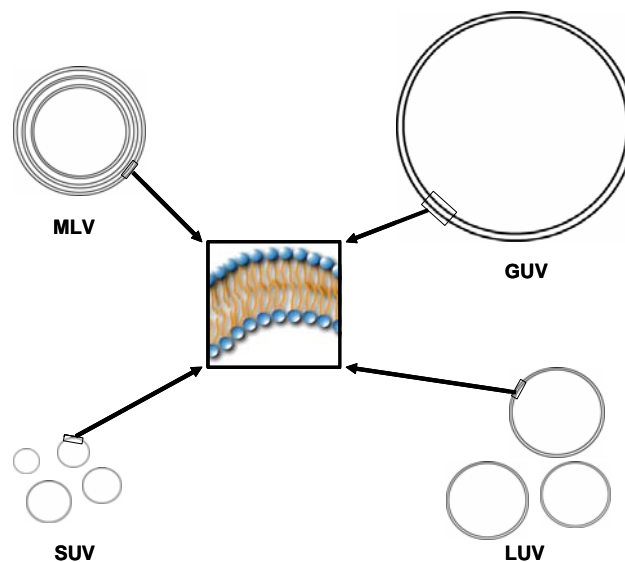


Figure 3. Représentation schématique des différents types de liposomes. D'après Avanti polar Lipids 2003.

Les vésicules géantes ont une taille de l'ordre ou supérieure au micromètre et peuvent être facilement observées par microscopie optique, ce qui représente un avantage certain pour les étudier. Les méthodes de préparation des différents types de liposomes seront décrites ultérieurement (dans le chapitre matériels et méthodes).

A.2. Physico-chimie des lipides au sein des membranes lipidiques

A.2.1. Dynamique des lipides dans les membranes lipidiques

Les molécules de lipides peuvent diffuser librement dans la bicouche (figure 4) [3,5]. Un coefficient de diffusion a été mesuré par diverses techniques, et sa valeur est de l'ordre de $D = 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (mesure effectuée par recouvrement de fluorescence après photoblanchiment ou *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP)) [3]. Lorsque la température est abaissée sous la valeur de la température de transition de phase T_m (voir la définition dans la partie A.2.2), une transition vers la phase cristal liquide a lieu, ce qui engendre un ralentissement de la diffusion latérale des chaînes et donc une diminution de la valeur du coefficient de diffusion ($D \approx 10^{-11} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [1]). Par ailleurs, une rotation des molécules de lipide parallèlement à leur axe principal a également été observée. Pour ce degré de liberté, le coefficient de diffusion (dit rotationnel) est de l'ordre de $D_r = 10^8 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [3].

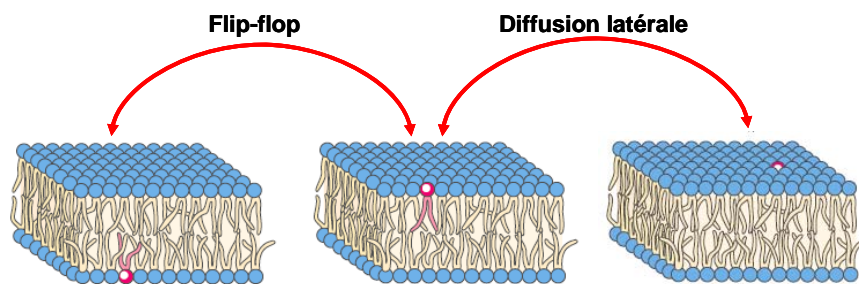


Figure 4. Représentation schématique de la dynamique des lipides au sein des membranes. D'après [3,5].

Les lipides des membranes synthétiques peuvent également passer d'une couche lipidique à l'autre (figure 4). Ce mouvement dans la direction perpendiculaire au plan moyen d'une bicouche lipidique est communément appelé *flip-flop*. Néanmoins, c'est un phénomène qui reste lent car il est très défavorable énergétiquement de faire passer la tête polaire d'une molécule lipidique à l'intérieur de la zone hydrophobe constituée par les queues des autres molécules de lipide. Le coefficient de diffusion associé à ce processus est de l'ordre de $D_f = 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [5]. Il faut noter que le passage d'un feuillet à l'autre a effectivement lieu dans les membranes biologiques. En effet, des protéines membranaires telles que les flipases sont capables d'accélérer fortement ce mouvement [5].

Binder et al. ont montré que ces phénomènes dynamiques peuvent se produire soit de façon spontanée soit sous l'effet de stimuli extérieurs (figure 6) [6].

La température, la présence d'ions divalents et plus particulièrement l'adsorption d'un polyélectrolyte à la surface d'une bicouche chargée peuvent conduire à de tels changements de composition d'un feuillet lipidique.

A.2.2. Paramètres influençant la membrane lipidique

Plusieurs facteurs peuvent influencer le comportement des lipides dans une membrane lipidique et donc influencer la membrane lipidique elle-même.

La température est un facteur important. En effet, chaque lipide pur possède une température de transition de phase qui correspond au passage réversible d'un état fluide du type cristallin L_β vers un état figé du type gel L_α via un état intermédiaire P_β [3,7,8].

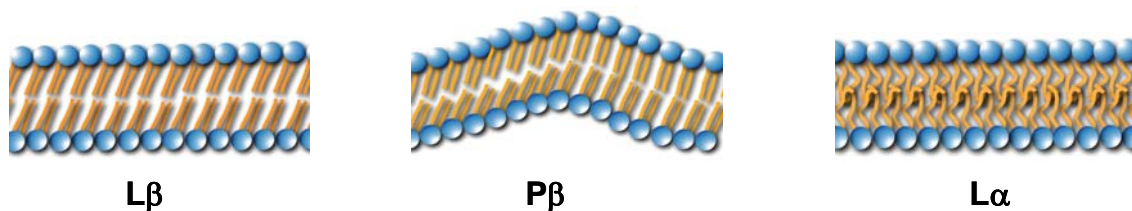


Figure 5. Représentation des principaux changements de phase au sein des membranes lipidiques. D'après [3,7,8].

On distingue (figure 5) :

- (i) la température de pré-transition qui correspond au passage de la phase L_β vers la phase P_β
- (ii) la température de transition proprement dite, notée T_m , qui correspond au passage de la phase P_β vers la phase L_α .

La température de transition de phase augmente avec le nombre d'interactions attractives entre lipides, notamment les interactions hydrophobes [9]. Plus la longueur des chaînes acyles des lipides est importante et plus le nombre d'interactions de type Van der Waals (correspondant à des forces de dispersion) sera important. Ainsi, la température de transition augmente proportionnellement à la longueur des chaînes acyles. Cependant, les insaturations *cis* défavorisent ces interactions entre chaînes, ce qui a pour effet de réduire la température de transition à nombre d'atomes de carbone donné dans les chaînes aliphatiques. La température de transition dépend ainsi de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acides gras constituant les lipides de la membrane.

En ce qui concerne les mélanges de lipides, il a été montré que la température de transition de phase d'un système de deux lipides miscibles, ayant des températures de transition différentes, sera intermédiaire entre les températures de transition de phase des lipides

individuels [10-12]. La variation de température de transition de phase du mélange sera une fonction affine de la fraction molaire de chaque lipide présent dans la membrane. De plus, il a été montré qu'un changement de la température peut conduire à la séparation de phase de deux lipides dont les températures de transition de phase sont différentes [6].

Les phospholipides ont une tête zwitterionique ou chargée. Ainsi, on peut s'attendre à des modifications du comportement des lipides avec le pH. Un changement de la valeur du pH externe peut modifier la charge de la tête polaire ou son hydratation. Cela a pour effet de diminuer les forces attractives entre deux têtes polaires voisines. Cet effet est réversible si on diminue à nouveau le pH [13].

En ce qui concerne les interactions liposomes-ions, il a été montré que les ions divalents (par exemple Ca^{2+} , Mg^{2+} ...) provoquent souvent des effets importants comme l'adhésion des vésicules entre elles pour former une mousse de vésicules [3]. Ceci n'est en général pas observé dans le cas des ions monovalents. Les ions divalents interagissent avec les têtes polaires des lipides en pontant les groupements ester phosphates de deux molécules lipidiques adjacentes [14].

La présence de polymères influence également la membrane lipidique. Dans la nature, les membranes biologiques sont naturellement recouvertes de polymères, ce qui permet de limiter et de contrôler les contacts entre cellules. Cette couche fait partie d'un édifice plus complexe appelée glycocalix [3,5]. Un système biomimétique constitué d'une vésicule géante sur laquelle est greffée une couche de polymères solubles (polyéthylèneglycol par exemple) a été réalisé [15,16]. Le même type d'expérience a aussi été réalisé sur des petites vésicules [17]. D'un point de vue physique, la présence d'une couche de polymère greffée à la surface d'une vésicule augmente le module de rigidité de courbure de façon importante.

De même, le groupe du professeur Möhwald a montré que l'adsorption de polyélectrolytes augmente de façon importante la rigidité de la membrane lipidique, sans pour autant affecter la perméabilité de la membrane [18]. De plus, ils ont montré que des vésicules lipidiques recouvertes de polyélectrolytes restent intactes même en présence d'un détergent. Nous verrons dans la partie consacrée à la stabilisation des liposomes que l'adsorption de polyélectrolytes repose sur des interactions faibles (de type électrostatique).

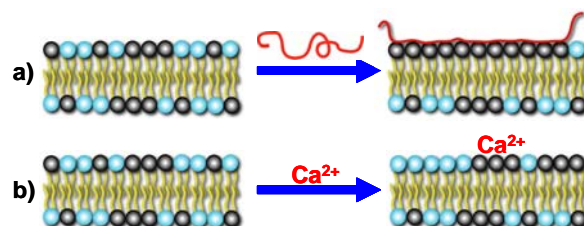


Figure 6. Représentation schématique des différents modes de séparation de phase dans les bicouches lipidiques induites a) par adsorption de polyélectrolyte, b) par la présence d'ions divalents. D'après [6].

Des mesures de mobilité électrophorétique ont été effectuées afin d'étudier les interactions polyélectrolytes-liposomes chargés [19]. L'addition d'un polymère de charge opposée à la charge des groupes polaires lipidiques engendre une mobilité électrophorétique proche de zéro. Cela signifie que la charge de la surface externe de la vésicule a été modifiée suite à la complexation vésicules-polyélectrolytes. De plus, la présence de polyélectrolytes dans une solution de liposomes chargés peut engendrer des phénomènes d'agrégation et de floculation par pontage inter-liposomes si des précautions expérimentales particulières ne sont pas prises (forces ioniques, longueur moyenne des chaînes polyélectrolytes, pH par exemple).

Du point de vue microscopique, le couplage polyélectrolytes-bicouches lipidiques peut induire une redistribution latérale des lipides de charge opposée à celles du polyélectrolyte (figure 6). Cette redistribution des lipides aboutit à la formation de domaines lipidiques [20-24]. Des domaines se forment dans des membranes constituées d'une bicouche lipidique grâce à des interactions électrostatiques entre les lipides chargés et des polyélectrolytes de charge opposée. Ceci a été montré à l'aide de la spectroscopie de RMN-2H. En effet lorsqu'une membrane constituée de phosphatidylcholine deutérée (PC-2H) et de phosphatidylglycérol POPG (chargé négativement) est mise en présence d'un polyélectrolyte de charge opposée, celui-ci se lie à la surface de la bicouche par un mécanisme électrostatique (avec une forte contribution entropique due à l'augmentation des degrés de liberté des contre ions de petite taille). Les lipides chargés sont alors attirés dans le voisinage du polyélectrolyte, ce qui a tendance à accentuer le phénomène de *flip flop* et de diffusion latérale qui ont été décrits auparavant. La spectroscopie RMN -2H a permis de mettre en évidence des régions enrichies en charges et des régions plus pauvres. La formation de domaines dans des membranes constituées d'une bicouche lipidique est observée en présence de polyélectrolytes aussi bien cationiques ou anioniques, d'origine naturelle ou synthétique. Il a également été démontré que la taille et la composition des domaines dépendent de la structure chimique des polyélectrolytes et des lipides chargés. Il y a toujours un rapport de liaison anions-cations

stoechiométrique dans les domaines, ce qui indique que le polyélectrolyte épouse la forme de la surface membranaire. La taille des domaines varie en fonction de la masse moléculaire du polyélectrolyte. Comme prévu pour un phénomène dominé par les interactions électrostatiques, les domaines observés se dissipent lorsque la force ionique est élevée.

L'insertion de molécules telles que le cholestérol peut également mener à des modifications des caractères physiques des membranes lipidiques. En effet, le cholestérol est une molécule possédant un caractère hydrophobe très marqué, ce qui lui permet de s'insérer au sein d'une membrane lipidique [25]. Elle est composée de quatre cycles rigides coplanaires et d'une chaîne ramifiée à 8 atomes de carbone (figure 7).

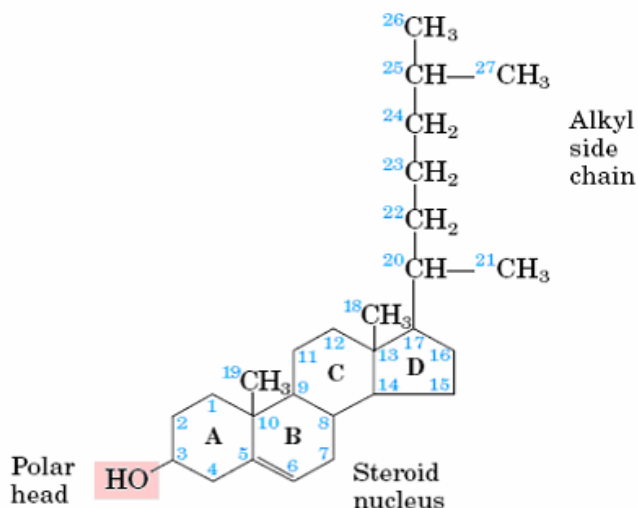


Figure 7. Structure de la molécule de cholestérol.

Le groupement hydroxyle placé en position 3 du premier cycle, représente la seule partie polaire du cholestérol. Ce dernier s'insère dans la membrane dans une direction perpendiculaire au plan moyen de la bicouche lipidique avec le groupe hydroxyle placé au niveau de la partie polaire des phospholipides tandis que ses cycles sont "solubilisés" par les chaînes grasses des phospholipides.

La longueur du cholestérol, d'environ 17.5 Å, est plus courte que la longueur de chaîne des phospholipides qui est proche de 25 Å. La présence de cholestérol au sein de la membrane lipidique tend à la rigidifier. Cette rigidification provient du fait que le cholestérol engendre un effet de condensation forte dans la membrane lipidique, faisant ainsi diminuer l'aire occupée par les molécules de lipides [1].

A.3. Perméabilité des membranes lipidiques

A.3.1. Canaux membranaires

La bicouche lipidique est imperméable à la plupart des substances polaires, même celles de faibles masses moléculaires. L'eau est la seule exception notable : elle diffuse de façon passive à travers la bicouche lipidique. Or, une cellule a besoin de l'apport de petites molécules hydrophiles et d'ions pour assurer son métabolisme, sa survie et sa duplication : apport de glucides, d'acides aminés... Afin de résoudre ce problème de perméabilité, la cellule est pourvue de protéines membranaires enchâssées dans la bicouche lipidique. Ces protéines présentent en général une très forte sélectivité vis à vis d'un soluté donné. Il existe deux grandes catégories de protéines assurant la traversée de la membrane : les canaux membranaires et les pompes ioniques [26-28].

Les canaux membranaires constituent la famille de molécules de transport transmembranaire la plus représentée dans la cellule (figure 8). Ces protéines sont caractérisées par un assemblage de sous-unités protéiques. L'assemblage de ces sous-unités se fait de manière à ce que la protéine expose ses parties hydrophobes au contact des lipides de la bicouche tandis que les parties hydrophiles vont tapisser la partie interne du canal. Les parois du canal membranaire sont ainsi majoritairement constituées de chaînes latérales d'acides aminés hydrophiles. Lorsque ce canal est fermé, aucune espèce présente à l'extérieur de la vésicule ne passe vers le compartiment interne. Lorsque le pore du canal est ouvert, le soluté considéré va le traverser selon son gradient de potentiel électrochimique. Si ce gradient est nul, le mouvement transmembranaire s'arrête, s'il s'inverse le mouvement s'inverse également. Les canaux ne peuvent en aucun cas assurer des phénomènes de transport dans le sens opposé au sens du gradient de potentiel électrochimique et sont donc responsables de processus de diffusion passive. En général, ces canaux sont hautement sélectifs, ce qui veut dire que seule une famille de molécules de structures et de tailles proches, voire une seule molécule, seront capables de traverser le canal. Il existe cependant quelques exceptions dont le canal nicotinique responsable de l'activité musculaire. En effet, il permet la diffusion passive de tous les ions positifs monovalents. La sélectivité du canal membranaire est due à sa taille et à la nature des acides aminés qui tapissent la paroi du canal. L'ouverture du canal peut être permanente ou passagère. Son ouverture est alors assurée par l'intermédiaire d'un phénomène de reconnaissance moléculaire, par un mécanisme électrochimique ou par l'intermédiaire d'une force mécanique ou électrique. La durée d'ouverture varie également. Les canaux peuvent rester ouverts tant que le stimulus est présent, d'autres se referment après

quelques millisecondes et ces événements sont parfois suivis d'une période réfractaire lors de laquelle une nouvelle stimulation n'ouvrira pas le canal.

Les pompes ioniques se différencient des canaux par le fait que ce n'est plus le gradient de potentiel électrochimique des molécules qui assure leur transport mais le couplage du transport avec une réaction enzymatique, comme par exemple l'hydrolyse de l'ATP. Le mouvement de la molécule devient donc unidirectionnel et peut même se produire contre le gradient de potentiel électrochimique. La pompe Na^+/K^+ constitue le prototype de pompe ionique. Cette dernière expulse trois ions sodium et fait entrer deux ions potassium pour chaque molécule d'ATP hydrolysée. Ce transporteur est très important dans la cellule car il assure la création et le maintien du gradient de potentiel électrochimique membranaire et est indirectement à l'origine de la plupart des mouvements de transports. Si cette pompe s'arrête, le gradient de potentiel électrochimique n'est plus maintenu : les mouvements ioniques s'arrêtent de part et d'autre de la membrane plasmique.

L'ATPase à protons constitue un autre canal ionique d'importance capitale. C'est un transporteur qui, pour chaque molécule d'ATP hydrolysée, peut expulser deux ions hydrogène hors de la membrane. Toutefois, le gradient de potentiel électrochimique de l'hydrogène est tel que ce canal va fonctionner à l'envers, les ions hydrogène vont transiter en sens inverse par rapport au sens habituel et l'ATPase va synthétiser de l'ATP au lieu de l'hydrolyser. C'est cette pompe qui est donc responsable de la production d'ATP qui constitue la source d'énergie directement utilisable par les cellules vivantes.

Enfin il existe une famille de protéines membranaires hybrides : les transporteurs couplés qui constituent un mélange des deux précédents types de transporteurs. Ces protéines, au nombre de deux au moins, sont proches l'une de l'autre dans la membrane et agissent par l'intermédiaire d'un mécanisme de transport passif : l'énergie nécessaire au transport actif est fournie par un autre ion qui se déplace selon son gradient électrochimique. L'un des partenaires du transport couplé fournit donc l'énergie nécessaire à l'autre. Selon le sens de déplacement respectif des deux molécules transportées, on parle de symport (les deux espèces traversent la membrane dans le même sens) ou d'antiport (les deux espèces chimiques se déplacent en sens inverse). Ces transports couplés sont très utilisés par la cellule pour récupérer les molécules nécessaires à son métabolisme à partir du milieu extracellulaire.

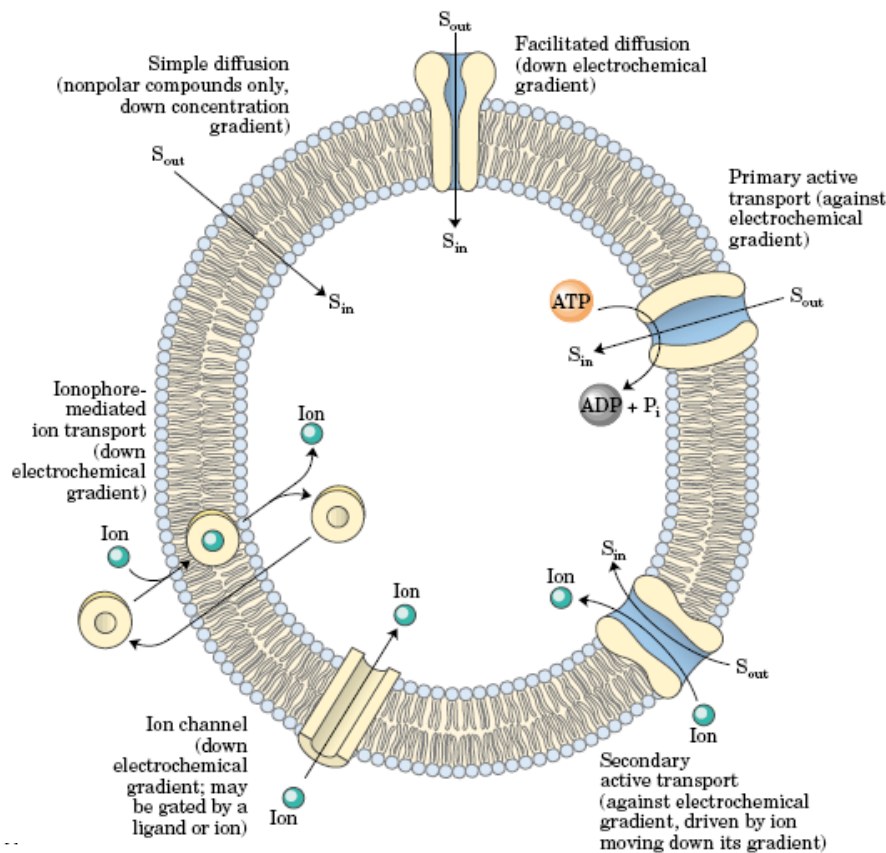


Figure 8. Représentation schématique de tous les types de transport de molécules à travers la membrane lipidique. D'après [28].

A.3.2. Diffusion de petites molécules à travers la bicouche lipidique

Depuis un certain nombre d'années, il a été montré que quelques solutés amphiphiles de faible masse moléculaire sont capables de diffuser librement au travers de la membrane lipidique [29-31]. Pour de tels solutés, les liposomes ne sont plus uniquement utilisés comme réservoirs de molécules actives mais peuvent être utilisés en tant que réacteurs. Walde et al. ont préparé des liposomes, à partir de POPC, dans lesquels une enzyme, l' α -chymotrypsine, a été encapsulée. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des substrats de petites tailles tels que le benzoyl-L-Tyr-p-nitroanilide ou l'acétyl-L-Phe-p-nitroanilide et des substrats de plus grande masse moléculaire telles que le succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroalanide ou la caséine [30,31]. Ces derniers ont été mis en contact d'une solution de liposomes contenant de

l' α -chymotrypsine. Seuls les substrats de masse moléculaire inférieure à une valeur critique de l'ordre de 350 g.mol^{-1} franchissent la paroi de la membrane lipidique. Cette diffusion à travers la bicouche lipidique est matérialisée par l'apparition des divers produits de la réaction d'hydrolyse des nitro-anilides. Au delà de cette masse moléculaire critique, les substrats ne diffusent plus au sein des liposomes, et ne réagissent plus avec l'enzyme encapsulée. Ainsi, les liposomes peuvent être utilisés comme réacteurs grâce à la diffusion passive des substrats et des produits de la réaction au travers de la membrane lipidique.

L'immobilisation sur une surface des systèmes étudiés par Walde et al. permettrait de développer des surfaces capables de reconnaître sélectivement des molécules cibles, c'est-à-dire de développer de nouveaux biocapteurs. Ainsi, un liposome immobilisé sur support et contenant une enzyme sera capable de réagir uniquement si son substrat est à proximité de la surface. Cependant, le développement de ce type de biosenseurs nécessite d'adsorber des liposomes sans les rompre. La partie suivante, est consacrée à la description des mécanismes d'interaction des liposomes avec des interfaces solide-liquide. Il sera montré que l'adsorption de vésicules intactes dépend fortement de la nature des surfaces (hydrophobes ou hydrophiles) et de la taille des liposomes.

A.4. Adsorption de liposomes à une interface solide-liquide

Lorsqu'un liposome rencontre une surface, il a tendance à former soit une monocouche ou une bicouche de lipides, soit à garder sa forme sphérique et à n'adhérer que très faiblement au substrat [32-40]. Le type de comportement observé, adhésion de vésicules intactes ou éclatement sur la surface, dépend de l'énergie d'interaction entre les lipides et le substrat. Le processus d'éclatement des vésicules sur une surface n'est pas encore très bien connu. Kasemo et al. ont tenté d'élucider le mécanisme d'interaction entre des liposomes et des substrats solides par le biais de l'utilisation de la microbalance à cristal de quartz, qui permet de suivre en temps réel l'adsorption, la fusion et la rupture des vésicules sur différents types de surfaces [39-42]. Si la concentration en vésicules est suffisante, il se forme très rapidement une bicouche lipidique sur une surface de silice propre. Ceci implique d'abord l'adsorption puis la rupture des vésicules. Si les liposomes entrent en contact avec une surface hydrophobe, par exemple fonctionnalisée avec des alcanes thiols, ils vont presque immédiatement former une monocouche de lipides [41]. Par contre une surface non fonctionnalisée, comme par exemple de l'or oxydé, permet l'adsorption de vésicules intactes. L'ensemble de ces phénomènes peut être rationalisé grâce à la connaissance de la valeur des

énergies d'interactions entre les liposomes et la surface du solide. Au premier abord, lorsque une vésicule s'approche d'une surface, elle va d'abord s'adsorber. De plus, si les interactions liposomes-surface sont fortes, une déformation importante des liposomes va se produire, induisant la rupture et l'étalement des lipides à l'interface solide-liquide [39,42]. En cas d'interaction faible, les vésicules restent intactes lors de leur adhésion au substrat.

Le problème est cependant plus complexe car il faut considérer les interactions liposomes-liposomes en plus des interactions liposome-surface [32,43]. Si les interactions liposomes-liposomes l'emportent sur les interactions liposomes-surface, les vésicules vont fusionner les unes avec les autres, donnant lieu à la formation d'une bicouche lipidique. Les interactions liposomes-liposomes sont directement reliées à la concentration de liposomes à adsorber. En effet, la probabilité de coalescence entre deux vésicules dépend de leur concentration. Plus la concentration en liposomes est élevée et plus la probabilité de fusion est grande.

Efremov et al. ont proposé un modèle mathématique de rupture des vésicules lipidiques sur une surface solide [44]. Ce modèle tente de décrire la rupture d'une bicouche lipidique sphérique sur une surface plane, isotrope et hydrophile.

Considérons une vésicule lipidique de rayon externe R_c , de rayon interne $(R_c - x)$ et comportant N molécules lipidiques (figure 9).

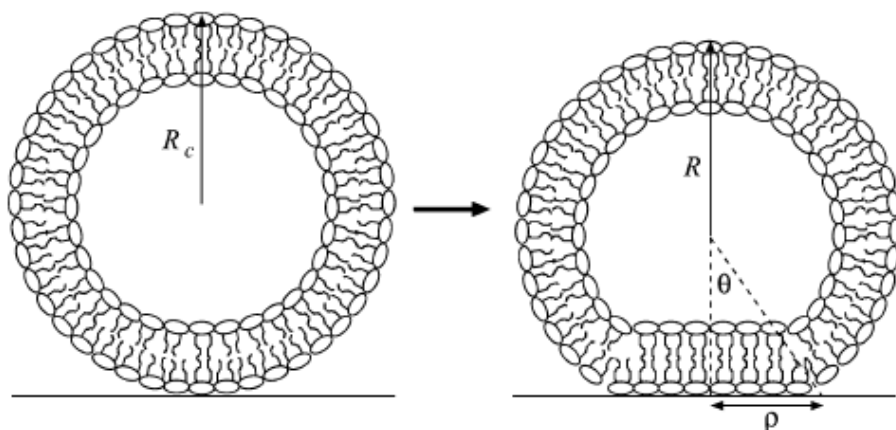


Figure 9. Représentation de l'état d'un liposome de rayon externe R_c , de rayon interne $(R_c - x)$ avant rupture. D'après [44].

Si chaque tête polaire possède une aire a_0 , quelque soit le feuillet où se trouve la molécule, nous pouvons alors écrire une relation reliant N aux rayons et à l'aire a_0 :

$$N = \frac{4\pi}{a_0} [R_c^2 + (R_c - x)^2] \quad (1)$$

Dans la relation (1), x correspond à l'épaisseur de la bicouche lipidique.

L'énergie libre de cette sphère correspond à la somme de deux contributions : l'énergie libre associée à l'interface eau-tête polaires [45] et l'énergie mécanique associée à la formation d'une sphère. [46-48]. Cette énergie mécanique correspond à l'énergie nécessaire pour courber la bicouche lipidique. Si les têtes polaires s'orientent vers la surface et que cette surface est couverte d'eau, l'énergie libre de la vésicule dépendra également de la contribution des interactions lipides-solide et pourra alors s'écrire :

$$G_{ves-int\ erface} = \gamma_{hw} a_0 N \quad (2)$$

où γ_{hw} correspond à la tension de surface de l'interface têtes polaires-eau. L'énergie de courbure de la vésicule peut s'écrire sous la forme [48,49]:

$$G_{ves-courbure} = \frac{1}{2} K_c \int_0^\pi 2\pi \left(\frac{2}{R_c} \right)^2 R_c^2 \sin \theta d\theta = 8\pi K_c \quad (3)$$

où K_c correspond au module de courbure de la vésicule et dépend de la nature des lipides.

La variation d'énergie libre totale du système accompagnant la constitution des vésicules correspond à la somme des contributions (2) et (3):

$$G_{ves} = G_{ves-int\ erface} + G_{ves-courbure} \quad (4)$$

Donc

$$G_{ves} = \gamma_{hw} a_0 N + 8\pi K_c \quad (5)$$

Considérons maintenant l'état final où la vésicule se rompt et forme un disque sur la surface.

Deux cas sont à considérer (figure 10) : le premier cas concerne un disque dont le bord comporte des lipides exposant leur partie hydrophobe à l'eau, et le second cas concerne un disque dont le bord comporte des lipides qui ont tendance à se courber afin de diminuer l'aire de contact entre les chaînes hydrophobes et l'eau.

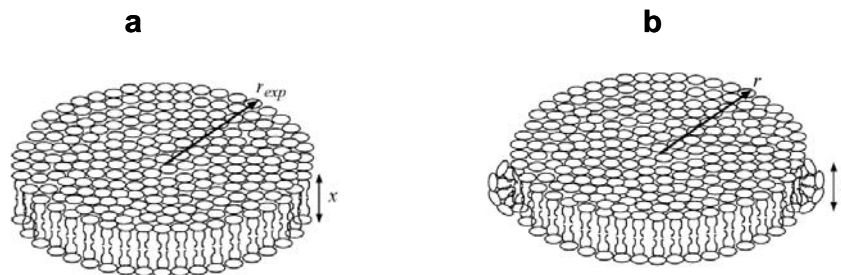


Figure 10. Etat final d'une vésicule rompue à l'interface solide-liquide avec formation d'un disque sur la surface. Cas a) : disque dont le bord comporte des lipides exposant leur partie hydrophobe à l'eau. Cas b) : disque dont le bord comporte des lipides qui ont tendance à se courber afin de diminuer l'aire de contact entre les chaînes hydrophobes et l'eau. D'après [44].

Dans le premier cas (cas a de la figure 10), considérons un disque de rayon r_{exp} et comportant N lipides. Nous pouvons alors écrire une relation reliant r_{exp} à l'aire des têtes polaires a_0 :

$$N = \frac{2\pi r_{exp}^2}{a_0} \Rightarrow r_{exp} = \sqrt{\frac{Na_0}{2\pi}} \quad (6)$$

La variation d'énergie libre accompagnant la formation de ce disque correspond à la somme des énergies libres des têtes polaires exposées et des queues hydrophobes exposées (l'aire totale des parties hydrophobes exposées est égale à $2\pi r_{exp}x$).

La variation d'énergie libre correspondant à l'exposition des chaînes hydrophobes en bord de disque est alors donnée par la relation :

$$G_{bord} = 2\pi r_{exp}x\gamma_{tw} = \gamma_{tw}x\sqrt{2\pi a_0 N} \quad (7)$$

où γ_{tw} correspond à l'énergie interfaciale queues-eau.

La variation d'énergie libre accompagnant la formation du disque vaut :

$$G_{disque-exp} = \gamma_{hw}a_0N + \gamma_{tw}x\sqrt{2\pi a_0 N} \quad (8)$$

Considérons maintenant le deuxième cas (cas b de la figure 10), c'est-à-dire le cas où le bord du disque se déforme. Le disque est alors composé de N_1 molécules de lipides situées dans la partie interne du disque (de rayon r) et de N_2 molécules de lipides situées au bord du disque.

N_1 peut s'écrire :

$$N_1 = \frac{2\pi r^2}{a_0} \quad (9)$$

Le nombre N_2 de molécules de lipides est égal à la surface du bord du disque divisée par l'aire des têtes polaires a_0 et pourra alors s'écrire comme :

$$N_2 = \frac{1}{a_0} 2\pi \frac{x}{2} \int_0^\pi \left(r + \frac{x}{2} \sin \theta' \right) d\theta' = \frac{\pi^2 rx + \pi x^2}{a_0} \quad (10)$$

Comme $N=N_1+N_2$ alors :

$$N = N_1 + N_2 = \frac{2\pi r^2}{a_0} + \frac{\pi^2 rx + \pi x^2}{a_0} \quad (11)$$

La variation d'énergie libre accompagnant la formation du disque vaut alors :

$$G_{disque} = Na_0\gamma_{hw} + G_{courbure} \quad (12)$$

où $G_{courbure}$ correspond à la variation de l'énergie libre associée à la courbure des lipides situés sur le bord du disque.

On obtient alors :

$$G_{courbure} = \frac{1}{2} K_c \int_0^\pi \left(\frac{1}{r+x/2} + \frac{1}{x/2} \right)^2 2\pi \frac{x}{2} \left(r + \frac{x}{2} \sin \theta' \right) d\theta' = 2\pi K_c \frac{(x+r)^2 (\pi r + x)}{(r+x/2)^2 x} \quad (13)$$

Donc, d'après l'équation (11) :

$$r = \frac{1}{2} \left[-\frac{\pi x}{2} + \sqrt{x^2 \left(\frac{\pi^2}{4} - 2 + \frac{2Na_0}{\pi} \right)} \right] \quad (14)$$

La déformation du bord du disque est possible uniquement si :

$$G_{disque-exp} > G_{disque} \quad (15)$$

et donc, d'après (8), (12) et (13) si :

$$\gamma_{tw} x \sqrt{2\pi a_0 N} > 2\pi K_c \frac{(x+r)^2 (\pi r + x)}{(r+x/2)^2 x} \quad (16)$$

ou encore si :

$$K_c < \frac{\gamma_{tw} x^2 (r+x/2)^2 \sqrt{2\pi a_0 N}}{2\pi (x+r)^2 (\pi r + x)} \quad (17)$$

Sur la base de ces calculs, voyons maintenant dans quel cas une vésicule déposée sur une surface peut se rompre de manière spontanée. Considérons l'état final, c'est-à-dire l'état dans lequel la vésicule se casse et forme un disque sur une surface. La variation d'énergie libre de ce système pourra alors s'écrire :

$$\Delta G = G_{disque-substrat} - G_{ves} - G_{eau-substrat} \quad (18)$$

avec :

$$G_{disque-substrat} = \frac{N_1}{2} a_0 \gamma_{hw} + \frac{N_1}{2} a_0 \gamma_{hg} + N_2 a_0 \gamma_{hw} + G_{courbure} \quad (19)$$

La variation d'énergie libre sera alors égale à :

$$\Delta G = \frac{N_1}{2} a_0 (\gamma_{hg} - \gamma_{hw} - \gamma_{wg}) + 2\pi K_c \left(\frac{(x+r)^2 (\pi r + x)}{(r+x/2)^2 x} - 4 \right) \quad (20)$$

où γ_{wg} correspond à la tension interfaciale eau-substrat.

Un disque se forme spontanément lorsque ΔG est négatif c'est à dire lorsque :

$$K_c < \frac{N_1 a_0 (\gamma_{hg} - \gamma_{hw} - \gamma_{wg})}{4\pi \left(\frac{(x+r)^2 (\pi r + x)}{(r+x/2)^2 x} - 4 \right)} \quad (21)$$

ou encore lorsque :

$$\gamma_{hg} < \gamma_{hw} + \gamma_{wg} - \frac{4\pi K_c \left(\frac{(x+r)^2 (\pi r + x)}{(r+x/2)^2 x} - 4 \right)}{N_1 a_0} \quad (22)$$

L'équation 21 montre que de nombreux paramètres influents sur la rupture des vésicules lipidiques adsorbées sur une surface. La figure ci-dessous, résume le comportement possible des vésicules en fonction du nombre N de lipides et de γ_{hg} .

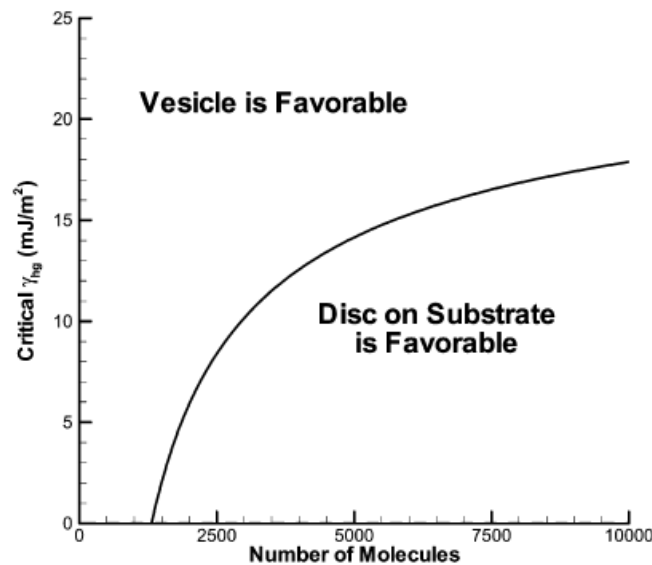


Figure 11. Comportements d'une vésicule en fonction du nombre de molécules N et de la valeur de γ_{hg} . Ici il a été posé $x=2.97$ nm, $a_0=0.717$ nm², $\gamma_{tw}=52$ mJ/m², $\gamma_{wg}=6$ mJ/m² et $K_c=1.2 \cdot 10^{-19}$ J. D'après [44].

La figure 11 montre que la rupture des vésicules est fonction du nombre de têtes polaires en interaction avec la surface. Pour une valeur de γ_{hg} donnée, la rupture de la vésicule sera directement liée à la taille de la vésicule. Dans le cas d'une surface hydrophile, plus le nombre de lipides est grand (taille de vésicule grande) et plus γ_{hg} sera important. Si la surface est hydrophobe, les interactions queues hydrophobes-surface hydrophobe seront grandes. Les queues hydrophobes vont donc s'orienter préférentiellement vers la surface, créant ainsi une tension au sein de la membrane lipidique qui causera alors la rupture de la vésicule. Afin qu'une vésicule résiste à la rupture, il faut que γ_{hg} soit supérieur à une certaine valeur critique. De plus, l'équation 21 montre que le module de rigidité de courbure K_c de la vésicule doit être supérieur à l'expression contenant les tensions interfaciales γ_{hg} , γ_{hw} et γ_{gw} . Ceci signifie que K_c doit compenser les tensions interfaciales. Plus K_c est grand devant γ_{hg} , γ_{hw} et γ_{gw} et plus la vésicule sera résistante à la déformation engendrée par la surface. Comme nous l'avons vu auparavant, K_c peut être augmentée par l'ajout de cholestérol, par adsorption d'un

polyélectrolyte, par greffage de polymère sur la surface ou par polymérisation de la membrane lipidique.

Récemment, Katagiri et al. [50-52] ont réussi à former un nouveau type de vésicules lipidiques entourées d'une couche de silice : les *cérasomes*. Des vésicules de N,N-dihexadecyl-N-(3-triethoxysilyl)propylsuccinamide ont été stabilisées en surface par une couche de silice polymérisée résultant d'une condensation spontanée du groupe triethoxysilyl dans l'eau. La stabilité mécanique de ces *cérasomes* permet de les adsorber sur une surface sans les rompre.

Dans ce travail de thèse, nous désirons adsorber les liposomes sans les rompre et les enfouir ultérieurement sous une multicouche de polyélectrolytes afin de les immobiliser dans un gel quasi bidimensionnel. Afin d'y parvenir, nous allons considérer les hypothèses évoquées par Efremov et al [44].

En résumé, afin d'adsorber des liposomes sur une surface il est nécessaire de choisir :

- une surface hydrophile permettant de favoriser les interactions têtes polaires-surface hydrophile,
- choisir une taille de liposomes (et donc un nombre de lipides) permettant un nombre important d'interactions têtes hydrophiles-surface hydrophile,
- rigidifier suffisamment la membrane (par ajout de cholestérol et par adsorption de polyélectrolytes sur la surface du liposomes) afin de compenser les déformations résultant des tensions de surface.

Les liposomes sont un système de choix pour l'encapsulation de molécules actives. Cependant, ils sont relativement instables du point de vu biologique car ils sont dégradés dans l'organisme par les macrophages par exemple. Du point de vue de leur stabilité mécanique, ils subissent des dégradations lorsqu'ils sont mis au contact d'une surface. C'est pourquoi différentes stratégies ont été mises au point afin de les stabiliser [53]. Nous allons résumer ces stratégies dans le partie suivante.

B. Stabilisation des liposomes

B.1. Polymérisation au sein des liposomes

B.1.1. Insertion de monomères dans la membrane lipidique

Une voie possible permettant de stabiliser les liposomes consiste à utiliser la partie hydrophobe de la membrane lipidique afin de former un maillage polymère. Ce dernier est obtenu à l'issue d'une polymérisation des monomères hydrophobes solubilisés au sein de la membrane lipidique. La polymérisation au sein de la membrane, ne cause pas la rupture des liposomes et permet également la préparation de particules creuses de polymères dont les tailles vont de quelques nanomètres à plusieurs centaines de microns [54-56]. Le choix du type de liposomes de départ (SUV, LUV ou GUV) détermine la taille des capsules qui seront formées. Cependant, l'incorporation de monomères hydrophobes dans la membrane ne doit pas excéder une certaine fraction molaire, auquel cas leur distribution au sein de la membrane n'est plus homogène. D'ailleurs cet aspect est encore matière à discussion [57]. En effet, la polymérisation au sein de la membrane génère un phénomène de séparation de phase donnant à la vésicule un aspect de "framboise" relatif à la formation de microdomaines. Le maillage polymérique est formé grâce à des liaisons covalentes ce qui augmente de façon significative la résistance chimique et physique des vésicules. Le type de polymérisation utilisé dépend d'un certain nombre de facteurs tels que le groupe fonctionnel du monomère et des lipides ainsi que de la concentration du monomère dans la bicouche. Le type de polymérisation le plus souvent utilisé dans ce type de préparation est une polymérisation radicalaire initiée par rayonnement UV [58]. L'avantage de ce type de polymérisation réside dans le fait que le degré de polymérisation est élevé.

Les acrylates sont connus pour être faciles à polymériser. Le groupe du professeur Winterhalter a inséré ce type de monomères dans des liposomes de phosphatidylcholine de 200 nm de diamètre [53]. Un mélange de monomères (butyl methacrylate (BMA) ou hydroxyethyl methacrylate (HEMA)), d'agent de couplage (éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA)) et un photoinitiateur (Irgacure 907) a été ajouté aux liposomes. Après polymérisation et afin de contrôler sa qualité, la matrice lipidique a été solubilisée grâce à l'ajout d'un détergent (Triton X100). Des mesures de diffusion dynamique de la lumière ont montré que le réseau formé par les chaînes polymères enchevêtrées garde la forme tridimensionnelle du liposome. Ceci est possible pourvu que la densité des liens covalents dépasse une valeur critique. Cette méthode est très élégante mais la présence d'un maillage polymérique au sein de la membrane lipidique affecte de façon importante la mobilité des

lipides, ce qui peut altérer la perméabilité de la membrane. Il existe un autre moyen permettant non plus d'inclure dans la partie hydrophobe des monomères hydrophobes mais d'y insérer des polymères plus gros et de nature amphiphile : les copolymères en bloc.

B.1.2. Insertion de copolymères en bloc dans une membrane lipidique

Tout comme les lipides, les copolymères amphiphiles peuvent s'auto-assembler pour former des vésicules ou des micelles et leur caractère amphiphile leur permet également d'être insérés dans une membrane lipidique. C'est le cas, par exemple du copolymère tribloc PMOXA-PDMS-PMOXA [poly(2-méthylloxazoline)-bloc-poly(diméthylsiloxane)-bloc-poly(2-méthylloxazoline)] [55,56]. Ces copolymères tribloc sont nommés ABA du fait de la présence d'une sous-unité hydrophobe (PDMS) formant le bloc central et deux sous-unités hydrophiles (PMOXA) formant les deux extrémités. Différents types de groupements terminaux peuvent être ajoutés au niveau des extrémités du copolymère comme par exemple un groupe méthacrylate. Les méthacrylates peuvent ensuite être polymérisés par réaction radicalaire sous rayonnement UV et ainsi former une écorce rigide. Les propriétés de ces polymères ont largement été décrites dans la littérature. [59,60]. En phase aqueuse, le polymère forme à faible concentration une phase lamellaire de 10 nm d'épaisseur et des vésicules de 50 à 500 nm de diamètre peuvent être produites. Certaines vésicules peuvent être fonctionnalisées par l'incorporation de protéines membranaires spécifiques [61]. Cette observation est relativement surprenante car l'épaisseur de la partie hydrophobe est trois fois plus importante que celle d'une membrane lipidique conventionnelle. Il semble que cela soit possible grâce à une adaptation locale du bloc PDMS par rapport à la protéine membranaire. L'incorporation de ces canaux membranaires permet de créer de nouveaux types de nanoréacteurs. Ces canaux permettent le passage des substrats de l'extérieur de la vésicule vers l'intérieur qui vont ensuite réagir avec une enzyme encapsulée. Cette dernière présente l'avantage d'être moins soumise à des perturbations extérieures, notamment la présence d'enzymes protéolytiques. Cela permet en général d'augmenter la durée de vie moyenne de l'enzyme.

Les vésicules constituées par un mélange de copolymère ABA et de lipides ont également été fabriquées. La polymérisation de ces copolymères forme un maillage qui rend la membrane lipidique plus robuste. Cependant, les questions relatives aux interactions entre les lipides et les polymères amphiphiles sont relativement complexes, et toujours d'actualité. La membrane de polymère comporte une surface hydrophile et une partie centrale hydrophobe. La sous-

unité PMOXA est longue et flexible. Une vésicule composée de copolymères ABA possède une épaisseur de 10 nm alors que celle d'une membrane lipidique est de 3-5 nm [53,61]. Par conséquent, le comportement des lipides au sein d'une membrane de polymère doit être étudié de façon détaillée. Certaines expériences ont été réalisées afin de décrire la distribution de ces lipides dans la matrice de polymère. Deux hypothèses s'affrontent afin de savoir si cette distribution est homogène ou hétérogène. Des études préliminaires de fluorescence ont été effectuées. Ainsi des lipides marqués par de la rhodamine ont été insérés dans une membrane lipidique composée de phosphatidylcholine mais également dans une membrane de polymère. En comparant les signaux de fluorescence, il a été montré que les lipides sont distribués de manière homogène dans les deux types de membranes [62]. Afin de confirmer ce résultat d'autres études doivent être menées.

B.2 Liposomes et multicouche de polyélectrolytes

Des capsules de polyélectrolytes ont été préparées par adsorption séquentielle de polycations et de polyanions à la surface de colloïdes chargés telles que des billes polymériques, des particules inorganiques (carbonates de calcium), des cristaux de protéines, des globules rouges et même des liposomes. Avant d'aller plus en avant, il est nécessaire de décrire la méthode de dépôt couche par couche (LBL).

B.2.1. Principe de la méthode de dépôt couche par couche (LBL)

En 1966, Iler a démontré la possibilité de construire des multicouches de particules colloïdales anioniques et cationiques basées sur les interactions électrostatiques [63]. A l'époque, en raison du manque d'équipement dans le domaine de la caractérisation physicochimique des surfaces, la nature stratifiée de ces films n'avait jamais pu être démontrée. De ce fait, ce concept fut abandonné pendant plus de 20 ans. Dans les années 1980, des travaux d'adsorption ont été repris sur des systèmes protéines-polyélectrolytes ou des systèmes colloïdaux biologiques (complexes hexadécylamine-héparine) [64]. Cependant, la construction de tels films ne pouvait excéder cinq ou six couches en raison de problèmes de floculation en surface.

Ce n'est qu'à partir du début des années 1990 que Decher et al. ont généralisé la méthode d'assemblage couche par couche de polyélectrolytes [65-72]. Le principe de la méthode couche par couche est décrit dans la figure 12.

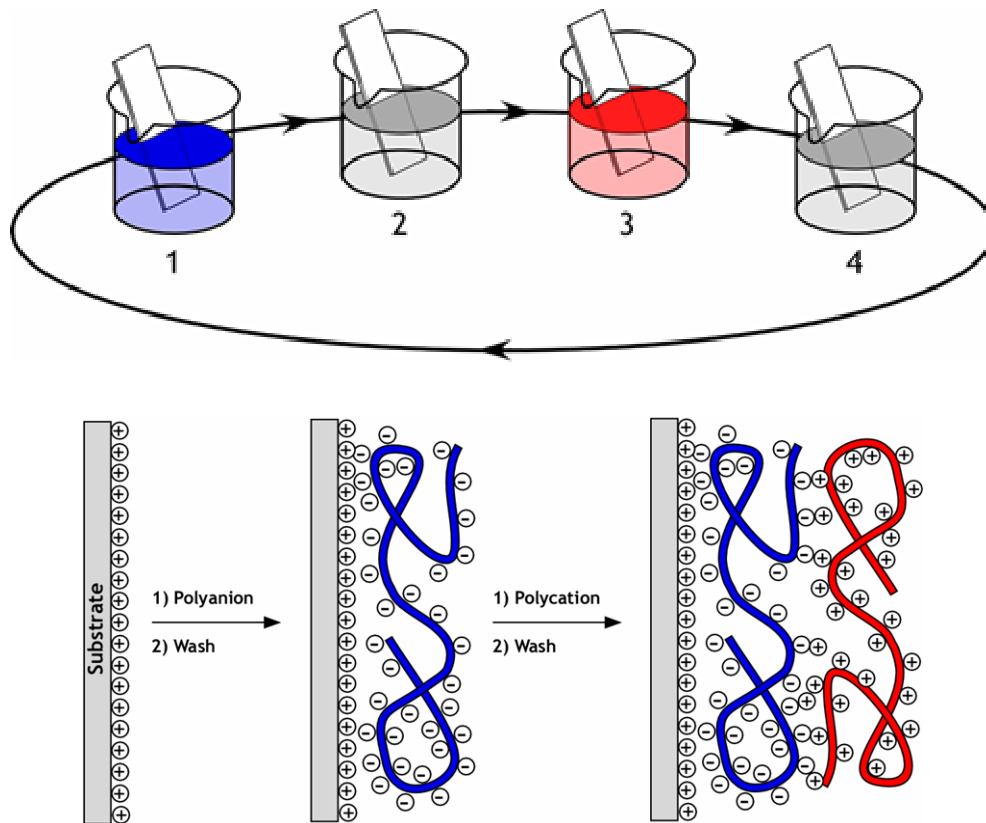


Figure 12. Représentation schématique de la construction d'un film sur un support par la méthode couche par couche. D'après [66].

Dans cette méthode de dépôt, un substrat chargé négativement (ou positivement) est plongé dans une solution de polyélectrolytes de charge opposée pendant un temps court (5 à 20 min) [73-75]. Les polyélectrolytes présents en solution s'adsorbent sur la surface du substrat et le surplus est éliminé par rinçage [76,77]. La surcompensation des charges lors de l'adsorption conduit à inverser le signe de la charge de surface : la surface devient positive dans le cas d'un substrat initialement chargé négativement [78,79]. Ceci permet l'adsorption d'un second polyélectrolyte, de charge opposée au précédent. Cette nouvelle adsorption est également suivie d'une étape de rinçage et le signe de surface s'inverse à nouveau. Des étapes successives d'adsorption alternée de polyélectrolytes de charge opposée permettent la construction d'un film. Dans les systèmes de polyélectrolytes étudiés initialement, notamment ceux où le polyanion est le poly-4-styrène sulfonate et le polycation est la polyallylamine, les films obtenus présentent une faible interpénétration entre les chaînes polycationiques et polyanioniques : ces films présentent donc un degré de stratification assez élevé. Grâce aux multiples interactions électrostatiques entre les polyélectrolytes et le substrat et entre les couples de polyélectrolytes, les films présentent une bonne uniformité et une forte adhésion

sur le substrat. Le phénomène de surcompensation de charge à chaque étape de dépôt a largement été démontré par des mesures de potentiels zêta qui donne la valeur du potentiel de surface au niveau de la couche hydrodynamique stationnaire à une interface solide-liquide [74,79,80]. Des mesures optiques et microgravimétriques (par microbalance à cristal de quartz) ont montré que l'épaisseur de ces films ainsi que leur masse augmentaient de manière linéaire avec le nombre de paires de couches déposées. Il existe cependant des films multicouches de polyélectrolytes, construits selon le même principe, dont l'épaisseur et la masse augmentent de façon exponentielle avec le nombre de paires de couches déposées. Le premier système de ce type a été obtenu avec l'acide polyalginate comme polyanion et la poly-L-lysine comme polycation. Depuis lors, de nombreux films de polyélectrolytes à croissance exponentielle ont été mis en évidence.

Un des gros avantages des films à croissance exponentielle par rapport aux films à croissance linéaire est la possibilité d'atteindre des épaisseurs élevées (supérieures à 1 μm) après le dépôt de seulement une dizaine de paires de couches. Le régime de croissance est cependant modifié par le pH de la solution ainsi que par sa force ionique. Il a été démontré dans notre laboratoire que le régime de croissance exponentielle était lié à la diffusion vers l'intérieur et vers l'extérieur du film de l'un au moins des deux polyélectrolytes constituant la multicouche [81-83]. Le mécanisme mis en jeu dans ce type de croissance est le suivant : lorsqu'une multicouche est mise au contact avec une solution de polyélectrolytes, ces derniers vont à la fois interagir avec l'excès de charge du polyélectrolyte déposé lors de l'étape précédente mais vont également pouvoir diffuser à l'intérieur du film formant un réservoir de polyions libres. A la fin de la phase d'adsorption-diffusion dans le film, il se crée une barrière de potentiel à la surface du film. Lors de la phase de rinçage, seule une partie des polyions libres peut diffuser hors du film. Lorsque ce film est à nouveau mis en contact avec une solution contenant le polyélectrolyte chargé de signe opposé, celui-ci va interagir avec l'excès de charge en surface en faisant disparaître la barrière de potentiel. Les polyions libres restant dans le film peuvent donc diffuser jusqu'au niveau de l'interface film-solution où ils forment un complexe avec les nouveaux polyélectrolytes. La masse de cette nouvelle couche est directement proportionnelle à la quantité de polyions libres restant dans le film après la phase de rinçage si l'on fait l'hypothèse que la fraction de chaînes mobiles est la même quelque soit la localisation des chaînes dans le film.

La force ionique est un paramètre influençant l'épaisseur du film obtenu. En effet, l'épaisseur du film est directement liée au taux de sel présent dans les solutions de polyélectrolytes qui

servent à construire le film. Jusqu'à une certaine limite de force ionique, l'épaisseur du film augmente avec la valeur du taux de sel [79] : l'épaisseur par paire de couches déposée semble être une loi de puissance du taux de sel jusqu'à une force ionique limite à partir de laquelle le film se décompose. A faible taux de sel, les molécules de polyélectrolyte sont rigides et caractérisées par une importante longueur de persistance due aux répulsions électrostatiques intramoléculaires. A fort taux de sel, les charges du polyélectrolyte sont écrantées ce qui lui confère une conformation repliée. Il a également été démontré que la force ionique influe sur le comportement du film déjà construit. En effet, une fois le film formé, il peut se restructurer, notamment gonfler si le rinçage est effectué avec une solution dont la teneur en sel est inférieure à celle de la solution des polyélectrolytes et inversement [79].

Le plus souvent, les substrats sur lesquels les films sont construits sont des surfaces planes ou des particules sphériques. Ainsi des films ont pu être construits sur des surfaces en verre, en silice, en silicium recouvert d'un film mince d'oxyde, en mica, en métal (or, argent, oxydes), polymères...[84-96]. Ainsi, cette méthode de dépôt couche par couche n'impose pas de restriction sur la taille ou la forme du support, ce qui permet de concevoir des structures bi ou tridimensionnelles [97]. Ainsi le groupe du professeur Möhwald a mis au point, par le biais de la technique LBL, un nouveau type de capsules : les capsules creuses à enveloppe de polyélectrolytes.

B.2.2. Adsorption de polyélectrolytes sur des liposomes

Cette technique, développée à partir de 1998, est basée sur l'adsorption LBL de couches de polyélectrolytes sur un support sphérique chargé [98,99]. Comme pour les films construits sur des supports planaires, l'épaisseur du film de polyélectrolytes sur le support colloïdal dépend du nombre de paires de couches déposées ainsi que du taux de sel de la solution utilisée. En général, la formation des capsules implique dans un premier temps le choix d'un support colloïdal puis, dans un deuxième temps, la préparation d'un film de polyélectrolytes. Le choix et la nature du support sont essentiels, car c'est la taille de celui-ci qui va déterminer la taille de la capsule. Différents supports tels que des colloïdes organiques ou inorganiques, des cellules biologiques, des micro et nanocristaux ont été utilisés depuis ces dernières années et des capsules dont le diamètre varie de 10 nm à plusieurs microns ont pu être formées.

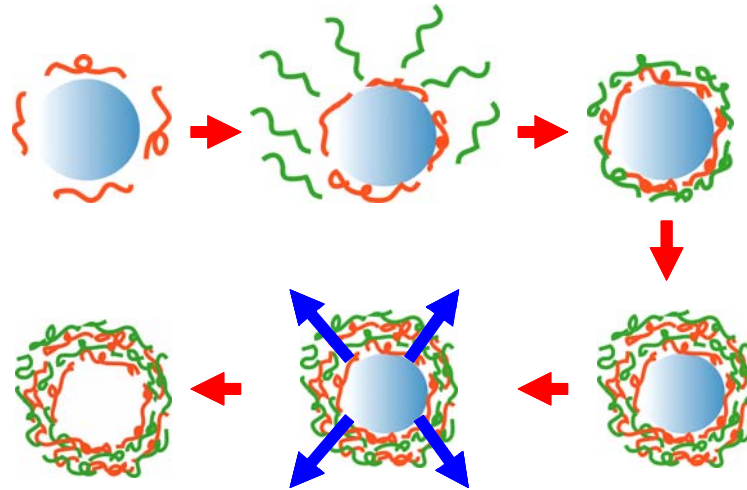


Figure 13. Représentation schématique de la formation de capsules creuses de polyélectrolytes sur un support sphérique. Un polyélectrolyte A (rouge) et un polyélectrolyte B chargé de signe opposé à A (vert) sont alternativement adsorbés sur un support sphérique. Une fois le film construit, le support est dissout laissant place à une capsule creuse de polyélectrolytes. D'après [98,99].

Les polyélectrolytes utilisés afin de construire le film peuvent être soit des polyélectrolytes synthétiques (comme par exemple le poly-4-styrène sulfonate, la polyallylamine, le chlorure de polydiallyldiméthyl ammonium) soit des polymères naturels (chitosan et ses dérivés), des polypeptides, des polynucléotides, des lipides, etc... C'est le choix des constituants du film qui va influencer les propriétés de la capsule telles que l'épaisseur, la perméabilité, la stabilité ou encore la biocompatibilité.

Dans la plupart des cas, les colloïdes support peuvent être éliminés sans nuire pour autant à l'intégrité de la couche de polyélectrolytes, ce qui conduit à la formation d'une capsule creuse ayant une forme, une taille (conditionnée par celle du substrat) et une épaisseur bien définies. Dans ce cas, la perméabilité, et donc la libération des molécules encapsulées au sein de la membrane de polyélectrolytes dépend fortement de son épaisseur et de sa composition. Des paramètres tels que le pH, la nature du solvant mis en contact avec les capsules et la force ionique induisent un gonflement et un dégonflement de la capsule qui permet de contrôler cette perméabilité [100,101]. La perméabilité de la membrane peut être gérée par contrôle du pH, et des molécules dont les masses moléculaires sont comprises entre 5 et 5000 kDa peuvent ainsi diffuser à l'intérieur de la capsule à partir du milieu extérieur. Pour de plus petites molécules, l'écorce de polyélectrolytes est en général plus perméable. Ces caractéristiques permettent non seulement l'encapsulation de molécules au sein des capsules mais également d'utiliser ces dernières comme réacteurs chimiques [102].

Récemment, le groupe du professeur Möhwald a tenté de combiner la stabilité mécanique induite par le film de polyélectrolytes sur les liposomes et les avantages des liposomes [100,101]. Pendant la préparation des liposomes, il est relativement simple d'encapsuler des molécules actives et d'insérer dans la membrane lipidique des protéines membranaires. Ces dernières permettent le passage de quelques molécules (bien ciblées par le choix de la protéine membranaire enchassée dans la bicouche lipidique). Dans ce cas, les liposomes ont été recouverts d'un film de polyélectrolytes ce qui a pour effet d'augmenter leur stabilité mécanique sans affecter leur perméabilité. Afin de préparer les vésicules recouvertes de polyélectrolytes, Möhwald et al. ont utilisé des liposomes constitués d'un mélange de lipides neutres (phosphatidylcholine) et chargés négativement (phosphatidylsérine) [53]. Les polyélectrolytes choisis pour la construction du film ont été le polystyrène sulfonate (PSS), chargé négativement et la polyallyamine (PAH) chargée positivement. Des mesures de diffusion dynamique de la lumière ont été effectuées sur les liposomes recouverts de polyélectrolytes et ont montré que l'adsorption n'entraîne pas l'agrégation des vésicules.

La méthode de stabilisation des vésicules lipidiques décrite par Möhwald et al. permet d'augmenter de façon importante le module de rigidité des liposomes sans pour autant altérer l'intégrité de ceux-ci. Cette technique nous semble la plus séduisante et a donc été choisie afin de rendre les liposomes suffisamment rigides pour être adsorbés sur une surface.

Conclusion et Stratégie

La déposition et l'enfouissement de liposomes intacts dans un film multicouche de polyélectrolytes constitue un nouveau type de surface multicomposite pouvant interagir avec le milieu environnant (capteur chimique, libération de substance encapsulée). Cependant, les liposomes ne sont pas suffisamment "robustes" pour être déposés puis enfouies sur et dans un film multicouche sans craindre leur rupture. Un grand nombre de travaux ont tenté de pallier à ce problème de fragilité des liposomes : insertion de monomères hydrophobes dans la membrane puis polymérisation, insertion de copolymères en bloc, adsorption de polymères sur la surface. Toutes ces techniques tendent à rigidifier la membrane. Cependant certaines techniques peuvent modifier la perméabilité des membranes lipidiques en raison d'apparition de microdomaines. En fonction de tout le travail décrit dans la littérature, nous avons décidé de travailler avec des liposomes non polymérisés et recouverts d'une monocouche de polyélectrolytes. Möhwald et al. ont montré que l'adsorption de polyélectrolytes sur les liposomes augmente de façon importante leur rigidité sans pour autant modifier leur

perméabilité. C'est précisément ce type de stratégie qui nous a inspiré. De plus, si cette stratégie permet de déposer des liposomes tout en gardant leur intégrité de forme et de perméabilité, il sera alors possible de créer des réacteurs immobilisés dans un film de polyélectrolytes. Avant même de procéder à la stabilisation puis à l'enfouissement de liposomes dans un film de polyélectrolytes, le premier objectif de cette thèse a consisté à générer des réactions chimiques se produisant uniquement dans un environnement clos. Le choix c'est tout naturellement tourné vers les liposomes géants en solution car ils peuvent facilement être observé par microscopie optique. Walde et al. ont montré que de petites molécules amphiphiles, dont la taille est de l'ordre de 350 g.mol^{-1} , diffusent à travers la membrane du liposome avant de réagir avec des protéines préalablement encapsulées. S'inspirant des travaux effectués par les groupes des professeurs Walde et Möhwald nous avons scindé ce travail en deux principales parties. La première consiste à créer à partir de vésicules géantes en solution des microréacteurs dans lesquels une réaction enzymatique puis la précipitation de cristaux de phosphates de calcium ont lieu. La seconde partie concerne la stabilisation puis l'enfouissement de liposomes unilamellaires de quelques centaines de nanomètres de diamètre que nous avons utilisé afin de créer des réservoirs puis des réacteurs immobilisés.

Références Bibliographiques

- [1] Shechter, E. *Biochimie et Biophysique des membranes*; 2nd ed.; Masson, 1993.
- [2] Israelachvili, J. N. *Intermolecular and surface forces*; 2nd ed.; Academic Press, 1992.
- [3] Lipowsky, R., Sackmann, E. *Structure and dynamics of membranes*; Elsevier sciences B.V, 1995.
- [4] Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238-252.
- [5] Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. et al. *Molecular biology of the cell*; 2 nd. ed.; Garland Publishing Inc.: New York, 1989.
- [6] Binder, W. H.; Barragan, V.; Menger, F. M. Domains and Rafts in Lipid Membranes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5802-5827.
- [7] Heimburg, T. A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1154-1165.
- [8] Rappolt, M.; Pabst, G.; Rapp, G.; Kriechbaum, M.; Amenitsch, H. et al. New evidence for gel-liquid crystalline phase coexistence in the ripple phase of phosphatidylcholines. *Eur. Biophys. J.* **2000**, *29*, 125-133.
- [9] Seydel, U.; Brandenburg, K.; Lindner, B.; Moll, H. The influence of phospholipidosis inducing drugs on the phase transition of lipids. *Thermochim. Acta* **1981**, *49*, 35-48.
- [10] Blandamer, M. J.; Briggs, B. Formation of vesicular bilayers in aqueous solutions containing mixtures of dialkyldimethylammonium bromides. *J. Mol. Liq.* **1998**, *75*, 181-187.
- [11] Garibel, P.; Blume, A. Miscibility of phospholipids with identical headgroups and acyl chain lengths differing by two methylene units: Effects of headgroup structure and headgroup charge. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1371*, 83-95.
- [12] Garibel, P.; Blume, A. Miscibility of phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol mixtures as a function of pH and acyl chain length. *Eur. Biophys. J.* **2000**, *28*.
- [13] Lee, C. H.; Petrov, P.; Döbereiner, H. G. Curvature of zwitterionic membranes in transverse pH gradients. *Langmuir* **1999**, *15*, 8543-8546.
- [14] Akutsu, H.; Seelig, J. Interaction of metal ions with phosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochemistry* **1981**, *20*, 7366-7373.
- [15] Baeckmark, T.; Elender, G.; Lasic, D.; Sackmann, E. Conformational transitions of mixed monolayers of phospholipids and poly(ethylene oxide) lipopolymers and interaction forces with surfaces. *Langmuir* **1995**, *11*, 3975-3987.

- [16] Bruinsma, R.; Behrisch, A.; Sackmann, E. Adhesive switching of membrane: experiment and theory. *Phys. Rev. E* **2000**, *61*, 4253.
- [17] Kuhl, T.; Leckband, D.; Lasic, D.; Israelachvili, J. Modulation of interaction force between bilayers exposing short-chained Ethylene-Oxide headgroups. *Biophys. J.* **1994**, *66*, 1479-1488.
- [18] Ge, L. Q.; Mohwald, H.; Li, J. B. Phospholipid liposomes stabilized by the coverage of polyelectrolyte. *Colloids Surf. A* **2003**, *221*, 49-53.
- [19] Yaroslavov, A. A.; Udaykh, O. Y.; Melik-Nubarov, N. S.; Kabanov, V. A.; Ermakov, A. Y. et al. Conventional and gemini surfactants embedded within bilayer membranes: Contrasting behavior. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4835-4843.
- [20] Crowell, K. J.; McDonald, J. Characterization of Cationic Polyelectrolyte-Induced Domains in Mixed POPG-POPC Lipid Bilayers via 2H NMR. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 1105-1109.
- [21] Crowell, K. J.; McDonald, J. Surface Charge Dependence of Polyelectrolyte-Induced Domain Size and Composition in Lipid Bilayer Membranes. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9091-9100.
- [22] Mitrakos, P.; Macdonald, P. M. DNA-induced lateral segregation of cationic amphiphiles in lipid bilayer membranes as detected via 2H NMR. *Biochemistry* **1996**, *35*, 16714-16722.
- [23] Mitrakos, P.; Macdonald, P. M. Domains in cationic lipid plus polyelectrolyte bilayer membranes: detection and characterization via 2H nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **1997**, *36*, 13646-13656.
- [24] Raudino, A. Lateral inhomogeneous lipid membranes: theoretical aspects. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1995**, *57*, 229-285.
- [25] Houslay, M. D. *Dynamics of Biological Membranes*; Wiley: New York, 1982.
- [26] Landry, Y.; Gies, J. *Pharmacologie: Des cibles vers l'indication thérapeutique*; Dunod, 2003.
- [27] Singer, S. J.; Nicholson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **1972**, *175*, 720-731.
- [28] Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*; W H Freeman & Co, 2004.
- [29] Walde, P. Enzymatic reactions in liposomes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, *1*, 638-644.

- [30] Walde, P.; Ichikawa, S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomol. Eng.* **2001**, *18*, 143-177.
- [31] Walde, P.; Marzetta, B. Bilayer permeability-based substrate selectivity of an enzyme in liposomes. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *57*, 216-219.
- [32] Cremer, P. S.; Boxer, S. G. Formation and Spreading of Lipid Bilayers on Planar Glass Supports. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2554-2559.
- [33] Egawa, H.; Furusawa, K. Liposome Adhesion on Mica Surface Studied by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **1999**, *15*, 1660-1666.
- [34] Jass, J.; Tjarnhage, T.; Puu, G. From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 3153-3163.
- [35] Lingler, S.; Rubinstein, I.; Knoll, W.; Offenhausser, A. Fusion of Small Unilamellar Lipid Vesicles to Alkanethiol and Thiolipid Self-Assembled Monolayers on Gold. *Langmuir* **1997**, *13*, 7085-7091.
- [36] Puu, G.; Gustafson, I. Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes--factors of importance for kinetics and stability. *Biochim. Biophys. Acta.* **1997**, *1327*, 149-161.
- [37] Rädler, J.; Strey, H. Phenomenology and Kinetics of Lipid Bilayer Spreading on Hydrophilic Surfaces. *Langmuir* **1995**, *11*, 4539-4548.
- [38] Raviakine, I.; Brisson, A. Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **2000**, *16*, 1806-1815.
- [39] Reimhult, E.; Höök, F.; Kasemo, B. Vesicle adsorption on SiO₂ and TiO₂: Dependence on vesicle size. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 7401-7404.
- [40] Richter, R.; Mukhopadhyay, A.; Brisson, A. Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3035-3047.
- [41] Keller, C. A.; Kasemo, B. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1397-1402.
- [42] Reimhult, E.; Hook, F.; Kasemo, B. Temperature dependence of formation of a supported phospholipid bilayer from vesicles on SiO₂. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter. Phys.* **2002**, *66*, 051905.
- [43] Johnson, J. M.; Ha, T.; Chu, S.; Boxer, S. G. Early steps of supported bilayer formation probed by single vesicle fluorescence assays. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 3371-3379.

- [44] Efremov, A.; Mauro, J. C.; Raghavan, S. Macroscopic Model of Phospholipid Vesicle Spreading and Rupture. *Langmuir* **2004**, *20*, 5724-5731.
- [45] Tanford, C. *The hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*; 2nd ed.; Wiley: New York, 1980.
- [46] Helfrich, W. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z. Naturforsch. [C]* **1973**, *28*, 693-703.
- [47] Helfrich, W. Lipid Bilayer spheres : deformation and birefringence in magnetic fields. *Physics. Lett. A.* **1973**, *43*, 409-410.
- [48] Helfrich, W. The size of sonicated vesicles. *Physics. Lett. A.* **1974**, *50*, 115-116.
- [49] Sackmann, E. The Seventh Datta Lecture. Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions. *FEBS lett.* **1994**, *346*, 3-16.
- [50] Katagiri, K.; Ariga, K.; Kikuchi, J. Preparation of organic-inorganic hybrid vesicle "cerasome" derived from artificial lipid with alkoxysilyl head. *Chem. Lett.* **1999**, *7*, 661-662.
- [51] Katagiri, K.; Hamasaki, R.; Ariga, K.; Kikuchi, J. Layer-by-layer self-assembling of liposomal nanohybrid "cerasome" on substrates. *Langmuir* **2002**, *18*, 6709-6711.
- [52] Katagiri, K.; Hamasaki, R.; Ariga, K.; Kikuchi, J. Layered paving of vesicular nanoparticles formed with cerasome as a bioinspired organic-inorganic hybrid. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7892-7893.
- [53] Ruyschaert, T.; Germain, M.; Pereira da Silva Gomes, J. F.; Fournier, D.; Sukhorukov, G. B. et al. Liposome-Based Nanocapsules. *IEEE Transactions on Nanobioscience* **2004**, *3*.
- [54] Graff, A.; Winterhalter, M.; Meier, W. Nanoreactors from polymer-stabilized liposomes. *Langmuir* **2001**, *17*, 919-923.
- [55] Hotz, J.; Meier, W. Vesicle-Templated Polymer Hollow Spheres. *Langmuir* **1998**, *14*, 1031-1036.
- [56] Hotz, J.; Meier, W. Polymer Particles by Templating of Vesicles. *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 1387-1390.
- [57] Jung, M.; Hubert, D.; Bomans, P.; Frederick, P.; Herk, A. et al. Topology map for novel vesicle-polymer hybrid architectures. *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 210-213.
- [58] Decker, C. Photoinitiated crosslinking polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **1996**, *21*, 593-650.

- [59] Nardin, C.; Widmer, J.; Winterhalter, M.; Meier, W. Amphiphilic block copolymer nanocontainers as bioreactors. *Eur. Phys. J. E* **2001**, *4*, 403-410.
- [60] Nardin, C.; Winterhalter, M.; Meier, W. Giant free-standing ABA triblock copolymer membranes. *Langmuir* **2000**, *16*, 7708-7712.
- [61] Rigaud, J. L.; Pitard, B.; Levy, D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: Application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1231*, 223-246.
- [62] Ruyschaert, T.; Sonnen, A. F. P.; Haeefele, T.; Meier, W.; Winterhalter, M. et al. Hybrid Nanocapsules: Interactions of ABA Block Copolymers with Liposomes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6242-6247.
- [63] Iler, R. K. Multilayers of colloidal particles. *J. Colloid Interf. Sci.* **1966**, *21*, 569-594.
- [64] Gölander, C. G.; Arwin, H.; Ericksson, J. C.; Lundstrom, I.; Larsson, R. Heparin surface film formation through adsorption of colloidal particles studied by ellipsometry and scanning electron microscopy. *Coll. Surf.* **1982**, *5*, 1-16.
- [65] Decher, G. *Templating, Self-Assembly and Self-Organization*; Ed.: J.-P. Sauvage et M. W. Hosseini, Oxford: Pergamon Press, 1996.
- [66] Decher, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232-1237.
- [67] Decher, G.; Eckle, M.; Schmitt, J.; Struth, B. Layer-by-layer assembled multicomposite films. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1998**, *3*, 32.
- [68] Decher, G.; Hong, J. D. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: I. consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles. *Makromol. Chem., Macromol. Symp* **1991**, *46*, 321.
- [69] Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* **1992**, 831-835.
- [70] Decher, G.; Lehr, B.; Lowack, K.; Lvov, Y.; Schmitt, J. New nanocomposite films for biosensors: Layer-by-layer adsorbed films of polyelectrolytes, proteins or DNA. *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, 677.
- [71] Decher, G.; Lvov, Y.; Schmitt, J. Proof of multilayer structural organization in self-assembled polycation-polyanion molecular films. *Thin Solid Films* **1994**, *244*, 772-777.

- [72] Decher, G.; Schmitt, J. Fine-tuning of the film thickness of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes. *Prog. Colloid Polym. Sci.* **1992**, *89*, 160.
- [73] Advincula, R.; Aust, E.; Meyer, W.; Knoll, W. In Situ Investigations of Polymer Self-Assembly Solution Adsorption by Surface Plasmon Spectroscopy. *Langmuir* **1996**, *12*, 3536-3540.
- [74] Hoogeveen, N. G.; Cohen Stuart, M. A.; Fler, G. J.; Bohmer, M. R. Formation and Stability of Multilayers of Polyelectrolytes. *Langmuir* **1996**, *12*, 3675-3681.
- [75] Ramsden, J. J.; Lvov, Y. M.; Decher, G. Determination of optical constants of molecular films assembled via alternate polyion adsorption. *Thin Solid Films* **1995**, *254*, 246-251.
- [76] Caruso, F.; Donath, E.; Mohwald, H. Influence of Polyelectrolyte Multilayer Coatings on Förster Resonance Energy Transfer between 6-Carboxyfluorescein and Rhodamine B-Labeled Particles in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B.* **1998**, *102*, 2011-2016.
- [77] Lvov, Y.; Ariga, K.; Onda, M.; Ichinose, I.; Kunitake, T. A careful examination of the adsorption step in the alternate layer-by-layer assembly of linear polyanion and polycation. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, *146*, 337-346.
- [78] Caruso, F.; Furlong, D. N.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T. Characterization of Polyelectrolyte-Protein Multilayer Films by Atomic Force Microscopy, Scanning Electron Microscopy, and Fourier Transform Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy. *Langmuir* **1998**, *14*, 4559-4565.
- [79] Ladam, G.; Schaad, P.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Decher, G. et al. In Situ Determination of the Structural Properties of Initially Deposited Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir* **2000**, *16*, 1249-1255.
- [80] Caruso, F.; Lichtenfeld, H.; Donath, E.; Mohwald, H. Investigation of Electrostatic Interactions in Polyelectrolyte Multilayer Films: Binding of Anionic Fluorescent Probes to Layers Assembled onto Colloids. *Macromolecules* **1999**, *32*, 2317-2328.
- [81] Boulmedais, F.; Ball, V.; Schwinte, P.; Frisch, B.; Schaaf, P. et al. Buildup of Exponentially Growing Multilayer Polypeptide Films with Internal Secondary Structure. *Langmuir* **2003**, *19*, 440-445.
- [82] Lavalle, P.; Gergely, C.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Schaaf, P. et al. Comparison of the Structure of Polyelectrolyte Multilayer Films Exhibiting a Linear and an

- Exponential Growth Regime: An in Situ Atomic Force Microscopy Study. *Macromolecules* **2002**, *35*, 4458-4465.
- [83] Picart, C.; Mutterer, J.; Richert, L.; Luo, Y.; Prestwich, G. D. et al. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, *99*, 12531-12535.
- [84] Caruso, F.; Niikura, K.; Furlong, D. N.; Okahata, Y. 1. Ultrathin Multilayer Polyelectrolyte Films on Gold: Construction and Thickness Determination. *Langmuir* **1997**, *13*, 3422-3426.
- [85] Caruso, F. Hollow Capsule Processing through Colloidal Templating and Self-Assembly. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 413-419.
- [86] Caruso, F.; Caruso, R. A.; Möhwald, H. Nanoengineering of Inorganic and Hybrid Hollow Spheres by Colloidal Templating. *Science* **1998**, *282*, 1111-1114.
- [87] Chen, W.; McCarthy, T. J. Layer-by-Layer Deposition: A Tool for Polymer Surface Modification. *Macromolecules* **1997**, *30*, 78-86.
- [88] Delcorte, A.; Bertrand, P.; Wischerhoff, E.; Laschewsky, A. Adsorption of Polyelectrolyte Multilayers on Polymer Surfaces. *Langmuir* **1997**, *13*, 5125-5136.
- [89] Donath, E.; Walther, D.; Shilov, V. N.; Knippel, E.; Budde, A. et al. Nonlinear Hairy Layer Theory of Electrophoretic Fingerprinting Applied to Consecutive Layer by Layer Polyelectrolyte Adsorption onto Charged Polystyrene Latex Particles. *Langmuir* **1997**, *13*, 5294-5305.
- [90] Ho, P. K. H.; Granström, M.; Friend, R. H.; Greenham, N. C. Ultrathin Self-Assembled Layers at the ITO Interface to Control Charge Injection and Electroluminescence Efficiency in Polymer Light-Emitting Diodes. *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 769-774.
- [91] Hsieh, M. C.; Farris, R. J.; McCarthy, T. J. Surface "Priming" for Layer-by-Layer Deposition: Polyelectrolyte Multilayer Formation on Allylamine Plasma-Modified Poly(tetrafluoroethylene). *Macromolecules* **1997**, *30*, 8453-8458.
- [92] Kim, D. K.; Han, S. W.; Kim, C. H.; Hong, J. D.; Kim, K. Morphology of multilayers self-assembled by electrostatic attraction of oppositely charged polyelectrolytes. *Thin Solid Films* **1999**, *350*, 153-160.
- [93] Kurth, D. G.; Osterhout, R. In Situ Analysis of Metallosupramolecular Coordination Polyelectrolyte Films by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. *Langmuir* **1999**, *15*, 4842-4846.

- [94] Liu, Y. J.; Wang, A. B.; Claus, R. O. Layer-by-layer electrostatic self-assembly of nanoscale Fe₃O₄ particles and polyimide precursor on silicon and silica surfaces. *Appl. Phys. Lett* **1997**, *71*, 2265-2267.
- [95] Lvov, Y.; Decher, G.; Möhwald, H. Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine). *Langmuir* **1993**, *9*, 481-486.
- [96] Schmitt, J.; Gruenewald, T.; Decher, G.; Pershan, P. S.; Kjaer, K. et al. Internal structure of layer-by-layer adsorbed polyelectrolyte films: a neutron and x-ray reflectivity study. *Macromolecules* **1993**, *25*, 7058-7063.
- [97] Hammond, P. T. Recent explorations in electrostatic multilayer thin film assembly. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4*, 430-442.
- [98] Sukhorukov, G. B.; Donath, E.; Davis, S.; Lichtenfeld, H.; Caruso, F. et al. Stepwise polyelectrolyte assembly on particle surfaces: a novel approach to colloid design. *Polymers Adv. Technol.* **1998**, *9*, 759-767.
- [99] Sukhorukov, G. B.; Donath, E.; Lichtenfeld, H.; Knippel, E.; Knippel, M. et al. Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids Surf. A* **1998**, *137*, 253-266.
- [100] Georgieva, R.; Moya, S.; Hin, M.; Mitlohner, R.; Donath, E. et al. Permeation of macromolecules into polyelectrolyte microcapsules. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 517-524.
- [101] Sukhorukov, G. B.; Antipov, A. A.; Voigt, A.; Donath, E.; Möhwald, H. pH-controlled macromolecule encapsulation in and the release from polyelectrolyte multilayer nanocapsules. *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, *22*, 44-46.
- [102] Antipov, A. A.; Sukhorukov, G. B.; Leporatti, S.; Radtchenko, I. L.; Donath, E. et al. Polyelectrolyte multilayer capsule permeability control. *Colloids Surf. A* **2002**, *198*, 535-541.

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

A. Matériels	51
A.1. Polypeptides et polyélectrolytes	51
A.2. Les lipides et liposomes	52
A.3. Solutions de travail	54
A.4. Produits utilisés pour effectuer des réactions au sein des liposomes	55
A.4.1. Phosphatase alcaline	55
A.4.2. La spermine	57
A.5. Solvants et autres produits utilisés	57
B. Méthodes	59
B.1. Méthodes de fabrication des liposomes	59
B.1.1. Préparation des vésicules multilamellaires de grande taille (MLVs)	59
B.1.2. Préparation des vésicules unilamellaires de grande taille (LUVs)	59
B.1.3. Préparations des vésicules géantes unilamellaires (GUVs)	60
B.2. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	62
B.2.1. Principe	62
B.2.2. Déroulement de l'expérience	64
B.3. Mesure du potentiel zêta (ζ)	64
B.3.1. Modèle de la double couche ionique	65
B.3.2. Paramètres influençant la valeur du potentiel zêta	66
B.3.3. Principe de la mesure du potentiel zêta	67
B.3.4. Déroulement d'une expérience	69
B.4. Microbalance à cristal de quartz (QCM-D)	71
B.4.1. Principe	71
B.4.2. Caractéristiques de l'appareil QCM-D	73
B.4.3. Déroulement d'une expérience	75
B.5. Ellipsométrie	76
B.5.1. Principe	76
B.5.2. Déroulement d'une expérience	78
B.6. La microscopie à force atomique (AFM)	80
B.6.1. Principe	80
B.6.2. Obtention des images	81
B.6.3. Déroulement d'une expérience	82
B.7. Spectroscopie infra-rouge en mode transmission	83
B.8. Spectroscopie infra-rouge en mode réflexions totales atténuées	84
B.9. Voltampérométrie cyclique	87
B.9.1. Principe	87
B.9.2. Variation du potentiel et mesure du courant	89
B.9.3. Interprétation des mesures voltampérométriques	90
B.9.4. Signaux voltampérométriques des systèmes réversibles	90
B.9.5. Déroulement d'une expérience	92
B.10. Microscopie en champ proche (SNOM)	94
B.10.1. Principe	94
B.10.2. Déroulement d'une expérience	95
Références Bibliographiques	97

A. Matériels

Les fournisseurs principaux des produits utilisés dans ce travail sont les suivants :

*Sigma-Aldrich Chimie, St. Quentin Fallavier, France

*VWR International S.A.S., Strasbourg, France, qui fournit les produits Merck et Prolabo.

A.1. Polypeptides et polyélectrolytes

Les polypeptides sont des polymères d'acides aminés. Il existe 20 acides aminés d'origine naturelle. Dans cette étude, nous avons utilisé exclusivement des homopolypeptides chargés négativement (polyanions) ou positivement (polycations).

Les polyélectrolytes sont des polymères dont les unités monomères présentent au moins un groupement ionisable, positif ou négatif. On distingue les polyélectrolytes forts, dont tous les monomères ionisables sont chargés quelque soit la valeur du pH et les polyélectrolytes faibles dont la densité linéaire de charge est fonction du pH.

Lors de notre étude, les solutions de polyélectrolytes et de polypeptides ont été préparées à une concentration de 1 mg.mL^{-1} . Les principales caractéristiques et les structures des monomères des polyélectrolytes utilisés sont données dans le tableau 1.

Nom du composé	Poly(éthylène imine) ramifiée	Poly(L-glutamate de sodium)	Poly(allylamine chlorhydrique)	Poly(D-lysine hydrobromure)
Notation	PEI	PGA	PAH	PDL*
Nature	Polycation	Polyanion	Polycation	Polycation
Formule développée de l'unité monomère				
Fournisseur et référence	Sigma, P-9383	Sigma, P-4886	Aldrich, 28,322-3	Sigma, P-0296 Sigma, P-4408
Masse moléculaire moyenne en poids	25 000 g/mol	17 000 g/mol	65 000 g/mol	2000 g/mol 27 200 g/mol

Tableau 1. Polyélectrolytes utilisés. * de la PLL (Poly(L-lysine) hydrobromure) de masse moléculaire moyenne 574 500 g/mol a également été utilisée (Fournisseur et référence Sigma P-1524).

La raison pour laquelle nous avons utilisé PGA-PAH est justifiée par le fait que son régime de croissance est exponentiel : l'épaisseur d'un tel film croît de manière rapide, même dans le cas d'un faible nombre de couches. Cela offre donc la possibilité d'enfouir des vésicules de plusieurs centaines de nanomètres de diamètre dans un film comportant un faible nombre de couches de polyélectrolytes.

La PDL de faible masse moléculaire moyenne (2000 et 27 000 g.mol⁻¹) a été principalement utilisée afin de rigidifier des liposomes chargés de 200 à 300 nm de diamètre. Le choix d'un polyélectrolyte de faible degré de polymérisation est justifié par le fait que nous voulions éviter l'agrégation des liposomes lors du mélange liposomes-polyélectrolyte. Cette agrégation peut se faire par pontage si les chaînes de polyélectrolytes entrent en contact avec deux vésicules.

A.2. Les lipides et liposomes

Tout au long de ce travail de thèse nous avons préparé différents liposomes :

- des liposomes géants (1 à 10 μm de diamètre). Ils ont été utilisés en tant que microréacteurs en solution (formation au sein des liposomes de phosphates de calcium via une réaction catalysée par une enzyme). Ces liposomes ont été préparés à partir de 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC) de jaune d'œuf.
- des liposomes de plus petite taille que les précédents (200 à 300 nm de diamètre) ont été destinés à être enfouis dans un film multicouche de polyélectrolytes puis à être utilisés en tant que réacteurs immobilisés. Ces vésicules ont été préparées à partir d'un mélange de lipides 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC) de L- α -phosphatidyl-DL-Glycerol (POPG) et de cholestérol. Nous avons décidé d'utiliser le mélange POPG/POPC car ce sont deux lipides dont la longueur des chaînes hydrophobes est identique et dont les températures de transition de phase sont très proches. En effet, la température de transition de phase de POPC et POPG sont respectivement - 20°C et - 18°C. De plus, le POPC étant neutre (à pH 7.4), la présence de POPG confère aux liposomes une densité de charge négative, ce qui lui permet d'être adsorbé sur une surface chargée positivement. Grâce aux charges négatives relative à la présence de POPG dans la membrane lipidique, un polyélectrolyte (dans notre cas la PDL) est capable de s'adsorber sur la surface des liposomes. L'enrobage d'un liposome par une couche de polyélectrolyte permet d'accroître la rigidité sa

membrane lipidique, facilitant ainsi son dépôt sur une surface (cette fois chargée négativement).

Le cholestérol, quant à lui, a été ajouté au mélange car il augmente la rigidité de la vésicule.

Les principales caractéristiques des lipides utilisés ainsi que leur formule semi-développée sont représentées dans le tableau 2.

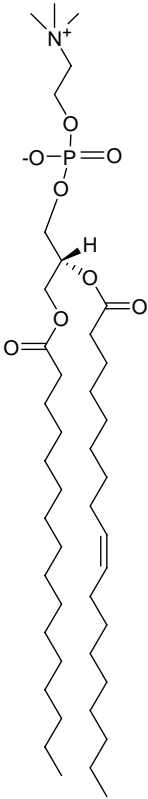
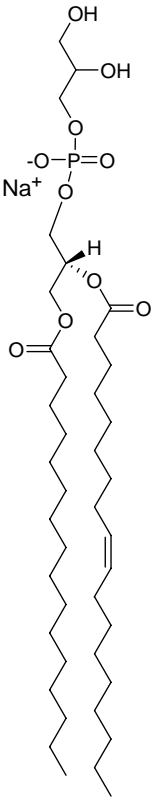
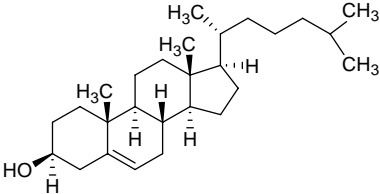
Nom du composé	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine	L- α -phosphatidyl-DL-Glycerol	5-Cholesten-3-ol
Notation	POPC	POPG	Cholestérol
Nature	Phospholipide (neutre à pH 7.4)	Phospholipide (chargé négativement à pH 7.4)	Stérol
Formule semi-développée			
Fournisseur et référence	Sigma, P-3556	Sigma, P-6956	Sigma, C-8667
Masse moléculaire	768 g/mol	766 g/mol	386 g/mol

Tableau 2. Lipides utilisés dans ce travail.

A.3. Solutions de travail

Pour toutes les opérations de nettoyage des surfaces, pour les solutions de travail, ainsi que pour les étapes de fonctionnalisation, nous avons utilisé une eau ultra pure délivrée par un système Milli-Q-plus (Millipore, Bedford, USA). La résistivité de cette eau est de 18.2 M Ω .cm. Nous avons préparé deux types de solutions tampons qui diffèrent simplement par la valeur de leur force ionique :

- un tampon 10 mM Tris, 150 mM NaCl à pH 7.4. Dans la suite de ce chapitre, et pour des soucis de simplicité, ce tampon sera appelé tampon TF (pour tampon à forte concentration en NaCl),
- un tampon 10 mM Tris, 15 mM NaCl à pH 7.4. Dans la suite de ce chapitre, ce tampon sera appelé tf (pour tampon à faible concentration en NaCl).

La solution tampon TF a été utilisée pour la préparation des solutions de polyélectrolytes (PEI, PGA et PAH) ainsi que dans la préparation des liposomes géants. Quant à la solution tampon tf, elle a été utilisée lors de la préparation des liposomes de petite taille ainsi que dans la préparation de la solution de polyélectrolyte (PDL) dont nous nous sommes servis afin de les stabiliser. Dans ce cas, nous avons choisi de travailler avec une solution tampon dont la concentration en NaCl est réduite d'un facteur dix (15 mM en NaCl contre 150 mM pour les polyélectrolytes et pour les liposomes géants) afin d'éviter un trop fort écrantage des forces électrostatiques entre les vésicules de même charge (et donc afin d'éviter leur agrégation).

Les solutions tampons ont été préparées à partir des produits suivants (tableau 3) :

Nom du composé	Chlorure de Sodium	Acide Chlorhydrique à 37%	Tris (hydroxy méthyl) Aminométhane	Hydroxyde de Sodium
Notation ou formule chimique	NaCl	HCl	Tris	NaOH
Fournisseur et référence	Prolabo, 27 810.295	Prolabo, 20 252.290	Merck, 108382	Prolabo, 28 244.295
Masse moléculaire	58.44 g/mol	36.46 g/mol	121.14 g/mol	39.99 g/mol

Tableau 3. Composés utilisés pour la préparation des solutions tampon.

Le Hellmanex II (cat n° : 320.001, Hellma, Müllheim, Allemagne) est un détergent ionique comprenant des molécules amphiphiles basiques. Il a été utilisé lors des opérations de

nettoyage. Avant usage, le Hellmanex est dilué à 2 % en proportion volumique dans l'eau distillée.

A.4. Produits utilisés pour effectuer des réactions au sein des liposomes

Différentes espèces (ions calcium, spermine et phosphatase alcaline) ont été encapsulées dans les liposomes afin de les utiliser en tant que réacteurs. Les solutions contenant les espèces à encapsuler ont été préparées dans la même solution tampon que celle utilisée pour la préparation des liposomes. La réaction visée dans ce travail est la précipitation de phosphates de calcium via une catalyse enzymatique. Dans tous les systèmes étudiés, les ions phosphates ont été fournis de manière "inactive", sous forme de paranitrophényl phosphate. Les caractéristiques de chacune de ces espèces sont décrites dans le tableau 4.

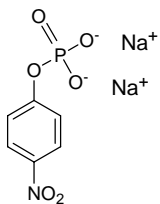
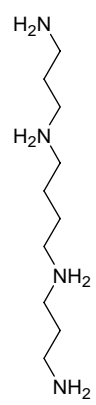
Nom du composé	para-nitrophényl phosphate disodique	Phosphatase Alcaline (issue de la muqueuse de l'intestin de porc)	Tétra chlorhydrate de N,N'-Bis(3-aminopropyl)-1,4-butanediamine (Spermine)	Pronase (issue de <i>Spretomyces griseus</i>)
Notation ou formule chimique	<p>PNP</p> 	AP	<p>Spermine</p> 	Pronase, il s'agit d'un mélange d'enzymes protéolytiques de spécificité différente
Fournisseur et référence	Sigma, N-4645	Sigma, P-4002	Sigma, S-2876	Sigma, P-5147
Masse moléculaire	371.14 g/mol	~90 000 g/mol	348.18 g/mol	Non connue, car mélange de différentes protéines

Tableau 4. Réactifs utilisés pour la réalisation de réactions enzymatiques au sein des vésicules.

A.4.1. Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est une enzyme, c'est-à-dire une protéine qui joue le rôle de catalyseur dans les réactions chimiques survenant chez les êtres vivants. En général, les enzymes accélèrent la vitesse de réaction mais ne modifient pas la position d'équilibre d'une

réaction réversible [1]. Les enzymes ont souvent besoin de cofacteurs non protéiques au sein de leur site actif, c'est le cas pour la phosphatase alcaline (figure 1). Ces cofacteurs peuvent être des ions (Mn^{2+} , K^+ , Zn^{2+} ...), mais également des molécules organiques comprenant ou non un centre métallique (comme la protoporphyrine IX au sein de chacune des quatre sous unités de l'hémoglobine) [2]. Les études des réactions catalysées par des enzymes ont montré qu'une enzyme ne catalyse qu'un seul type de réaction et n'agit que sur un substrat ou une classe de substrat ayant en commun une structure moléculaire bien définie. La phosphatase alcaline est une enzyme qui hydrolyse les phosphomonoesters en libérant du phosphate. La sélectivité de cette enzyme n'est donc pas très élevée. Elle est ainsi nommée, car son efficacité est maximale pour des valeurs du pH comprises entre 8 et 10. Son activité nécessite la présence d'ions Zn^{2+} et d'ions Mg^{2+} .

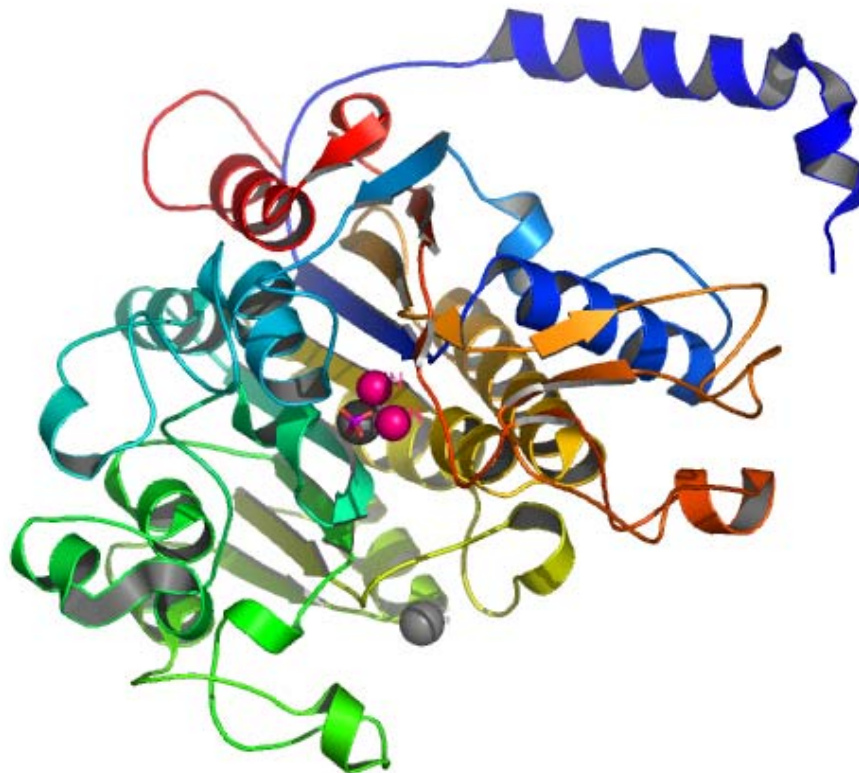


Figure 1. Représentation sous forme de rubans d'une phosphatase alcaline générée par le logiciel Pymol 0.93. Le code PDB (Protein Data Bank) est : 1EW2. Les cofacteurs (ions métalliques) sont représentés par des sphères de couleur. Les sphères roses correspondent aux ions Zn^{2+} et les sphères grises correspondent aux ions Mg^{2+} . Le tétraèdre rose au centre de l'image correspond au phosphate du substrat, logé au niveau du site actif de la protéine.

Afin d'étudier l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline il suffit de la mettre en présence de l'un de ses substrats : le paranitrophényl phosphate (PNP). Ce dernier, est un ester de phosphate incolore, qui en s'hydrolysant libère du paranitrophénol (PN), de couleur jaune, dosable par spectrophotométrie UV à la longueur d'onde de 405-410 nm. La vitesse de réaction peut donc être déterminée par simple mesure de la longueur d'onde : la densité optique de la solution de PN étant proportionnelle à la concentration en PNP.

Afin de dégrader la phosphatase alcaline non encapsulée dans les vésicules géantes, nous avons utilisé de la pronase, qui est composé d'un mélange de protéases.

A.4.2. La spermine

La spermine est une tétraamine présente chez tous les eucaryotes. Elle a pour la première fois été mise en évidence en 1678 par Anthony von Leeuwenhoek qui a observé la présence de phosphates de spermine au microscope. Les valeurs des pKa de la spermine sont 11.50, 10.95, 9.79 et 8.90. Cette molécule possède ainsi un caractère fortement basique, et tous les groupements amino de la spermine sont chargés positivement en milieu aqueux et à pH physiologique. C'est une molécule communément utilisée en biologie moléculaire et en biochimie. En effet, le caractère polycationique de la spermine permet d'isoler l'ADN possédant plus de 100 paires de bases dans des solutions à faible force ionique. [3]. La spermine tend à complexer l'ADN au niveau des phosphates. Cette tétraamine est donc intensivement utilisée dans la cristallisation de l'ADN.

Dans notre étude nous avons utilisé la spermine, pour ses interactions avec les ions phosphate, dans le but de favoriser la nucléation des phosphates de calcium [4], les ions phosphate étant produits par l'hydrolyse catalysée du paranitrophényl phosphate.

A.5. Solvants et autres produits utilisés

Les solvants utilisés pour la solubilisation des lipides sont donnés dans le tableau 5.

Nom du composé	Methanol	Ethanol	Chloroforme
Notation ou formule chimique	CH ₄ O	C ₂ H ₆ O	CCl ₃ H
Fournisseur et référence	Prolabo, 20 856.296	Prolabo, 20 875.235	Prolabo, 22 709.292
Masse moléculaire	32.04 g/mol	46.07 g/mol	119.38 g/mol

Tableau 5. Solvants utilisés pour la solubilisation des lipides.

Les caractéristiques des autres réactifs utilisés dans les expériences avec les vésicules sont décrites dans le tableau 6.

Nom du composé	Acide Ethylènediamine Tétracétique	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl) phenyl-polyethylene glycol	Chlorure de Calcium	Hexacyanoferrate (II) de Potassium Trihydrate
Notation ou formule chimique	EDTA	Triton X100	CaCl ₂	K ₄ Fe(CN) ₆ 3H ₂ O
Fournisseur et référence	Sigma, E-9884	Sigma, T-9284	Sigma, C-4901	Sigma, P-9387
Masse moléculaire	292.24 g/mol	~ 620 g/mol	110.98 g/mol	422.39 g/mol

Tableau 6. Caractéristiques des composés utilisés pour les études d'encapsulation dans les vésicules.

Nom du composé	Carbonate de Sodium	Diméthyl sulfoxyde	Rhodamine Red™-X, succinimidyl ester *5-isomer*
Notation ou formule chimique	Na ₂ CO ₃	C ₂ H ₆ OS	C ₃₇ H ₄₄ N ₄ O ₁₀ S ₂
Fournisseur et référence	Sigma, S-7795	Prolabo, 28 488.294	Molecular Probes, R-6160
Masse moléculaire	105.99 g/mol	73.13 g/mol	768.9 g/mol

Tableau 7. Molécules utilisées pour les marquages des enzymes encapsulées dans les vésicules.

L'acide éthylènediaminetétracétique a été utilisé en excès pour complexer les ions calcium non encapsulés dans les liposomes géants. Cette complexation ainsi que la dégradation par la pronase des molécules d'enzyme non encapsulées sont indispensables, afin de s'assurer que la réaction enzymatique n'a lieu qu'au sein de la cavité aqueuse interne des vésicules.

L'hexacyanoferrate de potassium a été encapsulé dans les vésicules afin de mesurer la vitesse de libération de ce composé lors de l'enfouissement des liposomes dans un film multicouche.

Le détergent non ionique utilisé, le triton X100, permet de solubiliser les vésicules en les transformant en micelles mixtes détergents-phospholipides.

B. Méthodes

Nous avons utilisé différentes méthodes expérimentales pour mener à bien nos objectifs : enfouir des liposomes intacts dans des films multicouches de polyélectrolytes et création de réacteurs immobilisés. Ces méthodes sont les suivantes : préparation des liposomes, diffusion dynamique de la lumière (DLS), potentiel zêta (ζ), microbalance à cristal de quartz (QCM-D), ellipsométrie, microscopie à force atomique (AFM), microscopie en champ proche (SNOM), spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode transmission et en mode réflexion totale atténuée (ATR-FTIR), voltampérométrie cyclique, microscopie électronique à balayage (MEB), microscopie électronique en transmission (MET), microscopie optique, diffraction des électrons, et spectroscopie UV-visible. Nous décrirons ci-dessous les principes de base de la plupart de ces techniques. Les fondements du MEB, du MET de la microscopie optique et de la spectroscopie UV-Visible ne sont pas présentés, étant donné l'utilisation courante de ces techniques.

B.1. Méthodes de fabrication des liposomes

B.1.1. Préparation des vésicules multilamellaires de grande taille (MLVs)

La méthode de préparation la plus simple des liposomes consiste à évaporer le solvant organique dans lequel les lipides ont été dissous [5]. Un film de molécules lipidiques est alors formé sur la surface interne du récipient après l'évaporation du solvant. Ce film est alors mis au contact avec un solvant aqueux afin de l'hydrater. Souvent une agitation est nécessaire afin d'accélérer la mise en suspension des lipides. Dans le milieu aqueux, le film lipidique s'hydrate et les phospholipides s'associent de manière à ne pas exposer leur partie hydrophobe au solvant. Il en résulte la formation de bicouches, qui se referment sur elles mêmes en emprisonnant du solvant. Ces bicouches enferment en général d'autres bicouches, toutes séparées par une couche d'eau. Des vésicules multilamellaires (MLVs) sont ainsi obtenues. La structure de celles-ci ressemble à celle d'un oignon.

B.1.2. Préparation des vésicules unilamellaires de grande taille (LUVs)

Afin de préparer des vésicules unilamellaires de grande taille, la solution de MLVs peut être soumise à des cycles de congélation-décongélation dans l'azote liquide, ce qui fragilise la membrane et permet de construire des liposomes unilamellaires [6]. La filtration au travers de pores calibrés permet alors de contrôler la valeur maximale du diamètre des vésicules unilamellaires obtenues. Cette filtration se fait le plus souvent au travers d'un filtre

monté dans une enceinte résistant à l'application de fortes pressions. Un tel dispositif est appelé "extrudeur". L'organisation des phospholipides au sein des vésicules unilamellaires de grande taille est la même dans chacune des monocouches.

L'encapsulation d'espèces actives au sein des LUVs se fait lors de l'étape d'hydratation des lipides. En effet, la solution contenant les espèces à encapsuler est tout d'abord préparées à l'aide d'une solution tampon qui est ensuite mises en contact avec le film de lipide. Lorsque les liposomes se forment, les espèces contenues dans la solution tampon se retrouvent emprisonnées au sein des vésicules. Il est souvent nécessaire d'éliminer les composés non encapsulés. Pour ce faire, différents moyens existent et dépendent fortement de la taille des molécules à éliminer. Parmi ces techniques nous pouvons citer : la dialyse ou encore la chromatographie par exclusion stérique. Dans notre cas ces deux techniques ont été utilisées.

B.1.3. Préparations des vésicules géantes unilamellaires (GUVs)

Les GUVs sont le plus souvent fabriqués par la méthode d'électroformation qui repose sur la séquence suivante d'événements [7] :

- i) un film de lipides est déposé sur une électrode métallique
- ii) un champ électrique alternatif de faible fréquence (quelques Hz) et de faible amplitude (quelques V) est appliqué lorsque la chambre de travail est remplie avec une solution aqueuse
- iii) la croissance des liposomes est observée par microscopie optique. La fréquence et l'amplitude du champ électrique sont contrôlées afin de guider la formation des vésicules géantes.

Les vésicules unilamellaires géantes ainsi formées ont une taille comprise entre 1 et 10 μm .

Dans notre travail, la méthode utilisée afin de préparer les GUVs est la méthode développée par Moscho et al. [8]. Cette méthode consiste tout d'abord à dissoudre les phospholipides dans du chloroforme puis d'y ajouter du méthanol. Une solution aqueuse est très lentement ajoutée au mélange de solvants organiques de façon à créer une interface solvant organique-solvant aqueux. Les phospholipides vont donc s'organiser au niveau de cette interface : les têtes polaires vont se placer du côté du solvant aqueux et les queues hydrophobes du côté du solvant organique. Après évaporation du solvant organique (par

évaporation rotative), les GUVs sont formés. L'avantage de cette technique repose sur le fait que nous pouvons préparer des liposomes géants unilamellaires en quelques minutes.

La figure 2 décrit la séquence probable des événements qui se produisent lors de la formation des GUVs par cette méthode.

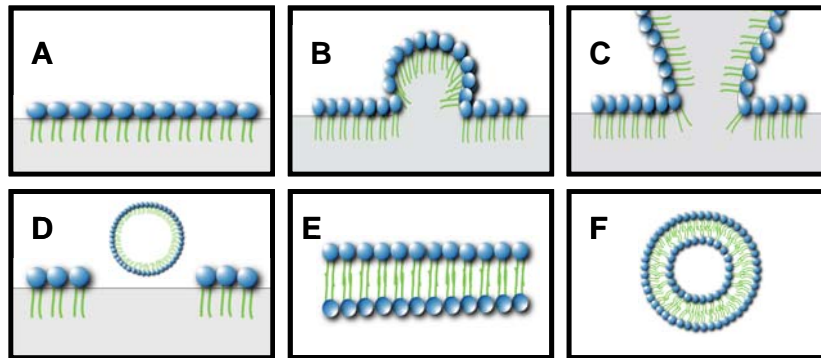


Figure 2. Représentation schématique de la séquence probable des événements qui se produisent à l'échelle moléculaire lors de la formation des liposomes par la méthode de Moscho et al. D'après [8].

- A) formation d'une monocouche de lipides au niveau de l'interface solvant organique-solvant aqueux,
- B) formation de bulles lors de l'évaporation,
- C) rupture des bulles et début de formation de bicouches,
- D) possibilité de formation de "bulles de lipides",
- E) des fragments de bicouches sont en solution aqueuse,
- F) ces fragments se referment pour former des vésicules.

L'encapsulation d'espèces actives se fait très simplement. Il suffit pour cela de préparer une solution tampon contenant les espèces à encapsuler puis de la mettre au contact de la phase organique. Après évaporation du solvant organique, et donc lors de la formation des liposomes, les espèces contenues dans la solution tampon se retrouvent emprisonnées au sein des vésicules. Tout comme pour les LUVs, les espèces non encapsulées doivent être éliminées. Dans notre cas, et étant donné le diamètre important des GUVs, il n'était pas possible de faire ni dialyse ni chromatographie d'exclusion stérique. Aussi, nous avons choisi d'éliminer les espèces non encapsulées de façon chimique (EDTA et Pronase).

B.2. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Nous avons utilisé la diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering) afin de déterminer la distribution de tailles des LUVs que nous voulions adsorber puis enfouir dans un film multicouche de polyélectrolytes. C'est une technique de choix qui nous a permis d'optimiser l'enrobage de nos liposomes par une couche de polyélectrolytes. C'est à l'aide de la DLS que nous avons étudié l'agrégation des liposomes en fonction de la concentration en polyélectrolytes. Nous allons maintenant tenter de décrire cette technique.

B.2.1. Principe

La DLS est une méthode importante pour la caractérisation de la granulométrie de systèmes colloïdaux [9]. Cette technique est fondée sur la mesure du mouvement brownien des particules (mouvement aléatoire des particules provoqué par les impacts des molécules du solvant sur la surface de la particule). La fréquence et l'amplitude de ce mouvement brownien dépendent de la taille de la particule et de la viscosité du solvant : à une viscosité donnée, plus la particule est petite et plus son mouvement brownien présente une fréquence et une amplitude relative importante. De même, plus la valeur de la viscosité du solvant est faible (température plus élevée par exemple), plus ce mouvement brownien est rapide et ample pour une particule de taille donnée. Il est donc important de maîtriser la viscosité et donc la température du milieu. Le déplacement des particules sous l'effet de fluctuations de concentrations est caractérisé par le coefficient de diffusion de translation (D_T) qui, d'après la loi de Stokes-Einstein, est lui-même proportionnel au diamètre hydrodynamique de la particule :

$$d_h = \frac{k_b T}{3\pi\eta_0 D_T} \quad (1)$$

où k_b est la constante de Boltzmann, T la température, η_0 la viscosité du solvant, D_T le coefficient de diffusion et d_h le diamètre hydrodynamique de la particule considérée.

Le montage optique est constitué d'une source laser monochromatique (laser HeNe, longueur d'onde $\lambda=632.8$ nm), d'une cellule de mesure et d'un photomultiplicateur (choisi pour la mesure d'intensités diffusées très faibles générées par des particules de très petites tailles). Le laser est équipé d'un filtre spatial et d'une optique de focalisation du faisceau au milieu de la cellule. En général, le photomultiplicateur (PM) est placé sur un goniomètre afin

d'obtenir un angle d'incidence variable. Cependant, dans nos expériences, nous travaillons à angle fixe, le détecteur étant immobilisé dans une direction faisant 90° avec la direction de l'onde incidente.

Le signal mesuré par le photomultiplicateur correspond aux fluctuations de la lumière diffusée dues au mouvement brownien des particules. Ce signal est ensuite traité par un corrélateur numérique afin d'obtenir la fonction d'autocorrélation du signal. Cette fonction représente la probabilité de retrouver une particule à un instant $t+\tau$ au même point de l'espace où elle se trouvait à l'instant t : plus une particule est petite et plus cette probabilité est faible, plus une particule possède un grand diamètre et plus cette probabilité est forte. Cette fonction d'autocorrélation (G) est une exponentielle décroissante du temps dans le cas d'une distribution monomodale de particules. Sa forme est beaucoup plus complexe dans le cas d'une distribution de particules de tailles différentes. On ajuste alors différents modèles mathématiques à la fonction d'autocorrélation issue de la mesure. Le résultat de ce traitement mathématique permet de donner une bonne approximation de la répartition granulométrique de l'échantillon si celui-ci n'est pas exagérément polydisperse. Cependant l'analyse devient très difficile, voire impossible si l'échantillon contient une distribution de très grandes (plusieurs micromètres) et de très petites particules (quelques nanomètres) colloïdales. En effet, les grandes particules, même présentes en faible concentration, contribuent de façon majoritaire à l'intensité diffusée et peuvent de ce fait occulter la contribution des petites particules, pourtant majoritaires, à l'intensité totale diffusée. Pour la plupart de nos expériences, nous avons adopté le mode d'analyse monomodal qui consiste à décrire la décroissance de la fonction d'autocorrélation comme s'il n'existait qu'une sorte de particules sphériques et à inclure le faible écart à la décroissance exponentielle parfaite dans un coefficient de polydispersité (analyse des cumulants) :

$$\log(G) = a + b\tau + c\tau^2 + d\tau^3 + \dots \quad (2)$$

où b représente la taille moyenne des particules, et $2c/b^2$ la variance de la distribution ou polydispersité.

La méthode des cumulants [10] offre des résultats intéressants pour une distribution monomodale étroite, définie par le diamètre moyen des particules et leur polydispersité.

B.2.2. Déroulement de l'expérience

Dans ce travail, nous avons utilisé un dispositif commercial le Zetasizer 3000 HS (Malvern Instrument, Ltd, UK) qui permet de mesurer la taille des vésicules mais également leur potentiel zêta. Ce dernier mode de mesure sera décrit ultérieurement.

Après la préparation des vésicules, les solutions sont prélevées et introduites dans une cuve jetable en polystyrène dont les quatre faces sont polies. La solution est introduite de manière à remplir suffisamment la cuve (environ 2 mL) afin que le faisceau laser monochromatique traverse le cœur de la solution. Si l'intensité du signal récoltée par le détecteur atteint le seuil de saturation, il est nécessaire de travailler à dilution plus importante. Cela arrive fréquemment lorsque la concentration en lipides atteint les quelques milligrammes par millilitre (ce qui est le cas de nos expériences). Pour cela, la solution de liposomes est diluée à l'aide de la solution tampon. De plus, afin de s'affranchir des problèmes de diffusion parasites, dus à la présence de bulles d'air et à la présence de poussières dans la solution à analyser, il est nécessaire de travailler avec des suspensions extrêmement propres et de filtrer les tampons utilisés pour obtenir la bonne concentration. En effet, d'après la théorie de Rayleigh et dans la limite des tailles de particules petites devant la longueur d'onde de la lumière, l'intensité diffusée est proportionnelle au diamètre de la particule élevé à la puissance 6 (une particule de 100 nm diffuse un million de fois plus qu'une particule de 10 nm). Après avoir filtré le tampon utilisé, la cuve est enfin insérée dans l'appareil et les mesures peuvent être menées. La distribution de taille obtenue résulte de la moyenne de dix mesures sur un échantillon donné.

B.3. Mesure du potentiel zêta (ζ)

Les expériences de stabilisation, d'adsorption et d'enfouissement de liposomes sur une surface chargée ont nécessité l'utilisation de liposomes chargés (dont la membrane lipidique contient un lipide chargé) et stabilisés (ou non) par l'adsorption d'une couche de polyélectrolyte sur le feuillet externe de la bicouche lipidique. L'adsorption d'un polyélectrolyte sur une surface chargée (possédant un potentiel zêta différent de zéro) entraîne une inversion du signe du potentiel zêta. Nous avons donc mesuré le potentiel zêta des vésicules avant et après l'adsorption d'une monocouche de polyélectrolyte. [11]. Les mesures de DLS couplées aux mesures du potentiel zêta nous ont permis de contrôler l'efficacité de l'adsorption d'un polyélectrolyte sur des vésicules chargées. Avant de décrire la technique du potentiel zêta, il est indispensable de définir la notion de "double couche ionique".

B.3.1. Modèle de la double couche ionique

Lorsqu'une particule chargée est mise au contact d'une solution contenant des ions, une solution d'électrolytes, il se produit au niveau de l'interface particule-solution une répartition des charges qui conduit à un équilibre thermodynamique. Pour décrire précisément cette interface, un modèle simplifié qui rend bien compte des observations expérimentales est celui de la double couche qui prend en compte l'influence de la force ionique sur le potentiel de surface des particules. La couche de liquide qui entoure la particule est donc modélisée sous la forme de deux couches. La première couche correspond à la région située dans les premières couches moléculaires de solvant au delà de la surface et comporte des ions fortement liés à cette dernière (c'est la couche de Stern). La seconde couche, externe à la première, est plus diffuse et présente une distribution ionique déterminée par les forces électriques mais aussi par les mouvements thermiques aléatoires (c'est la couche de Gouy-Chapman). Lorsque la particule bouge dans le milieu (sous l'influence du mouvement Brownien ou sous l'influence d'un flux hydrodynamique), on considère que la structure de ces couches reste stable. C'est au niveau du plan glissant, au niveau duquel les molécules de solvant sont mobiles, que le potentiel zêta est mesuré.

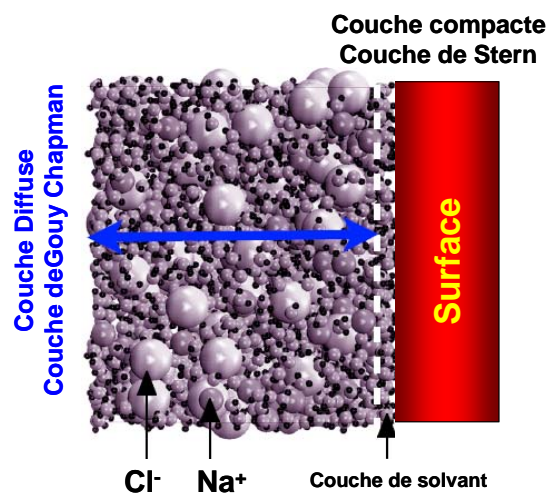


Figure 3. Représentation schématique du modèle de la double couche électrique à une interface solide-liquide.

Dans la limite des faibles potentiels de surface, le potentiel électrostatique décroît de manière exponentielle lorsque l'on s'éloigne de la surface de la particule, jusqu'à parfois atteindre une valeur nulle au cœur de la solution. La connaissance du seul potentiel de surface n'est pas suffisante pour caractériser le comportement d'une particule en suspension. En effet, certains phénomènes tels que la floculation ne peuvent être expliqués sans considérer la particule avec

son cortège ionique. Le potentiel zêta a la particularité de varier en fonction de l'environnement de la particule. Il influe directement sur la stabilité des émulsions et des suspensions mais également sur la nature des interactions entre les particules et l'électrolyte. Une suspension présentant un potentiel zêta inférieur à ± 20 mV est souvent instable, alors qu'une valeur absolue supérieure à 30 mV lui confère une bonne stabilité. Plus généralement, il est admis que plus le potentiel zêta est important (en valeur absolue), plus on se rapproche des conditions de stabilité des émulsions ou des dispersions, et inversement, plus le potentiel zêta est faible, plus on tend vers l'agrégation des particules. L'agrégation des particules a lieu lorsque les forces d'attraction de van der Waals entre les particules deviennent supérieures aux forces de répulsion électrostatiques [12].

B.3.2. Paramètres influençant la valeur du potentiel zêta

L'une des applications principales du potentiel zêta concerne l'étude des interactions particules-électrolytes. Les ions peuvent être classés en deux classes selon leur comportement par rapport à la surface. La première classe est celle des ions qui interagissent de manière purement électrostatique avec la surface. La mesure du potentiel zêta d'une particule en fonction de la concentration en électrolytes non spécifiques a tendance à diminuer de manière continue (jusqu'à des valeurs tendant vers zéro lorsque la concentration en électrolytes non spécifiques augmente).

La seconde classe d'ions correspond aux ions adsorbés de manière préférentielle et sélective à la surface. Cette situation se rencontre lors de la complexation de ces ions avec des groupements chargés de surface. Dans ce cas, l'augmentation de la concentration de ces ions entraîne une diminution du potentiel zêta jusqu'à neutralisation de la charge moyenne de surface (point iso-électrique), puis une inversion de signe du potentiel zêta aura lieu (ce qui n'est pas observé pour des électrolytes non spécifiques). C'est précisément ce type de situation que nous cherchons à atteindre lors de l'adsorption des polyélectrolytes à la surface de nos liposomes chargés. Dans le cas des polyélectrolytes, chaque monomère chargé interagit assez faiblement avec les charges de surface, l'énergie d'interaction dépend fortement du taux de sel, mais le caractère spécifique et irréversible de l'adsorption est dû à l'accumulation du nombre de sites d'interaction (car les charges du polyélectrolyte sont corrélées).

B.3.3. Principe de la mesure du potentiel zêta.

La mesure du potentiel zêta des particules colloïdales est basée sur la mesure de leur mobilité électrophorétique. En effet, quand un champ électrique est appliqué à une solution d'électrolyte, les particules chargées en suspension dans cet électrolyte sont attirées vers l'électrode de charge opposée. La force de frottement visqueux subie par les particules tend à s'opposer à ce mouvement. Quand l'équilibre entre ces deux forces de sens opposé est atteint, les particules se déplacent avec une vitesse limite. La valeur de cette vitesse dépend de l'intensité du champ électrique, de la constante diélectrique du milieu, de sa viscosité et du potentiel zêta de la particule. On définit la mobilité électrophorétique d'une particule par le rapport entre sa vitesse limite V et la valeur de l'intensité du champ électrique appliqué :

$$U_e = \frac{V}{E} \quad (3)$$

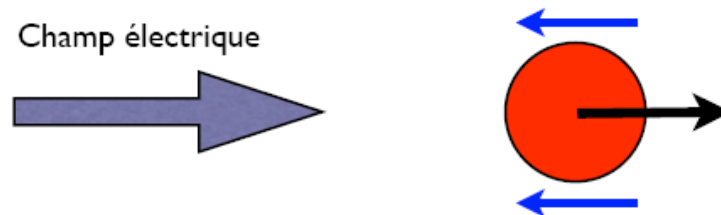


Figure 4. Représentation schématique du phénomène de mobilité électrophorétique. Quand un champ électrique est appliqué à une solution d'électrolyte, les particules chargées en suspension dans cet électrolyte sont attirées vers l'électrode de charge opposée. Les flèches bleues correspondent à la force de frottement visqueux subie par la particule et la flèche noire correspond à la vitesse de la particule en mouvement sous l'effet du champ électrique.

La valeur du potentiel zêta est calculée à partir de celle de la mobilité électrophorétique par application de la loi de Henry :

$$U_e = \frac{\varepsilon\zeta}{6\pi\eta} f(\kappa a) \quad (4)$$

avec ε la constante diélectrique du milieu, η sa viscosité, ζ le potentiel zêta et U_e la mobilité électrophorétique. Le facteur κa est égal au produit de l'inverse de la longueur de Debye-Hückel κ^{-1} et du rayon a de la particule. L'épaisseur de la zone de solution influencée par les charges fixes de la surface dépend fortement de la concentration et de la charge des ions de l'électrolyte. Plus la charge et la concentration sont élevées, plus la couche diffuse est

comprimée. La valeur de la longueur de Debye-Hückel (κ^{-1}) est donnée par la relation suivante :

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\varepsilon}{\sum_i C_i^\infty e^2 z_i}} \quad (5)$$

où C_i^∞ représente la concentration de l'ion i dans le cœur de la solution, c'est à dire à grande distance de l'interface, z_i la charge de l'ion i , et ε la constante diélectrique du milieu.

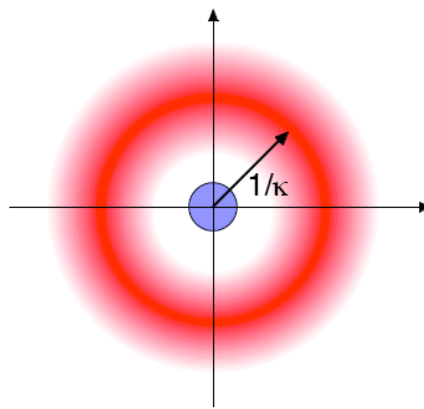


Figure 5. Variation d'épaisseur de la couche de Stern en fonction de la concentration en électrolytes. Les valeurs numériques de la longueur de Debye-Hückel pour un électrolyte symétrique de type 1 : 1 (comme NaCl) à quatre concentrations en sel : 0.1 mM, 1 mM, 100 mM et 1 M sont respectivement 304 Å, 96.20 Å, 9.6 Å, 3.04 Å.

Afin d'éviter l'électrolyse de la solution, le champ appliqué doit être alternatif. Lors de l'application du champ électrique, la particule se déplace vers l'électrode de charge opposée. Dans la demi période suivante, lorsque le champ s'oppose, la particule change le sens de son déplacement. La particule effectue donc un mouvement de va et vient alternatif avec une certaine fréquence ν_p . Cette fréquence est reliée à la vitesse de la particule et à la fréquence du champ alternatif appliqué. La valeur de ν_p est mesurée par effet Doppler. En effet, deux faisceaux laser monochromatiques éclairent la particule et la vitesse de la particule est mesurée dans le volume d'intersection de ces deux faisceaux. Le croisement des faisceaux laser donne naissance à une figure d'interférence. En modifiant le trajet optique d'un des deux faisceaux laser, à l'aide d'un miroir monté sur un oscillateur piézoélectrique haute fréquence, la figure d'interférence générée peut être déplacée, de manière parfaitement contrôlée, autorisant ainsi la mesure des faibles mobilités. Les particules à mobilité nulle ou très faible

sont caractérisées lors de la détection par une fréquence identique à celle de l'oscillateur piézoélectrique, et présentent par conséquent une variation de fréquence nulle. Les particules en mouvement dans la grille interférentielle vont diffuser la lumière à une fréquence ν_p en fonction de leur vitesse. La lumière diffusée est captée par un photomultiplicateur qui génère une impulsion pour chaque photon détecté. Le signal obtenu est traité par un corrélateur numérique qui collecte et fait la moyenne du nombre de photons détectés par unité de temps. Ce traitement permet d'établir la fonction d'autocorrélation comme pour les expériences de diffusion de la lumière. Le traitement de cette fonction d'autocorrélation nous permet alors d'établir l'intensité relative diffusée en fonction de ν_p . La variation de fréquence $\Delta\phi = \nu_p - \nu_0$ observée permet de remonter à la vitesse grâce à la relation :

$$V = S\Delta\phi \quad (6)$$

Dans cette relation, V est la vitesse de la particule, S l'espacement des franges dans la région de croisement des faisceaux laser et $\Delta\phi$ la variation de fréquence (Hz).

La valeur de l'interfrange est donnée par $S = \frac{\lambda}{2} \sin \frac{\theta}{2}$ avec λ longueur d'onde du faisceau laser, et θ l'angle de diffusion.

Par cette expérience on obtient donc la distribution de l'intensité diffusée en fonction du potentiel zêta des particules.

B.3.4. Déroulement d'une expérience

Avant toute mesure du potentiel zêta il est indispensable de calibrer l'appareil. Cette précaution est indispensable car les parois de la cellule en quartz sont chargées négativement. De ce fait la surface de la cellule accumule des contre-ions. Lors de l'application du champ électrique, ces contre-ions se mettent en mouvement ce qui entraîne un déplacement du fluide : c'est le phénomène de mobilité électroosmotique. Ce déplacement du fluide va également entraîner un déplacement des particules à étudier. Ainsi, la mobilité totale de la particule est égale à la somme de la mobilité électroosmotique et de la mobilité électrophorétique. Dans le dispositif expérimental utilisé, la contribution de la mobilité électroosmotique est éliminée parce que la mesure est effectuée dans un plan de la cellule (de géométrie rectangulaire) sur lequel la vitesse moyenne du fluide est nulle. Ce plan, appelé plan stationnaire, existe parce que la cellule de mesure est un système fermé : la solution de particules y est injectée par l'ouverture d'une électrovanne. Cette dernière est en position fermée lorsque l'injection manuelle est arrêtée. Toutes les mesures ultérieures sont effectuées

à cellule fermée. Lors de l'adsorption d'un polycation sur les parois de la cellule, la nature des contre ions accumulés à la surface est modifiée et le signe de la mobilité électroosmotique est inversé. Cela peut fausser les résultats. Le but de la calibration est d'injecter dans la cellule des particules colloïdales chargées négativement et de mobilité connue. Cette calibration s'effectue grâce à l'utilisation d'une solution de latex sulfatées (référence AZ55 fournie par Malvern) de densité de charge et donc de potentiel zêta connues. Cette solution nous donne une valeur de potentiel zêta négatif égal à $-(55 \text{ mV} \pm 5) \text{ mV}$ (en solution aqueuse et en présence de chlorure de sodium à 1 mM). Si cette valeur du potentiel zêta n'est pas obtenue, à l'incertitude expérimentale près, la cellule de mesure est démontée de son bâti et nettoyée. Le nettoyage s'effectue en immergeant la cellule dans une solution aqueuse de Hellmanex à 2 % (en volume) et à une température proche de 60°C. A la sortie du bain de détergent, les parois internes de la cellule sont frottées au goupillon, la cellule est ensuite lavée à l'éthanol, à l'eau, plongée dans une solution d'acide chlorhydrique à 0.1 M, puis lavée à l'eau distillée avant de la remettre en place dans le bâti du dispositif de mesure. Une fois la calibration effectuée, la mesure peut être entreprise avec la solution de liposomes. Avant chaque injection de liposomes, la cellule de mesure est intensivement rincée à l'eau Milli-Q. Il est indispensable d'éviter toute présence de bulles d'air dans la cellule car elles risqueraient de fausser les mesures, puisque la lumière est diffusée à l'interface gaz-solution aqueuse. Aussi, toutes les solutions sont légèrement sonifiées (au bain à ultrasons pendant quelques secondes et à faible puissance) avant chaque mesure. L'amplitude de la différence de potentiel appliquée aux bornes de la cellule a été de 200 mV pour toutes les mesures effectuées avec des vésicules lipidiques.

B.4. Microbalance à cristal de quartz (QCM-D)

Afin de suivre en temps réel la construction du film multicouches de polyélectrolytes ainsi que le comportement des liposomes (rupture ou non) lors de leur adsorption sur un film PGA-PAH, nous avons utilisé la technique de la microbalance à cristal de quartz.

B.4.1. Principe

La microbalance à cristal de quartz (QCM-D) est utilisée depuis de nombreuses années afin d'étudier le dépôt de films métalliques sur des supports solides par des méthodes telles que le dépôt physique en phase vapeur. Son principe se base sur l'application de différences de potentiel alternatives à un cristal de quartz. Le quartz est un matériau piézo-électrique qui se déforme en réponse à l'application du champ électrique. Réciproquement, la déformation du cristal entraîne l'apparition d'une polarisation électrique. La figure 6 montre un exemple de cristal de quartz comportant sur chacune de ces faces une mince couche d'or qui servent d'électrodes. L'application d'une différence de potentiel induit un mouvement de cisaillement créant ainsi une déformation uniquement dans un plan horizontal. Si la face inférieure de la lame est fixée sur un support, la face supérieure subira un mouvement de translation lors de l'application du champ électrique externe. Si le champ appliqué est de nature sinusoïdale, le cristal de quartz pourra entrer en résonance lorsque la fréquence du signal appliquée est proche de la fréquence propre du dispositif mécanique étudié. La fréquence de résonance des cristaux de quartz se situe dans le domaine du mégahertz. Le cristal de quartz se comporte donc comme un oscillateur harmonique. Cependant en présence d'un fluide comme l'air mais surtout d'un fluide fortement visqueux comme l'eau, l'amplitude des oscillations du cristal va finir par s'amortir en fonction du temps. Le régime des oscillations du cristal sera pseudo-périodique, ou critique selon l'importance des forces de frottement subies par le cristal.

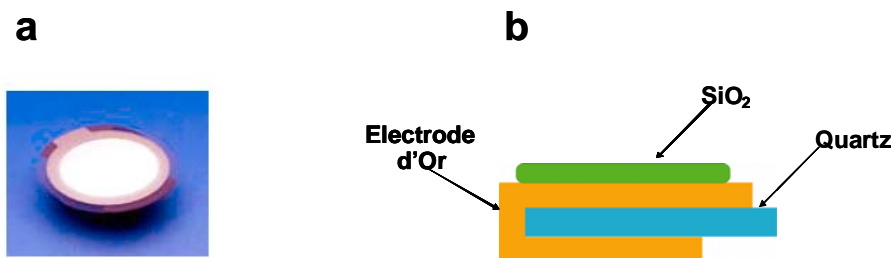


Figure 6. Cristal de quartz, pris entre deux électrodes, utilisé en microbalance à cristal de quartz. (a) photo prise du côté où le film de polyélectrolytes est déposé (b) schéma de principe.

Du point de vue physique, cet oscillateur harmonique est caractérisé par sa pulsation de résonance :

$$\omega_1 = \sqrt{\frac{k}{M}} \quad (7)$$

où M représente la masse de l'oscillateur (le cristal de quartz) et k sa constante de raideur. Lors du dépôt d'un matériau de masse m_0 sur la lame de quartz, la masse totale de l'oscillateur devient égale à $M+m_0$. Ceci implique donc une nouvelle pulsation de résonance qui sera alors

$$\omega_2 = \sqrt{\frac{k}{M+m_0}} = \omega_1 \left(1 - \frac{m_0}{2M}\right) \quad (8)$$

avec $m_0 \ll M$.

Ceci engendre alors un changement de la fréquence de résonance donné par :

$$m_0 = -C\Delta f \quad (9)$$

où C représente une constante dont la valeur dépend de l'épaisseur et du module de cisaillement du matériau support. Dans notre cas, le constructeur donne une valeur de C égale à $17.7 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{Hz}^{-1}$.

Si le cristal est soumis à un champ électrique alternatif de manière transitoire (typiquement pendant quelques μs) et s'il adopte un régime d'oscillations pseudo périodique, la mesure de la valeur de la pseudo période nous donnera le changement de la fréquence de résonance de la lame lors d'un processus de dépôt à sa surface. La vitesse d'amortissement des oscillations du régime pseudo périodique apporte également des informations sur les propriétés des films, notamment sur leur viscosité et leur module de cisaillement moyennant une modélisation du film. [13,14]. La figure 7 représente un exemple de modèle mécanique d'un film mince, constitué par l'association en parallèle d'un ressort et d'un piston. Le ressort représente la contribution élastique du film et le piston sa contribution visqueuse.

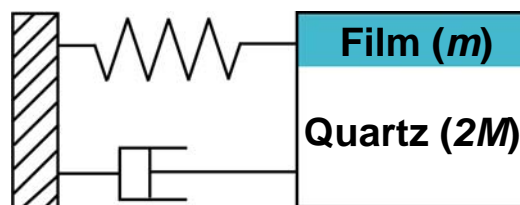


Figure 7. Modèle de l'oscillateur harmonique appliqué au cristal. La différence de potentiel appliquée est équivalente à une force mécanique appliquée à l'oscillateur. L'élasticité et la viscosité du quartz sont représentées par un ressort et un piston respectivement.

Il faut noter également que le cristal de quartz peut aussi être mis en résonance non seulement au voisinage de sa fréquence propre de résonance, f_1 (appelée fréquence fondamentale), mais encore à toutes ses harmoniques impaires ou paires ($f_i = if_1$ où i est un entier positif pair ou impair). A chacune de ces harmoniques i correspondra également un changement de fréquence de résonance dû au dépôt de matière et m_0 sera relié à Δf_i par la relation de Sauerbrey [15] :

$$m_0 = -\frac{C\Delta f_i}{i} \quad (10)$$

Cette relation peut s'appliquer aussi bien à un dépôt réalisé sous vide qu'à un dépôt réalisé en phase liquide, moyennant certaines conditions. Pour que la relation de Sauerbrey soit valable le film doit être mince, rigide, et ne doit pas glisser sur le substrat lors de sa mise en oscillations.

B.4.2. Caractéristiques de l'appareil QCM-D

L'appareil que nous utilisons (QCM-D 301, Qsense AB, Göteborg, Suède) permet de mesurer les valeurs de Δf_i pour quatre fréquences qui correspondent aux quatre premières harmoniques impaires ($i = 1, 3, 5$ et 7). La fréquence fondamentale de résonance des cristaux que nous utilisons est voisine de 5 MHz. Lorsque le dépôt adsorbé sur le cristal est au contact d'un fluide, la masse m_0 représente la masse totale mise en mouvement lors des oscillations. Cette masse inclura non seulement la matière constituant le film, mais également le fluide contenu dans le film.

L'appareil comporte une chambre de mesure de volume interne égal à 100 μL . Le cristal de quartz constitue la partie inférieure de cette chambre qui est rendue étanche à l'aide d'un joint torique. Avant d'entrer dans la chambre de mesure, la solution traverse une chambre thermostatée (appelée *Tloop*) par un système Pelletier et une boucle de rétroaction interfacée à un ordinateur. Un générateur de fréquence variable envoie un signal alternatif de courte durée (quelques μs) vers le cristal de quartz dans un domaine de fréquences proche de la fréquence de résonance du cristal. On suit alors les oscillations libres, en l'absence de signal appliqué, du cristal (Figure 8). La courbe obtenue est alors ajustée avec un modèle du type :

$$A(t) = A_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \sin[\omega t + \phi] \quad (11)$$

où A , A_0 , τ , $\omega = 2\pi/T$ et ϕ sont respectivement l'amplitude instantanée, l'amplitude initiale, le temps caractéristique d'amortissement, la pulsation des oscillations et le déphasage entre l'onde excitatrice et le signal pseudopériodique mesuré. On mesurera le même type de courbes pour les premières harmoniques impaires du signal obtenu au voisinage de la fréquence fondamentale. Le but de ces mesures, réalisées à plusieurs fréquences, est de disposer d'un nombre suffisant de données expérimentales afin de pouvoir caractériser le film déposé en terme d'épaisseur, de masse volumique du film déposé, de viscosité et de module de cisaillement.

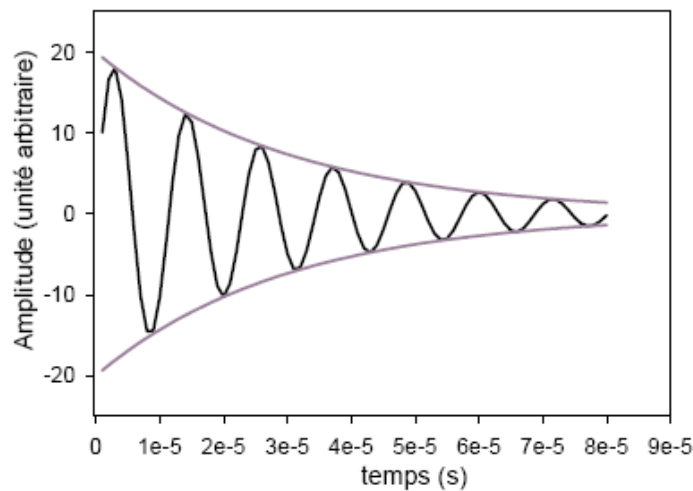


Figure 8. Simulation d'un signal mesuré avec la microbalance à cristal de quartz : les points correspondent à une fonction du type $A(t) = A_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \sin[\omega t + \phi]$, avec $f_0 = 5 \text{ MHz}$ et $\tau = 30 \mu\text{s}$. Les courbes en trait plein correspondent à l'enveloppe exponentielle du signal pseudopériodique.

La constante d'amortissement mesurée, τ , est liée à la dissipation D du système, c'est à dire au rapport entre l'énergie dissipée au cours de chaque cycle d'oscillation et l'énergie emmagasinée lors de la sollicitation électrique du cristal. L'ensemble des valeurs mesurées de D et de ω , pour les quatre harmoniques, permettent de calculer l'épaisseur hydrodynamique, le module et la viscosité sous cisaillement des films déposés. Des modèles viscoélastiques sont nécessaires afin d'extraire de tels renseignements. Cependant, ces modèles n'ont pas encore été complètement validés. Avec notre appareillage, les fréquences de résonance du cristal sont mesurées avec une précision relative de 10^{-6} . La sensibilité en masse est de 5 ng/cm^2 dans l'eau et de 1 ng/cm^2 dans l'air à la fréquence de résonance fondamentale proche de 5 MHz.

B.4.3. Déroulement d'une expérience

Les films ont été déposés sur un cristal de quartz recouvert d'une couche de silice. Les cristaux ont été nettoyés directement dans la cellule de mesure avec de l'Hellmanex à 2 % en volume pendant 30 min, rincés avec de l'eau Milli-Q (Milli-Q Plus, Millipore, $\rho = 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$), mis en contact avec une solution d'acide chlorhydrique 0.1 M pendant 10 min et finalement abondamment rincés avec une solution tampon TF.

Nous allons maintenant tenter de décrire le déroulement de la construction d'un film de polyélectrolytes dans lequel une couche de liposomes a été enfouie. Nous donnerons l'exemple de la construction du film comportant des liposomes non rigidifiés par une couche de polyélectrolyte et celui du film comportant des liposomes rigidifiés. Afin de simplifier la lecture, ces liposomes seront nommés respectivement ULUVs (pour unmodified LUVs) et MLUVs (pour modified LUVs).

Les films ont été construits *in situ* dans la cellule de mesure. Une solution de PEI a été injectée dans la cellule de mesure au contact du cristal de quartz pendant 10 min. La solution tampon TF, la solution de PGA, la solution tampon TF, la solution de PAH et la solution tampon TF sont successivement mises en contact du cristal de QCM-D pendant 10 min. Ceci permet la formation d'une paire de couche PGAPAH. Un temps d'adsorption de 10 min entre chaque solution est suffisant pour atteindre une valeur constante ("steady state") de dissipation et de fréquence [16]. Les liposomes chargés ULUVs ont été adsorbés pendant 40 min sur un film PEI-(PGA-PAH)₂ alors que les MLUVs chargés positivement ont été adsorbés sur un film PEI-(PGA-PAH)₂-PGA pendant 30 min. Le temps d'adsorption des liposomes correspond au temps nécessaire pour atteindre une valeur constante du changement de fréquence et de dissipation. Avant la déposition des liposomes, le film a été mis au contact d'une solution tampon tf (correspondant à la solution tampon dans laquelle les liposomes ont été préparés). Après l'adsorption des liposomes, le cristal est rincé avec la solution tampon tf puis avec celle la solution tampon TF (correspondant à la solution dans laquelle les solutions de polyélectrolytes ont été préparée), avant de poursuivre la construction du film. Dans le cas des ULUVs (respectivement MLUVs), nous avons recouvert les liposomes avec un film PAH-(PGA-PAH)₂ (respectivement (PGA-PAH)₂).

Toutes les expériences de QCM-D ont été effectuées suivant ce protocole de construction de film. Le déroulement de ces expériences est décrit de manière plus détaillée dans l'article 2 du chapitre 3.

B.5. Ellipsométrie

Afin de déterminer l'épaisseur de la couche de liposomes enfouie dans le film multicouche de polyélectrolytes nous avons eu recours à une méthode optique : l'ellipsométrie. La détermination de l'épaisseur optique de la couche de liposomes déposée dans le film de polyélectrolytes a pu être comparée à la taille des liposomes obtenue par diffusion de la lumière en solution aqueuse. Dans le cas où l'épaisseur optique de la couche de liposomes contenue dans le film de polyélectrolytes est voisine de celle obtenue par diffusion de la lumière, cela signifie que les liposomes gardent probablement leur forme et donc ne se rompent pas lors de l'adsorption et lors de l'enfouissement ultérieur dans le film multicouche.

B.5.1. Principe

L'ellipsométrie est une méthode optique basée sur le changement de polarisation de la lumière lors d'une réflexion sur une surface plane [17,18]. En général l'onde incidente est une onde lumineuse polarisée rectilignement. Après réflexion, la polarisation devient elliptique. Considérons une onde électromagnétique plane polarisée (figure 9), de longueur d'onde λ , atteignant une interface séparant deux milieux d'indices n_1 et n_2 sous un angle d'incidence Φ_1 . Le vecteur champ électrique associé à cette onde peut être décomposé en une composante parallèle (indice p) et une composante normale (indice s) au plan d'incidence. Au niveau de l'interface entre les deux milieux 1 et 2, une onde électromagnétique plane est réfléchiée et une onde de même nature est transmise. Les relations de continuité des champs électriques et magnétiques à l'interface permettent d'obtenir les coefficients de réflexion r en amplitude (relations de Fresnel) :

$$r_p = \frac{n_2 \cos \Phi_1 - n_1 \cos \Phi_2}{n_2 \cos \Phi_1 + n_1 \cos \Phi_2} \quad (12)$$

$$r_s = \frac{n_1 \cos \Phi_1 - n_2 \cos \Phi_2}{n_1 \cos \Phi_1 + n_2 \cos \Phi_2} \quad (13)$$

Les coefficients de réflexion ne dépendent que de Φ_1 , n_1 et n_2 puisque Φ_2 est lié Φ_1 par la relation de Snell-Descartes :

$$n_1 \sin \Phi_1 = n_2 \sin \Phi_2 \quad (14)$$

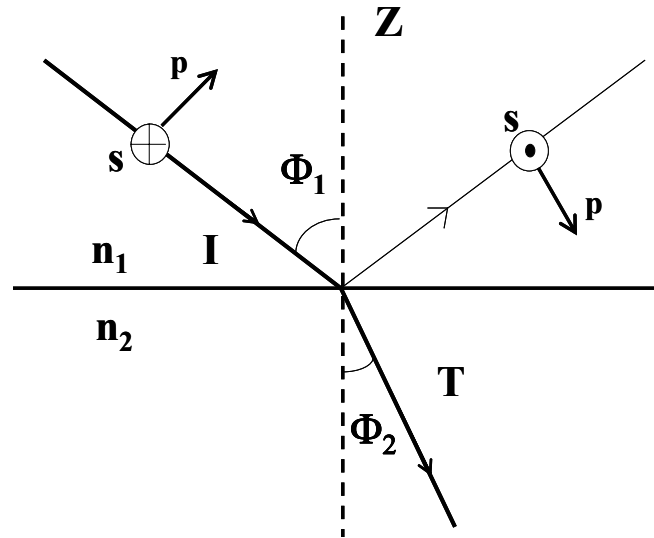


Figure 9. Représentation schématique selon Fresnel d'une onde électromagnétique plane polarisée, de longueur d'onde λ , arrivant sous un angle d'incidence Φ_1 sur une interface séparant deux milieux d'indices n_1 et n_2 . Son vecteur champ électrique est décomposé en une composante parallèle (indice p) et une composante normale (indice s) au plan d'incidence.

Une expérience d'ellipsométrie consiste à caractériser la polarisation de l'onde elliptique de l'onde réfléchi en mesurant le rapport des réflectivités des ondes p et s .

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \left| \frac{r_p}{r_s} \right| \exp(i\Delta) = \tan \Psi \exp(i\Delta) \quad (15)$$

Ψ et Δ sont appelés angles ellipsométriques, $\tan \Psi$ est le module du rapport des coefficients de réflexion et Δ est la différence de phase entre l'onde p et l'onde s introduite par la réflexion.

Considérons maintenant la situation d'une couche homogène et isotrope adsorbée d'indice n_c et d'épaisseur optique h_c , intercalée entre les deux milieux semi-infinis d'indice n_1 et n_2 . La couche intercalée introduit un facteur de déphasage $\exp(-ik_c h_c)$ avec :

$$k_c = \frac{2\pi n_c}{\lambda} \cos \Phi_c = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{n_c^2 - n_1^2 \sin^2 \Phi_1} \quad (16)$$

On a alors pour chaque composante parallèle (p) et normale (s) du champ électrique :

$$r = \frac{r_{1c} + r_{c2} \exp(-2ik_c h_c)}{1 + r_{1c} r_{c2} \exp(-2ik_c h_c)} \quad (17)$$

Où les coefficients r_{1c} et r_{c2} sont respectivement les coefficients de réflexion à l'interface milieu 1-couche adsorbée et couche adsorbée-milieu 2.

Ψ et Δ sont donc des fonctions complexes de Φ_1 , n_1 , n_c , n_2 et h_c . Dans notre cas, le milieu 1 est constitué par l'air (les mesures sont effectuées à sec après rinçage du film à l'eau et séchage sous flux d'azote) dont on connaît n_1 et le milieu 2 est le substrat de silicium dont n_2 est également connu. A angle d'incidence fixe, les deux seules inconnues sont l'épaisseur de la couche h_c et son indice n_c . Connaissant Ψ et Δ , il est à priori possible de déterminer à la fois h_c et n_c . Lorsque les couches sont très peu épaisses par rapport à la longueur d'onde (typiquement pour $h_c/\lambda < 0.1$), un développement au première ordre en h_c/λ (approximation de Drude) montre que seules les variations Δ sont significatives (premier ordre en h_c/λ), celles de Ψ (deuxième ordre en h_c/λ) étant très faibles. Dans le cas du dépôt de nos films et du fait de la présence de liposomes, nous avons atteint des épaisseurs optiques de l'ordre de plusieurs centaines de nm. Dans ce cas l'approximation de Drude n'est plus valable. Les variations de Ψ ne sont plus négligeables. Dans ce cas, il est alors d'usage de supposer l'indice n_c connu, ce qui est réaliste si l'on connaît la nature des molécules adsorbées. La mesure de Δ et Ψ permet alors de calculer h_c .

B.5.2. Déroulement d'une expérience

Dans ce travail de thèse nous avons utilisé un ellipsomètre PLASMOS SD 2300 serie. Le laser utilisé est un laser HeNe monochromatique de longueur d'onde $\lambda = 632.8$ nm. Les expériences d'ellipsométrie ont été effectuées sur des surfaces de silicium (Prolabo, Strasbourg, France). Ces surfaces ont préalablement été nettoyées avec une solution $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (dans un rapport volumique 1 :1) puis plongées dans une solution d'acide sulfurique à 10 mM. Après ce traitement les lames de silicium ont été intensivement rincées avec de l'eau Milli-Q puis séchées sous un flux d'azote. Les films de polyélectrolytes ont été construits directement sur la surface de la lame de silicium (un exemple de construction est donné plus bas). Nous avons travaillé avec un angle d'incidence constant et égal à 45° . La technique est très sensible à la masse optique $h_c \cdot n_c$ où n_c correspond à l'indice de réfraction du film et h_c à son épaisseur optique. Nous avons imposé à n_c une valeur de 1.465 nous permettant ainsi de calculer l'épaisseur du film de polyélectrolytes. Cette valeur de l'indice de réfraction est raisonnable au vu d'expériences effectuées avec des films multicouches de

polyélectrolytes en environnement aqueux par la technique de la spectroscopie optique des modes propres couplés dans un guide d'onde optique [16].

L'ellipsométrie nous permet, de mesurer l'épaisseur des films de polyélectrolytes mais en l'absence de solution aqueuse. Cela signifie que nous obtenons l'épaisseur du film non gonflé : en effet, lors de cycles d'hydratation-déshydratation la plupart des films multicouches de polyélectrolytes subissent des phases de gonflement dégonflement réversibles [19]. Si lors de l'enfouissement des vésicules et après séchage du film, nous obtenons un incrément d'épaisseur par rapport au même nombre de paires de couches de polyélectrolytes mais en l'absence de vésicules qui est proche du diamètre des vésicules, alors nous avons une forte présomption que les vésicules sont enfouies de manière intacte dans le film multicouche.

Nous allons maintenant tenter de donner l'exemple de la construction d'un film de polyélectrolytes (déposé sur une lame de silicium par la méthode LBL) dans lequel une couche de MLUVs (liposomes modifiés par une couche de PDL) a été enfouie.

Les films ont été construits sur une surface de silicium de la manière suivante :

Le temps d'adsorption des polyélectrolytes sur la surface est de 10 min. Les étapes d'adsorption des polyélectrolytes et de rinçage à la solution tampon TF ont été effectuées par trempages successifs de la lame dans un récipient contenant les solutions appropriées. Avant l'adsorption des MLUVs, un film de PEI-(PGA-PAH)₂-PGA a été construit (comme pour les expériences de QCM-D) et l'augmentation d'épaisseur optique due au dépôt de chaque couche de polyélectrolyte a été mesuré. Afin d'adsorber des MLUVs sur une lame de silicium déjà recouverte par un film PEI-(PGA-PAH)₂-PGA selon ce protocole, un grand nombre de précautions ont été nécessaires. En effet, une solution de liposomes contient au niveau de l'interface eau-air une monocouche de lipides. Afin d'éviter le dépôt d'une monocouche lipidique (par transfert selon la méthode de Langmuir-Blodgett) sur le film de polyélectrolytes lors du trempage de la lame de silicium dans la solution de liposomes, nous avons cherché à éviter une exposition directe de la multicouche avec l'interface eau-air. Pour cela, la solution de liposomes a été injectée en large excès sur la lame de silicium préalablement immergée dans la solution tampon tf. Après un temps d'adsorption de 30 min, les lipides présents au niveau de l'interface eau-air ont été éliminés en ajoutant à la solution de liposomes un large excès de la même solution tampon. La même méthode a été employée pour l'adsorption des couches de PGA et PAH additionnelles ainsi que pour les phases de rinçage. L'échantillon a

alors été retiré du récipient, lorsque la première paire de couches PGA-PAH a été adsorbée au-dessus de la couche correspondant aux liposomes, puis l'épaisseur optique a de nouveau été mesurée. Une seconde paire de couches PGAPAH additionnelle a pu, à ce moment là, être adsorbée par la méthode de LBL de trempage habituelle.

Toutes les méthodes de construction de films, qui n'ont pas pu être faites *in situ*, dans lesquels nous voulions immobiliser des liposomes ont été effectuées sur ce modèle. Cependant l'article 3 du chapitre 3 présente une autre méthode de construction. Cette méthode n'est plus basée sur la technique LBL mais sur la méthode de construction de films par "spray". Ce point est décrit de manière détaillée dans l'article 3 du chapitre 3. Néanmoins, nous donnerons un exemple de construction par "spray" dans la partie B.9.5. de ce chapitre 2.

B.6. La microscopie à force atomique (AFM)

Les techniques telles que la microbalance à cristal de quartz et l'ellipsométrie nous permettent de voir si les vésicules restent intactes après adsorption puis enfouissement dans un film de polyélectrolytes. Notre critère est que l'épaisseur hydrodynamique et optique obtenues respectivement par QCM-D et par ellipsométrie sont proches de la valeur du diamètre hydrodynamique des vésicules. Cependant, ces informations sont moyennées sur la surface. Ces données ne peuvent en aucun cas apporter des informations locales, à l'échelle de taille d'une vésicule individuelle. Nous avons utilisé la microscopie à force atomique afin d'obtenir cette information. Cette technique permet de visualiser la topologie de surface et donc de voir si les vésicules gardent leur intégrité de forme et si il n'y a pas de domaines de coalescence entre des vésicules voisines.

B.6.1. Principe

La microscopie à force atomique (atomic force microscopy AFM) fait partie des techniques de microscopie à sonde locale. Elle dérive du microscope à effet tunnel mis au point au début des années 1980 par Binnig et Rohmer [20]. Dans son usage le plus répandu, l'AFM permet d'obtenir une image d'une surface à partir de la mesure de la force d'interaction entre celle-ci et une pointe très fine (de quelques dizaines de nanomètre de rayon de courbure à son extrémité). La force d'interaction entre la pointe et une région localisée de la surface, typiquement une surface de quelques angströms de côté, va fournir le contraste de l'image en ce point. La topographie de la surface, typiquement sur quelques μm^2 , sera

obtenue en balayant la pointe pas à pas le long des lignes de cette surface. Mais on peut également utiliser l'AFM pour quantifier les forces d'interaction entre une surface et la pointe en fonction de la distance entre les deux.

L'élément de base d'un AFM est une pointe placée au bout d'un levier (appelé également ressort ou *cantilever*) de raideur k connue. C'est grâce à cette pointe que l'on va pouvoir sonder la surface de l'échantillon. La force F s'exerçant sur la pointe, du fait de son interaction avec la surface, est calculée en multipliant sa déflexion Δz par la constante de raideur du cantilever. La déflexion est mesurée à l'aide d'un faisceau laser incident sur la partie supérieure et réfléchissante du cantilever. Le faisceau laser est réfléchi vers une photodiode à quatre quadrants. Ainsi, toute déflexion du levier induit une déviation de la position du faisceau réfléchi qui est détecté par la photodiode. La force F est ensuite simplement obtenue avec la relation $F=k\Delta z$ pourvu que la valeur de k soit connue. Il existe plusieurs méthodes permettant d'accéder à la valeur de k . L'échantillon étudié est placé sur une cale piézoélectrique permettant de le déplacer dans les trois directions x , y et z . Les directions x et y servent à déplacer latéralement l'échantillon par rapport à la pointe et donc de réaliser point par point "l'image de force" de la surface. La direction z permet de rapprocher ou d'éloigner l'échantillon de la pointe.

B.6.2. Obtention des images

Il existe deux modes principaux d'obtention des images avec un microscope à force atomique : le mode contact et le mode "tapping".

Les leviers utilisés pour faire les images en mode contact sont le plus souvent constitués de nitrure de silicium (Si_3N_4) ; leur face supérieure est recouverte d'un film d'or afin de les rendre réfléchissants. Les constantes de raideur varient en général de 0.01 à 0.60 N/m, selon les ressorts. Le plus souvent les chips d'AFM comportent plusieurs leviers de raideur différente ce qui permet à l'expérimentateur d'utiliser le levier le plus approprié aux propriétés de la surface qu'il souhaite imager. Un système d'asservissement commande le déplacement vertical du cristal piézoélectrique afin de maintenir la déflexion du ressort (et donc la force appliquée) constante. Ainsi, une image de topographie de la surface est obtenue. Une autre méthode, consiste à balayer la surface à hauteur constante, tout en mesurant la déflexion du ressort. Mais cette méthode risque de casser la pointe ou de dégrader l'échantillon, surtout si la surface présente une rugosité importante et s'il se produit une collision entre la pointe et cette irrégularité à la surface. L'inconvénient majeur du mode

contact réside dans le risque de dégrader certains échantillons fragiles, comme les couches de polymères ou encore les films comportant des macromolécules biologiques. Pour imager ces surfaces, on préfère utiliser le mode “tapping”.

Dans ce mode d’acquisition de l’image, le cantilever est mis en oscillation à une fréquence proche de sa fréquence de résonance (entre 280 et 500 kHz, suivant le ressort utilisé). Il se met alors à osciller et la pointe entre en contact avec le matériau de façon intermittente à la fréquence de l’oscillation. Ce mode d’acquisition a donc pour avantage de réduire le risque de dégradation de l’échantillon à imager. L’interaction entre la pointe et l’échantillon a pour effet de modifier l’amplitude des oscillations du ressort. C’est cette amplitude qui est asservie par la boucle de rétroaction, ce qui permet d’obtenir une image topographique de la surface. Les ressorts utilisés en mode “tapping” sont en nitrure de silicium et recouverts d’une fine couche d’aluminium. Leur raideur varie de 20 à 100 N/m, et le rayon de courbure à l’extrémité de la pointe est environ égal à 10 nm. Notons que quelque soit le mode d’acquisition, la résolution en x et en y est limitée par la taille de l’extrémité de la pointe, alors que la résolution en z dépend de la précision du contrôle du déplacement du cristal piézoélectrique qui est de l’ordre de 0.1 nm. C’est pour cette raison que l’on voit apparaître de nouvelles pointes dont l’extrémité est définie à l’échelle atomique : on peut citer les pointes dont l’extrémité est constitué d’un nanotube de carbone. Dans ce travail, dont l’un des buts est d’imager la topographie de vésicules de diamètre proche de quelques centaines de nm, nous avons utilisé des pointes traditionnelles.

B.6.3. Déroulement d’une expérience

L’appareil utilisé est un AFM, Nanoscope IV, de la société Digital Instruments. Les expériences d’AFM ont été effectuées sur des surfaces de verre, de silicium, ainsi que sur des cristaux de microbalance à cristal de quartz qui ont été collés sur un disque de nickel à l’aide de ruban adhésif double face. Ce disque aimanté adhère alors à l’extrémité du tube piezoélectrique. Avant chaque expérience, les surfaces ont été intensivement rincées à l’eau Milli-Q afin d’éliminer les cristaux de NaCl résiduels provenant de la solution tampon Tris-NaCl puis nous avons séché la surface à l’aide d’un flux d’azote.

Les images ont été prises à l’air à l’aide d’un cantilever de nitrure de silicium (Park Scientific). A priori nous nous trouvons donc dans des conditions très défavorables puisque le film est exposé à l’interface entre le film hydraté et l’air. Si dans ces conditions, la

topographie du film est différente de celle du film PGA-PAH comportant un nombre identique de paires de couches de polyélectrolytes (mais en l'absence de vésicules) et si l'on trouve des objets ressemblant à des vésicules intactes, nous avons un faisceau de présomptions supplémentaire quant à l'enfouissement des vésicules sous forme intacte. Cette dernière remarque n'est bien sûr valable que lorsque le nombre de paires de couches déposées au-dessus des vésicules n'est pas trop élevé. Dans le cas contraire, les vésicules, quelque soit leur état, ne seront plus apparentes puisque le film multicouche va progressivement remplir tous les vides entre les vésicules déposées.

B.7. Spectroscopie infra-rouge en mode transmission

La caractérisation spectroscopique des cristaux formés dans les vésicules géantes a été effectuée par spectroscopie infra-rouge en mode transmission. Le faisceau de la source infra-rouge traverse un film constitué de KBr et contenant les particules à étudier.

La loi de Beer-Lambert s'applique ici :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon c l \quad (18)$$

où A représente l'absorbance à une fréquence donnée ν , c (en mol.L⁻¹) la concentration du produit étudié, l (en cm) l'épaisseur de la pastille et ε le coefficient d'extinction moléculaire de la substance étudiée. I_0 est l'intensité du faisceau incident et I l'intensité du faisceau transmis.

Afin de caractériser les particules inorganiques obtenues après la réaction entre la phosphatase alcaline, la spermine, le calcium encapsulés dans les liposomes géants et le paranitrophényl phosphate fourni initialement dans le compartiment aqueux extérieur des vésicules, nous avons utilisé un spectrophotomètre IR Bomen, Hartmann & Braun. Après réaction et formation des particules inorganiques dans les liposomes géants, la solution a été filtrée (filtres millipores, 0.2 μm de diamètre de pore) puis rincée à l'eau Milli-Q, afin d'éliminer le NaCl présent dans la solution tampon. Les particules récupérées dans le filtre ont ensuite été séchées (70 ° pendant 2 jours). Après séchage, les particules ont été mélangées à du bromure de potassium anhydre afin d'en faire des pastilles qui ont été analysées par spectroscopie IR. Les spectres infra-rouges des particules inorganiques obtenues ont été comparés à des spectres de références de cristaux de phosphates de calcium tels que les spectres de l'hydroxyapatite (HAP), du phosphate octacalcique (OCP) et de la brushite (DCPD).

B.8. Spectroscopie infra rouge en mode réflexions totales atténuées

La croissance cristalline des phosphates de calcium au sein des vésicules enfouies dans un film de polyélectrolytes a été étudiée par spectroscopie infra-rouge en mode réflexions totales atténuées (Attenuated Total Reflection, ATR). Dans notre étude, nous utilisons un cristal en sélénure de zinc (ZnSe) de forme trapézoïdale (figure 10).

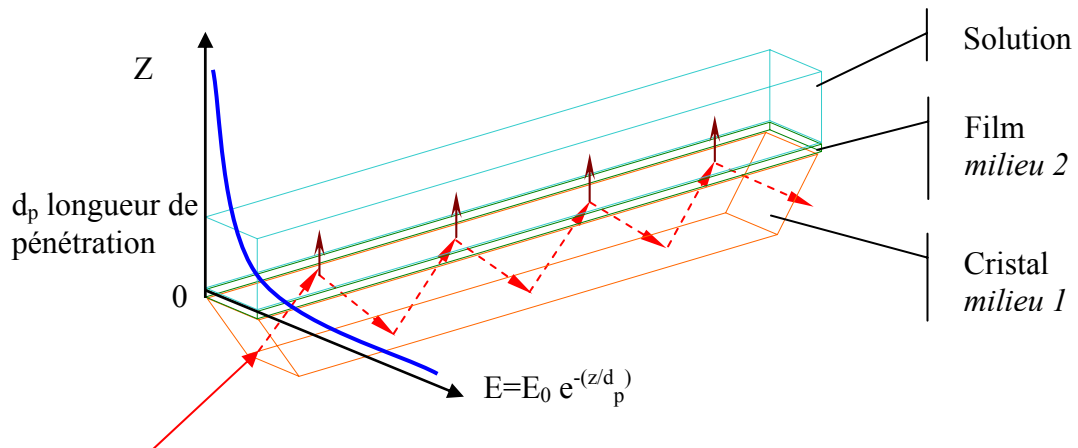


Figure 10. Faisceau infrarouge traversant un cristal trapézoïdal d'ATR. Le faisceau entre sous incidence normale par rapport à l'une des arêtes du cristal (l'arête du trapèze fait un angle $\alpha = 45^\circ$ avec la base du cristal) et atteint l'interface entre le milieu 1 et le milieu 2. Le faisceau crée une onde évanescente dans le milieu 2 au-dessus du cristal d'ATR pourvu que la condition de réflexion totale soit satisfaite. Le faisceau est ainsi réfléchi plusieurs fois avant de ressortir par l'autre face du prisme. L'intensité du faisceau sortant est alors mesurée par un détecteur de type MCT (mercury cadmium telluride) refroidi à la température de l'azote liquide. La courbe bleue représente l'évolution de l'intensité du champ électrique de l'onde évanescente par rapport à la distance à l'interface entre les milieux 1 et 2.

Grâce à un montage optique constitué de plusieurs miroirs, le faisceau infrarouge (provenant de la lame semi-réfléchissante) est dirigé vers l'une des faces du cristal de ZnSe. Ce faisceau incident arrive au niveau de l'interface cristal d'ATR-milieu 1 et le film déposé au-dessus du cristal (milieu 2). Dans le cas où l'angle du faisceau incident α est supérieur à l'angle critique α_c , alors il y a réflexion totale du faisceau incident au sein du cristal. L'angle α_c est défini par la relation :

$$\alpha_c = \sin^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (19)$$

avec n_1 l'indice de réfraction du cristal d'ATR (milieu 1), et n_2 l'indice de réfraction du milieu 2. Cette relation est une conséquence directe de l'équation de Snell Descartes.

Le cristal de ZnSe (Eurolabo, Paris, France) que nous utilisons a les dimensions suivantes : $72 \times 10 \times 6 \text{ mm}^3$ avec un angle à la base égal à 45° . En choisissant l'épaisseur et la longueur du cristal, nous pouvons contrôler le nombre de réflexions totales que le faisceau subit, avant qu'il n'émerge de l'autre côté du cristal. Dans notre cas le nombre de réflexions est égal à 13. Mais seules les réflexions se produisant du côté de la surface en contact direct avec le film déposé contribuent à la mesure. A chaque réflexion, une onde évanescente d'intensité $E(z)$ est créée dans le milieu 2. Son intensité décroît exponentiellement avec la distance z mesurée par rapport à la surface du cristal suivant la relation :

$$E(z) = E_0 e^{-z/d_p} \quad (20)$$

Dans cette relation d_p représente la profondeur de pénétration de l'onde incidente dans le milieu 2 et E_0 l'intensité au niveau de la surface du cristal ($z = 0$). La longueur de pénétration correspond à la distance à laquelle le champ électrique n'est plus égal qu'à $0.37 E_0$. La technique n'est plus sensible à une adsorption supplémentaire de matériel pour un film dont l'épaisseur excède plusieurs fois la valeur de d_p . La longueur de pénétration de l'onde évanescente peut être calculée grâce à la relation suivante :

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}} \quad (21)$$

où λ et θ sont respectivement la longueur d'onde et l'angle d'incidence de la lumière incidente, n_1 et n_2 étant les indices de réfraction (fonction de λ) des milieux 1 et 2

La cinétique de formation des cristaux de phosphates de calcium formés dans les liposomes enfouis dans un film de polyélectrolytes a été suivie par ATR-FTIR (Equinox 55 FTIR spectrometer (Brucker, Germany)). Nous avons utilisé une cellule en mode réflexion totale atténuée avec le détecteur MCT refroidi à l'azote liquide. La cellule se compose d'une chambre thermostatée, composée de deux parties en inox, d'un cristal de ZnSe et d'un joint qui permet d'avoir un volume de $110 \mu\text{L}$ dans la cellule. Les tuyaux en Tygon© du montage, le joint, ainsi que la chambre sont nettoyés avec du Hellmanex puis rincés à l'eau. Le cristal de ZnSe est lavé avec du Hellmanex, du méthanol et ensuite rincé à l'eau Milli-Q.

Le montage de la cellule s'effectue en insérant d'abord le joint dans la chambre puis le cristal de ZnSe. La deuxième partie de la chambre est ensuite emboîtée et fixée par 4 vis. La cellule

est mise en place dans le spectroscope. Ensuite, il suffit d'installer les tuyaux à l'entrée et à la sortie de la chambre de mesure.

Tentons maintenant de décrire le déroulement de la construction d'un film de polyélectrolyte contenant des réacteurs immobilisés (ici des liposomes de 200-300 nm stabilisés par une couche de PDL et contenant des ions calcium, de la spermine et de la phosphatase alcaline).

Les films multicouches contenant des vésicules ont été construits *in situ* dans la cellule de mesure par adsorption successive sur un cristal de ZnSe [16]. Les solutions de polyélectrolytes ont été injectées sous flux en circuit fermé avec un débit de 0.25 mL/min. A la fin de chaque étape d'adsorption, la cellule a été vidée et rincée par la solution tampon TF. Ceci correspond à une durée de rinçage d'environ 10 min. La multicouche a été construite en alternant l'adsorption du polyanion et du polycation. Une fois que le film PEI-(PGA-PAH)₂-PGA a été construit, et après rinçage de la surface avec du tampon tf, les liposomes stabilisés par la PDL (et contenant des ions Ca²⁺, de la phosphatase alcaline et de la spermine) ont été mis en contact du film pendant une durée de 30 min. La surface a de nouveau été rincée avec du tampon tf puis le film est "recouvert" par une architecture (PGA-PAH)₂. Un spectre issu de l'accumulation de 512 interférogrammes a été acquis pour ce film. Ce spectre constitue la référence pour la mesure ultérieure de la cinétique de nucléation et de croissance des phosphates de calcium. Après la construction du film, une solution de paranitrophényl phosphate a été mise en contact du film. Un spectre issu de l'accumulation de 512 interférogrammes a alors été acquis périodiquement à intervalle de 10 min. pendant une durée de 24 h. Chaque spectre obtenu a ensuite été soustrait à la référence. La cinétique de croissance des phosphates de calcium a alors été suivie en fonction du temps dans la plage spectrale correspondant aux différentes vibrations caractéristiques des groupements phosphate, entre 800 et 1200 cm⁻¹. Notons que les phosphates de calcium sont également caractérisés par des vibrations caractéristiques entre 500 et 800 cm⁻¹, mais nous n'avons pas accès à ces vibrations en raison de l'absence de transparence du cristal de séléniure de zinc à des nombres d'onde inférieur à 700 cm⁻¹ environ.

Comme précédemment (dans les expérience en mode KBr), les spectres infrarouges obtenues ont été comparés à des spectres de références de cristaux de phosphates de calcium tels que les spectres de l'hydroxyapatite (HAP), l'octacalcium phosphate (OCP) et de la brushite (DCPD).

B.9. Voltampérométrie cyclique

L'adsorption et l'enfouissement des liposomes dans un film PGA-PAH peuvent engendrer des déformations au niveau de la bicouche lipidique, formant ainsi des pores transitoires qui rendent la membrane lipidique perméable. Si des solutés encapsulés sont contenus dans ces vésicules ils vont être libérés de façon non contrôlée et non reproductible. Afin d'étudier la perméabilité de l'ensemble de l'édifice liposomes-film multicouche vis à vis des solutés encapsulés dans les vésicules, nous avons encapsulé des ions électroactifs ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$). Ces liposomes ont ensuite été enfouis dans un film PGA-PAH. La technique permettant de mesurer une éventuelle libération des molécules électroactives a été la voltampérométrie cyclique. Nous avons choisi cette méthode de caractérisation, plutôt que la méthode traditionnelle consistant à encapsuler des molécules fluorescentes, car nous avons déjà caractérisé la perméabilité des films multicouches de $\text{PEI}-(\text{PGA-PAH})_n$ par voltampérométrie cyclique. Dans cette étude, les films multicouches se terminant soit par une couche de polyanion soit de polycation ont été mis en contact d'une solution d'ions ferrocyanure à 1 mM. Il a été montré que le film se remplit avec les espèces électroactives du film de manière lente et progressive (avec un temps caractéristique de l'ordre d'une heure). De plus, il a été démontré que le ferrocyanure reste emprisonné dans le film. Les films de type PGA-PAH sont donc des pièges à ions ferrocyanure. Ce fait est probablement lié à l'existence d'un potentiel de Donnan positif au sein du film. La concentration en ferrocyanure à l'état stationnaire et au voisinage immédiat de l'électrode est environ 500 fois plus importante qu'en solution [21]. Ainsi nous espérons que le ferrocyanure libéré à partir du compartiment interne des vésicules enfouis dans un film multicouche soit détecté au niveau de l'électrode sur laquelle ce film a été construit

Nous allons maintenant décrire brièvement les constituants et le principe d'une expérience de voltampérométrie cyclique.

B.9.1. Principe

La voltampérométrie cyclique est une technique d'électroanalyse basée sur la mesure du courant électrique résultant de la réduction ou de l'oxydation des composés présents en solution sous l'effet d'une variation contrôlée et périodique de la différence de potentiel entre deux électrodes [22,23]. Elle permet d'identifier la nature des composés ayant des propriétés oxydo réductrices et de mesurer leur concentration. Cette technique permet enfin d'étudier des mécanismes réactionnels au voisinage d'interfaces solide-liquide.

Une expérience de voltampérométrie cyclique nécessite :

*Un ensemble de trois électrodes immergées dans la solution à analyser. Ces trois électrodes sont :

- i) une électrode de travail,
- ii) une électrode de référence,
- iii) une électrode auxiliaire (encore appelée contre-électrode).

*Un circuit électronique, permettant de modifier le potentiel et de mesurer l'intensité du courant résultant.

En général on choisit une électrode de mesure et un couple solvant-électrolyte support de telle manière à éviter tout phénomène d'oxydation ou de réduction autre que celui dû à l'espèce à étudier. Le soluté étudié est par définition l'espèce minoritaire, et le courant généré par son oxydation ou sa réduction pourrait donc être masqué par les courants dus aux espèces majoritaires si les réactions d'oxydoréduction avaient lieu avec une vitesse significative dans la même gamme de potentiels.

L'électrode de référence est le deuxième composant clé de toute cellule voltampérométrique. Cette électrode possède un potentiel constant quelque soit la valeur du courant qui la traverse, ce qui permet d'imposer une différence de potentiel définie entre cette électrode et l'électrode de travail. Il est indispensable de mentionner la nature de l'électrode de référence utilisée pour toute expérience de voltampérométrie cyclique. Les électrodes de référence les plus utilisées, et leur potentiel par rapport à l'électrode standard à hydrogène ($E = 0$ V à 1 M. en HCl et à pression partielle de 1 atm en dihydrogène), sont :

*L'électrode au calomel saturée (notée ECS) : $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}_{\text{sat}}$, $E_{\text{ECS}} = + 241$ mV

*L'électrode en argent /chlorure d'argent saturée avec du chlorure de potassium : $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$, $E_{\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}} = + 199$ mV.

L'électrode auxiliaire possède une résistance interne plus faible que celle de l'électrode de travail et assure donc le passage de la plus grande part du courant d'oxydation ou de réduction dans le circuit de mesure. Elle est généralement en platine ou en carbone et possède une large surface par rapport à l'électrode de travail. De ce fait le courant qui traverse l'électrode de travail et la chute ohmique qui lui correspond sont réduits au minimum. La différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence est donc connue avec une meilleure précision.

Le but de l'expérience de voltampérométrie cyclique est d'étudier les processus redox subits par le soluté au contact de l'électrode. Le courant mesuré est une mesure de la vitesse globale de réaction. Cette vitesse est limitée par l'étape la plus lente de l'ensemble du processus. Celui-ci comporte le transport du soluté de la solution vers l'interface, le transfert d'électrons du métal vers le soluté, et le départ du soluté du voisinage immédiat de la surface de l'électrode vers le cœur de la solution.

B.9.2. Variation du potentiel et mesure du courant

En voltampérométrie cyclique, la différence de potentiel appliquée entre l'électrode de travail et l'électrode de référence est variée en fonction du temps et le courant i est mesuré en fonction de ce potentiel. La variation de potentiel E imposée entre l'électrode de travail et l'électrode de référence peut être linéaire (LSV : linear sweep voltammetry), à impulsion différentielle (DPV), ou encore de type carré (SWV)). Chacune de ces variations donne lieu à des techniques possédant des caractéristiques différentes. Dans notre cas, le potentiel est un signal triangulaire entre deux valeurs limites de la différence de potentiel. La pente de chaque portion rectiligne du triangle définit la vitesse du balayage. La vitesse du balayage aller et retour sont identiques dans le cadre de nos expériences. Dans tous les cas, les courbes $i = f(E)$ obtenues sont appelées des voltampérogrammes.

Le courant total i correspond principalement à la somme de deux courants distincts : le courant faradaïque, i_f , et le courant capacitif, i_c .

$$i = i_f + i_c \quad (22)$$

Le courant faradaïque i_f résulte des réactions d'oxydo-réduction des solutés considérés à l'interface électrode-solution. D'après ce qui a été expliqué au paragraphe précédent, la valeur de ce courant est influencée par les vitesses de différents processus, en particulier :

- *La vitesse du transfert de masse de l'espèce électroactive du sein de la solution vers l'électrode et la vitesse du transfert de l'espèce produite par la réaction électrochimique vers le cœur de la solution.
- *La vitesse de transfert des électrons à l'interface électrode-solution vers le soluté.
- *La vitesse des réactions chimiques qui précèdent ou qui suivent le transfert d'électrons.

En voltampérométrie cyclique, il est important de considérer les vitesses relatives de ces différents processus par rapport à la vitesse à laquelle le système est perturbé

expérimentalement, c'est à dire par rapport à la vitesse de balayage $E = f(t)$. Ainsi le courant i est fonction du temps t par l'intermédiaire de la relation qui existe entre le potentiel E et t .

Le courant capacitif, quant à lui, est dû à la charge et à la décharge du condensateur représenté par l'interface entre la couche de surface de l'électrode et la solution adjacente. La valeur de ce courant dépend de l'aire de la surface de l'électrode, de la vitesse du changement du potentiel en fonction du temps, et de la composition du milieu mais pas de la concentration du soluté étudié.

Par convention, le courant d'oxydation est compté positivement tandis que le courant de réduction est compté négativement.

B.9.3. Interprétation des mesures voltampérométriques

Pour des systèmes simples, par exemple une solution contenant un composé Ox qui est réduit en Red, deux lois fondamentales permettent de comprendre et de quantifier les relations $i = f(E)$ observées durant une expérience de voltampérométrie cyclique :

- *La thermodynamique des réactions de transfert de charge

- *La théorie de la diffusion des espèces en réponse à un gradient de concentration.

Fréquemment, d'autres processus doivent être pris en considération, en particulier la cinétique des réactions chimiques qui précèdent ou suivent le transfert de charge.

Ceci est illustré ci-dessous par la discussion de l'interprétation des voltampérogrammes obtenus pour un système $Ox + ne^- \rightarrow Red$ réversible dans des conditions cinétiques où la diffusion du soluté est l'étape limitante, et pour la caractérisation d'un ion métallique M^{n+} formant un complexe ML en solution et réductible en métal M^0 .

B.9.4. Signaux voltampérométriques des systèmes réversibles

La vitesse de la réaction de transfert des électrons est fonction :

- *des valeurs relatives des constantes de vitesse de la réaction de transfert de charge, qui sont elles-mêmes fonction de E,

- *des concentrations des formes oxydées et réduites à l'interface électrode/solution,

- *des propriétés physicochimiques de la surface de l'électrode.

Pour les réactions réversibles et à l'équilibre, l'équation de Nernst est applicable :

$$E = E_0 + RT \ln \left(\frac{[Ox]_{x=0}}{[Red]_{x=0}} \right) \quad (23)$$

Dans l'équation (23) E_0 est le potentiel standard du couple *Ox-Red* considéré et $X = 0$ indique que les concentrations sont celles au niveau de l'interface entre l'électrode de travail et la solution aqueuse (ou le film multicouche de polyélectrolytes dans notre cas).

Lorsqu'un potentiel suffisamment négatif est appliqué dans la solution contenant l'espèce *Ox*, la réduction a lieu et le réactif oxydé est consommé. Pour chaque valeur de E imposée, un courant i est alors observé. Lors de la réduction de l'espèce *Ox*, la concentration de cette espèce diminue au voisinage de l'interface. Le libre parcours moyen des électrons étant inférieur à un angström en solution aqueuse, la réaction s'arrêterait rapidement sans un apport de l'espèce *Ox* par l'intermédiaire d'un processus de transport. Si l'on suppose que la convection n'a pas d'effet au voisinage immédiat de l'électrode et si la température est uniforme dans l'échantillon, ce transport est alors assuré uniquement par diffusion (l'effet du courant de migration est limité par l'utilisation d'un électrolyte support). Le flux de l'espèce *Ox* vers la surface de l'électrode est alors donné par :

$$i = -nFSD_{ox} \left(\frac{d[Ox]}{dx} \right)_{x=0} \quad (24)$$

Ou encore

$$i = -nFSD_{ox} \left(\frac{(c_{0x}^s - c_{0x}^e)}{\delta_{ox}} \right)_{x=0} \quad (25)$$

Avec n : le nombre d'électrons échangés, $F = 96500 \text{ C.mol}^{-1}$: la constante de Faraday, S : la valeur de l'aire de la surface de l'électrode, habituellement exprimée en cm^2 et D_{ox} : la valeur du coefficient de diffusion de l'espèce oxydée ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$).

Dans l'équation (25), $\delta_{ox} = \sqrt{\pi D_{ox} t}$ est la valeur de l'épaisseur de la couche de diffusion de l'espèce oxydée exprimée en cm.

Lorsque E devient plus négatif, le courant augmente jusqu'à une valeur limite correspondant à $c_{0x}^e = 0$, puis diminue donnant lieu à un signal sous forme de vague. Le courant de pic i_p , est donc directement proportionnel à la concentration de l'espèce oxydée dans la solution. Pour une électrode plane, la valeur du courant de pic i_p est donné par :

$$i_p = - \frac{nFSD_{ox} C_{ox}}{\delta_{ox}} \quad (26)$$

Notons également que i_p est fonction de $t^{1/2}$ (car $\delta_{ox} = \sqrt{\pi D_{ox} t}$) et donc augmente lorsque la vitesse du balayage augmente.

Les équations (24) et (25) peuvent être combinées pour donner l'équation de Heyrovsky-Ilkovic reliant le courant faradaïque à la différence de potentiel appliquée dans le cas des systèmes électrochimiques réversibles :

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_{\text{Red}} / \delta_{\text{Red}}}{D_{\text{Ox}} / \delta_{\text{Ox}}} \right) + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{i_p - i}{i} \right) \quad (27)$$

Dans l'équation (27), R et T sont la constante des gaz parfait ($8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) et la température en K. Tous les autres symboles ont été définis dans ce qui précède.

Cette relation est plus fréquemment exprimée sous la forme suivante à la température de 298 K, en supposant que les coefficients de diffusion et les épaisseurs de couches de diffusion sont les mêmes pour l'oxydant et le réducteur :

$$E = E_{1/2} + \frac{0.059}{n} \log \left(\frac{i_p - i}{i} \right) \quad (28)$$

L'équation 28 montre que lorsque $i = i_p/2$, alors $E = E_p = E_{1/2}$.

Dans cet exposé nous avons envisagé la réaction de réduction de l'espèce Ox, mais la situation est symétrique pour l'oxydation du réducteur.

B.9.5. Déroulement d'une expérience

Pour les expériences de voltampérométrie cyclique, nous avons utilisé trois électrodes (CHI604B from CH instruments, Texas) dont l'électrode de travail (électrode d'or), l'électrode de référence (au calomel SCE) et contre-électrode (en platine). Avant chaque expérience, l'électrode d'or a été nettoyée tout d'abord avec une solution de dodécyl sulfate de sodium à 10 mM (SDS pendant 15 min.), puis avec une solution d'acide chlorhydrique à 1 M (pendant 15 min.). Après ce traitement l'électrode d'or a été placée sous une lumière UV/ozone pendant 1 h avant d'être rincée avec de l'éthanol et de l'eau distillée. L'électrode de travail a été ensuite soumise à 2000 cycles de restructuration dans une solution d'acide sulfurique à 0.5 M avec une vitesse de balayage de 10 V.s^{-1} entre 0 et 1.6 V/SCE. Ces cycles rapides d'oxydation et de réduction produisent des oxydes sur la surface d'or [24]. Ces oxydes sont chargés à toute valeur du pH différente de leur point isoélectrique. Ils permettent ainsi le dépôt d'un film multicouche de polyélectrolytes sans être obligé de fonctionnaliser l'électrode avec une monocouche autoassemblée (comme cela est fait de façon traditionnelle pour ce type

d'expériences) [25]. Une fois ces cycles de restructuration effectués, l'électrode d'or a été rincée à l'eau distillée.

Ici les films de multicouche de polyélectrolytes ainsi que les vésicules (contenant du ferrocyanure de potassium à une concentration de 1 mM) ont ensuite été pulvérisés sur l'électrode d'or.

Tentons maintenant de décrire la construction du film par la méthode des sprays [26]. Ici toutes les solutions, y compris celles des polyélectrolytes, ont été préparées à l'aide d'une solution tampon tf.

Les sprays ont été effectués au moyen de pulvérisateur à air comprimé en polypropylène et polyéthylène (Roth référence : 0110.1. Taille : diamètre 217 X 55 mm. Buse : 0.40 mm.).

La construction du film s'est déroulée de la façon suivante : chaque solution de polyélectrolytes a été pulvérisée pendant 3 s sur la surface, laissée au "repos" pendant 3 s, rincée pendant 3 s avec la solution tampon, laissée au "repos" pendant 3 s. Afin d'éviter la rupture des vésicules pendant leur dépôt sur la surface, la solution de vésicules a été pulvérisée pendant 3 s, le substrat a été laissé au "repos" pendant 3 s et le polyélectrolyte suivant a directement été pulvérisé sur les liposomes sans étape de rinçage intermédiaire. En effet, des expériences préliminaires ont montré qu'il était nécessaire d'éviter l'étape de rinçage après le dépôt des vésicules. Les expériences précédentes, où le film a été construit par la méthode de trempage, ont prouvé que l'adsorption des vésicules sur une multicouche est rapide (seulement quelques secondes sont nécessaires). Par conséquent, la pulvérisation des vésicules sur un substrat pendant 3 s. doit être suffisante afin d'obtenir un bon taux de recouvrement.

Finalement, l'électrode d'or recouverte du film multicouche contenant des vésicules a été plongée dans la cellule d'électrochimie préalablement remplie avec la solution tampon tf. Les voltampérogrammes cycliques ont alors été enregistrés entre 0 et 0.5 V/SCE avec une vitesse de balayage de 0.2 V.s^{-1} à différents intervalles de temps pour suivre la libération du Fe(CN)_6^{4-} encapsulé. Des expériences ont été effectuées avec des vésicules protégées ou non par une monocouche de PDL afin d'étudier l'effet de la rigidification des vésicules sur la cinétique de libération du ferrocyanure.

B.10. Microscopie en champ proche (SNOM)

Afin d'utiliser les vésicules stabilisées et enfouies dans un film multicouche en tant que réacteurs immobilisés nous devons absolument être sûrs qu'il n'y a pas de libération de cette enzyme hors des liposomes lors de leur enfouissement dans la multicouche. Aussi, nous avons eu recours à la microscopie de fluorescence en champ proche (SNOM) qui nous a permis de relier la topographie de surface (obtenue comme par AFM) à la fluorescence due aux molécules de phosphatase alcaline marquées à la rhodamine. Un film PEI-(PGA-PAH)₂-(PGA-liposomes stabilisés)-(PGA-PAH)₂, comportant un mélange de liposomes (10 % de liposomes contenant de l'enzyme marquée à la rhodamine et 90 % de liposomes contenant de l'enzyme non marquée) a été étudié par cette technique.

B.10.1. Principe

La microscopie de fluorescence en champ proche (ou SNOM pour scanning near field optical microscopy) est une technique de microscopie à sonde locale qui permet d'observer des objets dont la taille est inférieure à la limite de résolution des microscopes optiques classiques [27]. En effet on doit pouvoir arriver à s'affranchir de la diffraction, qui limite le pouvoir de résolution des microscopes optiques, lorsque la distance entre la source et l'objet est inférieure à la longueur d'onde de la lumière utilisée. Cette prédiction théorique avait été faite dès le dix neuvième siècle, mais il n'existait aucun dispositif permettant de se mettre dans les conditions expérimentales requises. Le développement des matériaux piézoélectriques a permis de contrôler la distance d'approche de deux objets avec une précision de l'ordre de 10^{-10} m et a permis de travailler en champ optique proche au début des années 1990. Les microscopes actuels sont généralement constitués d'une sonde en fibre étirée dont l'extrémité possède un diamètre interne d'une dizaine à une centaine de nanomètres. Cette fibre est fixée sur un dispositif piézo-électrique qui commande ses déplacements avec une précision de l'ordre de 10^{-10} m. La lumière issue d'une source mono ou polychromatique est focalisée sur l'extrémité fixe de la fibre puis guidée pour atteindre l'échantillon. La partie mobile de la fibre balaye la surface de l'échantillon par l'intermédiaire d'un déplacement horizontal du cristal piézoélectrique sur lequel elle est montée. On enregistre point par point l'intensité captée. C'est la taille de l'extrémité de la fibre, et donc le diamètre du pinceau lumineux, et non plus la longueur d'onde de la lumière qui détermine la résolution du microscope. Un système de rétroaction basé sur les forces de contact (comme en AFM) ou sur les forces de frottement qui induisent un amortissement du mouvement de la

fibre lorsque celle-ci est mise en oscillation au voisinage de la surface à étudier, permet de maintenir la pointe à distance constante de l'échantillon. Ainsi la pointe peut suivre le relief de la surface. L'enregistrement de l'amortissement du mouvement de la fibre mise en oscillation transitoire en même temps que l'acquisition du signal optique permet d'obtenir une cartographie topographique de la surface, et de décorrélérer l'image optique du relief.

B.10.2. Déroulement d'une expérience

Le film PEI-(PGA-PAH)₂-(PGA-liposomes modifiés)-(PGA-PAH)₂, comportant un mélange de liposomes (10 % de liposomes contenant de l'enzyme marquée à la rhodamine et 90 % de liposomes contenant de l'enzyme non marquée), a été construit sur une lame de verre. La construction du film s'est effectuée de la même manière que celle décrite dans la partie ellipsométrie et dans l'article 4 du chapitre 3.

Les expériences de SNOM ont été effectuées à l'aide d'un appareillage commercial (Triple-O) sur lequel un microscope inversé a été rajouté (Axiovert 100, Zeiss).

L'échantillon a été placé sur la surface d'un cristal piézoélectrique permettant une translation dans les 3 directions de l'espace avec une précision de l'ordre de l'angström. La sonde, le long de laquelle se propage la lumière incidente, est portée par un support piézoélectrique permettant un contrôle fin de la distance de séparation avec l'échantillon à observer. La sonde que nous avons utilisée est une fibre optique dont l'ouverture est d'environ 100 nm. La source laser provient d'une diode dont la longueur d'onde est $\lambda = 532$ nm (CrystaLaser). Après interaction de cette dernière avec le film, une fluctuation de l'intensité réfléchie nous a permis d'obtenir une topographie de surface. De plus, la longueur d'onde à laquelle nous avons travaillé correspond à la longueur d'onde d'excitation de la rhodamine (dont nous nous sommes servis afin de marquer l'enzyme encapsulée dans les liposomes enfouis). Ainsi, lorsque le faisceau laser balaye point par point la même zone qu'auparavant et rencontre un liposome enfoui contenant de l'enzyme marquée, celle-ci va émettre un signal de fluorescence. Cette lumière émise est ensuite filtrée par le biais d'un miroir dichroïque et d'un filtre fluorescent (ne laissant passer que les longueurs d'onde supérieures à $\lambda > 590$ nm). Le faisceau fluorescent ainsi émis et filtré est ensuite focalisé sur une photodiode (APD, Perkin Elmer). Ceci nous permet d'obtenir une image de fluorescence "point par point" que nous pouvons corrélérer à l'image de topographie. Si dans notre cas nous obtenons une image de topographie similaire à celle obtenue par AFM, et si de plus la fluorescence est localisée dans

des liposomes individuels contenant de l'enzyme marquée, nous aurons alors de fortes présomptions quant à l'absence de libération de l'enzyme hors des liposomes enfouis.

Références Bibliographiques

- [1] Engvall, E. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Methods Enzymol.* **1980**, *70*, 419-439.
- [2] Stryer, L. *Biochemistry*; 3rd ed.; W. H. Freeman & Comp. New York, 1988.
- [3] Wallace, D. M. Precipitation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* **1987**, *152*, 41-48.
- [4] Mueller, E.; Sikes, C. S. Adsorption and modification of calcium salt crystal growth by anionic peptides and spermine. *Calcified Tissue International* **1993**, *52*, 34-41.
- [5] Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238-252.
- [6] Nebel, S.; Ganz, P.; Seelig, J. Heat changes in lipid membranes under sudden osmotic stress. *Biochemistry* **1997**, *36*, 2853-2859.
- [7] Angelova, M.; Soleau, S.; Meleard, P.; Faucon, J. F.; Bothorel, P. Preparation of giant vesicles by external a.c. electric fields. Kinetics and applications. *Prog. Colloid Polym. Sci.* **1992**, *89*, 127-131.
- [8] Moscho, A.; Orwar, O.; Chiu, D. T.; Modi, B. P.; Zare, R. N. Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.-USA* **1996**, *93*, 11443-11447.
- [9] Allen, T. Particle size measurement; Chapman and Hall.
- [10] Koppel, D. E. Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: The method of cumulants. *J. Chem. Phys.* **1972**, *57*, 4814-4820.
- [11] Hunter, R. J. *Zêta potential in colloid science*; Academic Press Limited, 1981.
- [12] Everett, D. H. *Basic Principles of Colloid Science*; Royal Society of Chemistry, 1988.
- [13] Rodahl, M.; Kasemo, B. On the measurement of thin liquid overlayers with the quartz-crystal microbalance. *Sensors and Actuators A: Physical* **1996**, *54*, 448-456.
- [14] Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B. Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: Continuum mechanics approach. *Physica scripta* **1999**, *59*, 391-396.
- [15] Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik* **1959**, *155*, 206-222.
- [16] Boulmedais, F.; Ball, V.; Schwinte, P.; Frisch, B.; Schaaf, P. et al. Buildup of Exponentially Growing Multilayer Polypeptide Films with Internal Secondary Structure. *Langmuir* **2003**, *19*, 440-445.
- [17] Born, M.; Wolf, E. Principles of Optics; Pergamon Press, 1975.

- [18] Azzam, R. M. A.; Bashara, N. M. *Ellipsometry and Polarized Light*; North Holland Company, 1977.
- [19] Tanchak, O. M.; Barrett, C. J. Swelling dynamics of multilayer films of weak polyelectrolytes. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 2734-2739.
- [20] Binnig, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E. 7*7 Reconstruction on Si (111) Resolved in Real Space. *Phys. Rev. Lett.* **1983**, *50*, 120-123.
- [21] Hübsch, E.; Fleith, G.; Fatisson, J.; Labbé, P.; Voegel, J. C. et al. Multivalent ion/polyelectrolyte exchange processes in exponentially growing multilayers. *Langmuir* **2005**, *21*, 3664-3669.
- [22] Bard, J. A.; Faulkner, L. R. *Electrochimie : Principes, méthodes et applications*; Masson, 1983.
- [23] Charlot, G.; Badoz-Lambling, J.; Tremillon, B. *Les réactions électrochimiques : Méthodes électrochimiques d'analyse*; Masson: Paris, 1958.
- [24] Oesch, U.; Janata, J. Electrochemical study of gold electrodes with anodic oxide films-II. Inhibition of electrochemical redox reactions by monolayers of surface oxides. *Electrochimica Acta* **1983**, *28*, 1237-1246.
- [25] Pardo-Yissar, V.; Katz, E.; Lioubashevski, O.; Willner, I. Layered polyelectrolyte films on Au electrodes: characterization of electron-transfer features at the charged polymer interfaces and application for selective redox reactions. *Langmuir* **2001**, *17*, 1110-1118.
- [26] Izquierdo, A.; Ono, S. S.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Decher, G. Dipping versus spraying: Exploring the deposition conditions for speeding up layer-by-layer assembly. *Langmuir* **2005**, *21*, 7558-7567.
- [27] Betzig, E.; Chichester, R. J. Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science* **1993**, *262*, 1422-1425.

Chapitre 3. Résultats et Discussions

A. Liposomes géants en solution : microréacteurs pour la production contrôlée de phosphates de calcium	102
A.1. Résumé	102
A.2. Article 1	104
B. Fonctionnalisation de films multicouches par des liposomes	115
B.1. Résumé	115
B.2. Article 2	116
C. Construction de films multicouches contenant des liposomes stabilisés par la méthode de nébulisation : intégrité moléculaire des liposomes	122
C.1. Résumé	122
C.2. Article 3	123
D. Liposomes incorporés dans des films multicouches de polyélectrolytes : réacteurs submicroniques pour la production de phosphates de calcium	133
D.1. Résumé	133
D.2. Article 4	134

Dans ce chapitre nous allons présenter une méthode permettant de stabiliser, d'adsorber puis d'enfouir des liposomes sur et dans un film multicouche de polyélectrolytes dans le but d'obtenir des réservoirs immobilisés contenant des molécules actives capables de libérer leur contenu de façon lente et progressive. Dans un second temps nous allons utiliser ces liposomes enfouis en tant que réacteurs immobilisés. Ce travail va être présenté sous la forme d'articles publiés ou en cours de soumission. Chaque article sera précédé d'un bref résumé en français. La démarche d'ensemble du travail est présentée sous la forme d'un organigramme (figure 1).

Dans la partie A, des liposomes géants (de quelques microns de diamètre) ont été préparés afin de créer des microréacteurs en solution permettant la précipitation de phosphates de calcium via une réaction d'hydrolyse d'un ester de phosphate amphiphile. Cette réaction a lieu à l'intérieur des vésicules géantes après diffusion du paranitrophényl phosphate dans les vésicules et après son hydrolyse catalysée par une enzyme encapsulée dans les vésicules : la phosphatase alcaline. Les ions phosphate produits lors de l'hydrolyse vont interagir avec les ions calcium déjà présents dans les vésicules et donner lieu à la précipitation souhaitée.

La partie B est consacrée à la description de la méthode de stabilisation des liposomes unilamellaires de grande taille (de quelques centaines de nanomètres de diamètre) qui ont ensuite été adsorbés puis enfouis dans un film multicouche de polyélectrolytes. Ce film

multicouche a été déposé sur le substrat par la méthode d'adsorption séquentielle et alternée de polyanions et de polycations.

Dans la partie C nous avons démontré l'intégrité de la bicouche lipidique des vésicules (contenant des ions électroactifs) enfouies au sein des films multicouches de polyélectrolytes. Puisque nous avons voulu étudier la cinétique de libération spontanée des ions encapsulés très rapidement après l'enfouissement des vésicules nous avons dû procéder à un enfouissement "accéléré" de celles-ci. Malheureusement, le dépôt d'une paire de couches de polyélectrolytes par la méthode traditionnelle d'immersion du substrat dans une solution de polycations puis de polyanions avec un rinçage intermédiaire au tampon prend typiquement de 20 à 40 minutes. Puisque nous désirions enfouir les vésicules sous au moins deux paires de couches, il s'écoulerait ainsi une période de temps important entre l'étape de dépôt des liposomes et le début de la mesure de la cinétique de libération. Pendant ce laps de temps une part importante des espèces encapsulées pourrait diffuser hors des vésicules ou sortir par des pores créés au cours de l'étape de dépôt. Nous aurions donc une fausse image de l'état de perméabilité ou d'imperméabilité des vésicules. Il nous fallait donc une méthode de dépôt rapide des films multicouches. Il se trouve que nous développons au laboratoire une méthode de dépôt par nébulisation alternée de polyélectrolytes chargés de signe opposé. Cette méthode est aussi appelée méthode de dépôt par "spray". Elle a été initialement suggérée par le professeur Joseph Schlenoff à l'université de Floride puis fortement développée et généralisée dans notre groupe où il a été montré que quelques secondes de spray par couche permettaient d'obtenir un film multicouche de qualité encore meilleure, en terme d'homogénéité et de rugosité que celle obtenue par immersion alternée dans des solutions de polyanions et de polycations

La partie D est consacrée à l'utilisation de nos films multicouches en tant que réacteurs immobilisés dans lesquels la même réaction enzymatique que celle décrite dans la partie A a permis de former des cristaux de phosphates de calcium uniquement à l'intérieur des vésicules immobilisées au cœur du film multicouche.

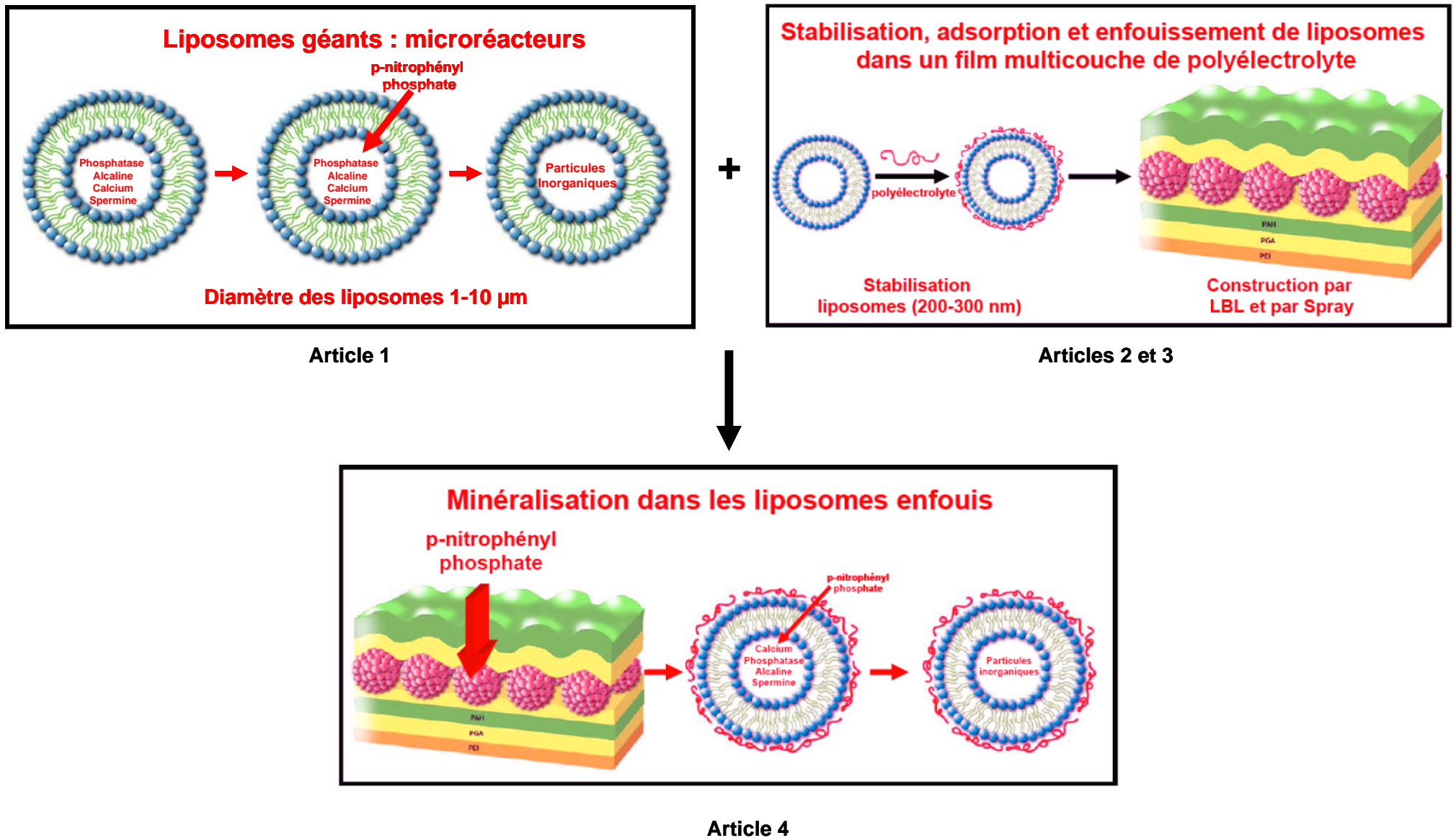


Figure 1. Organigramme représentant la démarche d'ensemble de ce travail de thèse.

A. Liposomes géants en solution : microréacteurs pour la production contrôlée de phosphates de calcium

A.1. Résumé

Les phosphates de calcium sont parmi les biomatériaux les plus importants dans les organismes vivants où ils jouent un rôle mécanique (os, dents) et constituent une réserve de calcium. *In vivo*, leur croissance s'effectue dans un environnement confiné (osteoblastes). Ce travail s'inspire de ce processus de minéralisation rencontré chez les mammifères. Ainsi, des liposomes géants ont été préparés à partir de 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro phosphatidylcholine dans lesquels différents composés ont été encapsulés : des ions calcium, de la phosphatase alcaline et de la spermine. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, la phosphatase alcaline est une enzyme capable d'hydrolyser des esters de phosphate produisant ainsi des ions phosphate. La spermine est une tétraamine qui, en présence d'ions calcium et d'ions phosphates, possède la propriété d'influencer la nucléation et la cristallisation des phosphates de calcium. Un ester de phosphate de faible masse molaire, le paranitrophényl phosphate, a été ajouté à l'extérieur des liposomes. Des mesures spectroscopiques ont révélé que cette molécule amphiphile est capable de diffuser à travers la membrane lipidique. En effet au contact de l'enzyme encapsulée, la réaction d'hydrolyse est catalysée : il y a non seulement libération d'ions phosphate mais également de paranitrophénol qui absorbe fortement la lumière aux alentours de 405-410 nm. Or toutes les précautions expérimentales ont été prises pour que l'enzyme active ne soit présente qu'à l'intérieur des vésicules géantes, c'est donc que le substrat a dû traverser la bicouche lipidique. La sursaturation des phosphates de calcium augmente donc progressivement à l'intérieur des vésicules géantes au cours de la réaction d'hydrolyse. Lorsqu'une sursaturation critique par rapport à l'une des phases possibles des phosphates de calcium est atteinte, des nucléis stables se forment et ceux-ci peuvent croître pour former des phosphates de calcium à l'intérieur des vésicules. Nous avons démontré par microscopie optique que les particules inorganiques obtenues ne sont localisées qu'à l'intérieur des vésicules lipidiques. Ceci démontre à posteriori que l'enzyme active n'est présente qu'à l'intérieur des vésicules qui conservent leur intégrité, et que la réaction enzymatique et la réaction de précipitation ne sont également localisées que dans les compartiments cloisonnés internes aux vésicules géantes. Les particules inorganiques obtenues ont été caractérisées, après élimination du sel du tampon par centrifugation-lavage-séchage, à la fois par spectroscopie infrarouge, par microscopie électronique à balayage et par diffraction des électrons. Il apparaît que les particules inorganiques sont fort probablement constituées d'hydroxyapatites faiblement cristallines, mais on ne peut pas exclure que les

étapes de purification précédant la caractérisation des particules aient profondément influé sur la nature du résultat. En tout cas la taille moyenne des particules est compatible avec la distribution de diamètres des vésicules au sein desquelles la synthèse a eu lieu.

A.2. Article 1

**Giant Liposome Microreactors for Controlled Production
of Calcium Phosphate Crystals**

Marc Michel, Mathias Winterhalter, Laurent Darbois, Joseph Hemmerle, Jean-Claude Voegel,
Pierre Schaaf and Vincent Ball

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Giant Liposome Microreactors for Controlled Production of Calcium Phosphate Crystals

Marc Michel, Mathias Winterhalter, Laurent Darbois, Joseph Hemmerle, Jean Claude Voegel, Pierre Schaaf, and Vincent Ball

Langmuir, 2004, Vol. 20, N°15, Pages 6127 -6133

Pages 6127 -6133:

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/langd5/2004/20/i15/html/la049862u.html>

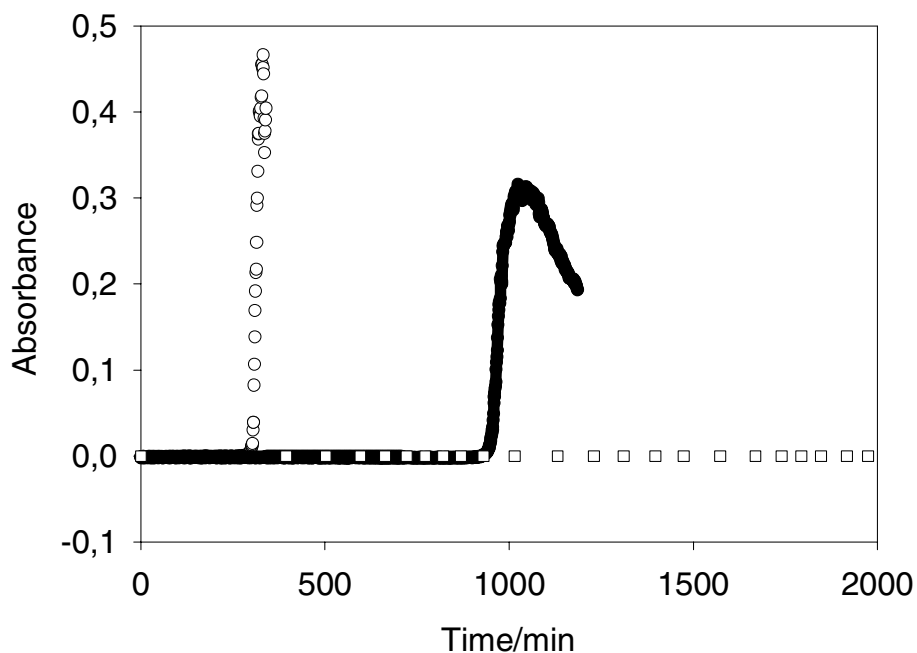
Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Giant liposome micro reactors for controlled production of calcium phosphate crystals

Marc MICHEL, Mathias WINTERHALTER , Laurent DARBOIS, Joseph HEMMERLE,
Jean Claude VOEGEL, Pierre SCHAAF and Vincent BALL.

Supporting Information.

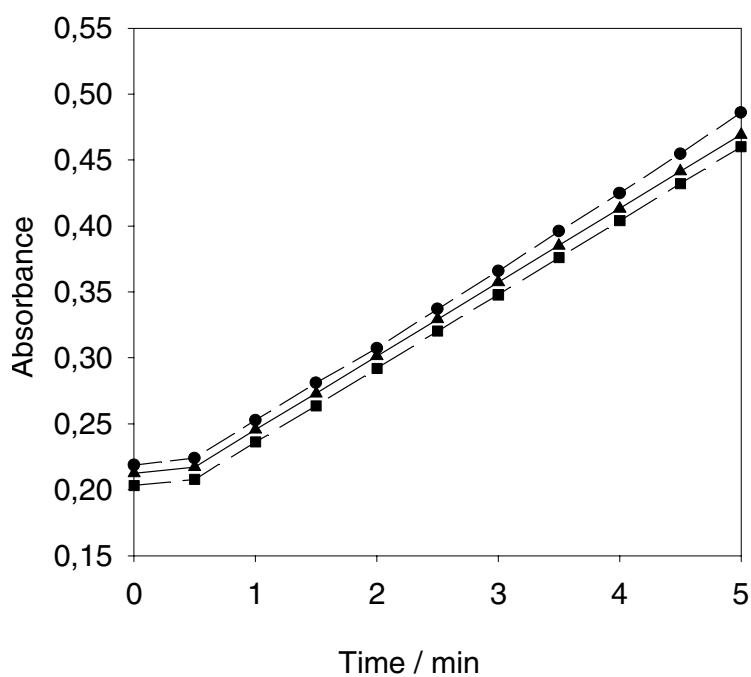
Supporting Information 1.



Turbidity measurements at $\lambda = 500$ nm of a (○) 6 mM Ca^{2+} , 6 mM Phosphate and 10^{-4} M spermine solution, (□) 6 mM Ca^{2+} , 6 mM Phosphate without spermine and of a (●) 6 mM Ca^{2+} , 6 mM PNP, 10^{-4} M spermine and 0.5 mg/mL AP solution. Time $t = 0$ corresponds to the addition of spermine in curves (○,) and to the addition of spermine and AP in curve (●). The onset of turbidity increase allows to estimate the induction time preceding the onset of

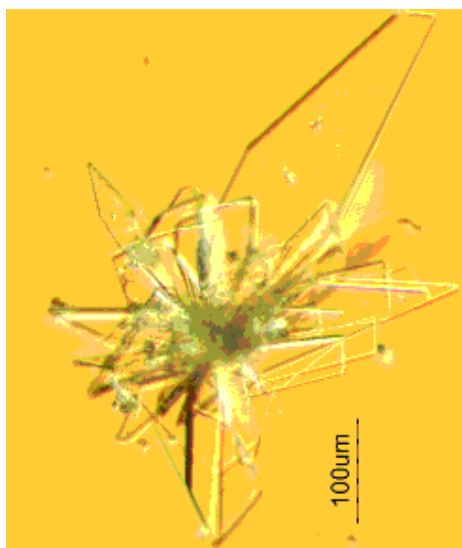
phosphate calcium nucleation. In these three experiments, all the components were solubilized in a 10 mM. Tris buffer at pH = 7.4 containing 0.15 M. NaCl.

Supporting Information 2.



Enzymatic activity of a 0.5 mg/mL AP solution encapsulated in giant liposomes at different concentrations of PNP : (●) 6 mM PNP (▲) 2 mM PNP and (■) 1 mM PNP. The absorbance of the produced paranitrophenol was measured at a wavelength of 405 nm. The absorbance was measured with respect to a reference which was constituted of PNP at the same concentration as in the measurement cuvette.

Supporting Information 3.



Platelet like particles obtained from a supersaturated calcium phosphate solution (6 mM. in both species) to which spermine was added to a final concentration of 10^{-4} M at time $t = 0$. The particles were observed directly from the Tris-NaCl buffer containing calcium, phosphate and spermine ions.

B. Fonctionnalisation de films multicouches par des liposomes

B.1. Résumé

Ce second travail est consacré à la stabilisation de liposomes unilamellaires de grande taille (200 à 300 nm de diamètre) afin de les adsorber sur une surface puis de les enfouir dans un film multicouche de polyélectrolytes. Des vésicules lipidiques constituées d'un mélange de 90 % (w/w) de 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycérophosphatidylcholine (un phospholipide neutre), de 5 % (w/w) de 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycérophosphatidylglycérol (un phospholipide chargé négativement dans les conditions de pH de l'expérience) et de 5 % (w/w) de cholestérol ont été adsorbées puis enfouies sur et dans un film de polyélectrolytes de type PEI-(PGA-PAH)_n (avec les conventions suivantes : PEI : poly(éthylène imine), PGA : acide poly-L-glutamique, PAH : poly(allylamine)). Il a été démontré que les vésicules non modifiées semblent se déformer, fusionner et même se rompre lors de l'enfouissement dans le film multicouche. Il a donc fallu stabiliser et rigidifier ces vésicules. La stratégie de stabilisation des vésicules a été inspirée par les travaux du professeur H. Möhwald. Il a été démontré que des vésicules lipidiques recouvertes par l'adsorption d'une monocouche de polyélectrolyte restent intactes, même en présence d'un détergent alors qu'en l'absence de monocouche de polyélectrolyte ces vésicules conduisent à des micelles mixtes lors de l'addition du détergent. Par conséquent, nous avons décidé de stabiliser nos vésicules en y adsorbant une monocouche de poly-D-Lysine de faible masse moléculaire (PDL). Après l'optimisation des conditions expérimentales (choix du tampon, force ionique de la solution aqueuse, concentration de vésicules), il a été montré par microscopie à force atomique que les vésicules modifiées conservent leur forme après l'adsorption puis enfouissement dans un film de PEI-(PGA-PAH)_n. De plus, leur taille moyenne est à peine augmentée lors de l'enfouissement. La microbalance à cristal de quartz avec suivi de la dissipation a permis de montrer que la cinétique de dépôt des vésicules modifiées sur un film multicouche PEI-(PGA-PAH)₂-PGA correspondait au dépôt de vésicules intactes sans rupture consécutive à l'adsorption d'après les critères définis dans le groupe du professeur Bengt Kasemo.

B.2. Article 2

**Layer by Layer Self-Assembled Polyelectrolyte Multilayers
with Embedded Phospholipid Vesicles**

Marc Michel, Dominique Vautier, Jean-Claude Voegel, Pierre Schaaf and Vincent Ball

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Layer by Layer Self-Assembled Polyelectrolyte Multilayers with Embedded Phospholipid Vesicles

Marc Michel, Dominique Vautier, Jean-Claude Voegel, Pierre Schaaf, and Vincent Ball

Langmuir, 2004, Vol.20, N°12, Pages 4835 -4839

Pages 4835 -4839 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/langd5/2004/20/i12/html/la049736q.html>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

C. Construction de films multicouches contenant des liposomes stabilisés par la méthode de nébulisation : intégrité moléculaire des liposomes

C.1. Résumé

Dans le travail précédent nous avons démontré que des liposomes stabilisés par une monocouche de polyélectrolyte peuvent être déposés dans un film multicouche de polyélectrolytes sans être déformés de façon notable. Dans la partie suivante de ce travail, qui est une poursuite logique de l'étude précédente, nous avons étudié l'intégrité moléculaire des vésicules incorporées au sein des films (PGA-PAH)_n. Pour cela, une espèce électroactive (le ferrocyanure de potassium) a été encapsulée au sein des liposomes. Le film multicouche de polyélectrolytes a ensuite été déposé sur une électrode grâce à une nouvelle méthode développée et optimisée au sein de notre laboratoire et qui consiste à pulvériser sur la surface, couche par couche les solutions de polyélectrolytes et les liposomes électriquement chargés en surface. Ce nouveau procédé de dépôt permet de réduire de manière significative la durée de préparation de l'architecture multicouche comportant les vésicules, ce qui est un pré requis indispensable si l'on veut étudier la cinétique de libération des ions encapsulés presque immédiatement après l'enfouissement des vésicules. La cinétique de libération du ferrocyanure dans le film PGA-PAH a été alors suivie par voltampérométrie cyclique. Ce travail montre que le ferrocyanure est libéré de manière lente et progressive. Ces expériences ont montré que les ions fortement chargés et relativement hydrophobes peuvent être libérés en dehors des capsules lipidiques enfouies dans le film multicouche et remplir progressivement le film de polyélectrolytes. De plus, nous avons démontré dans ce travail qu'il est possible de déposer deux couches de liposomes séparées par plusieurs couches de polyélectrolytes sans pour autant affecter l'intégrité moléculaire des liposomes. Cela offre des perspectives intéressantes pour pouvoir réaliser des réactions chimiques entre deux composés hydrosolubles A et B initialement localisés dans deux réservoirs lipidiques distincts. Si les deux réactifs diffusent progressivement en dehors de chaque compartiment vésiculaire, la réaction se fera progressivement au grès des rencontres entre réactifs. La situation idéale serait de pouvoir enfouir des compartiments totalement imperméables aux réactifs considérés et de provoquer leur libération par applications de perturbations extérieures bien contrôlées. L'expérimentateur serait alors libre de déclencher des réactions chimiques au sein des multicouches chargées en réactifs mais isolés les uns des autres par l'intermédiaires de compartiments imperméables.

**Layer by Layer Self-Assembled Polyelectrolyte Multilayers
with Embedded Phospholipid Vesicles Obtained by
Spraying: Integrity of the Vesicles**

M. Michel, A. Izquierdo, G. Decher, J.-C. Voegel, Pierre Schaaf and V. Ball

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Layer by Layer Self-Assembled Polyelectrolyte Multilayers with Embedded Phospholipid Vesicles Obtained by Spraying: Integrity of the Vesicles

M. Michel, A. Izquierdo, G. Decher, J.-C. Voegel, P. Schaaf, and V. Ball

Langmuir, 2005, Vol. 21, N°17, Pages 7854 -7859

Pages 7854 -7859 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/langd5/2005/21/i17/html/la050497w.html>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

**Layer by Layer Self-Assembled Polyelectrolyte Multilayers with Embedded
Phospholipid Vesicles obtained by Spraying : Integrity of the Vesicles**

M. Michel^{1,2}, A. Izquierdo², G. Decher², J.-C. Voegel¹, P. Schaaf^{2,*}, V. Ball¹

1 : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

Unité 595

Faculté de Médecine.

11 rue Humann.

67085 Strasbourg Cedex.

2 : Centre National de la Recherche Scientifique.

Unité Propre 22, Institut Charles Sadron.

6 rue Boussingault.

67083 Strasbourg Cedex.

* : to whom all correspondance should be addressed.

Phone : 0033 3 88 41 40 01

Fax : 0033 3 88 41 40 99

Supporting information.

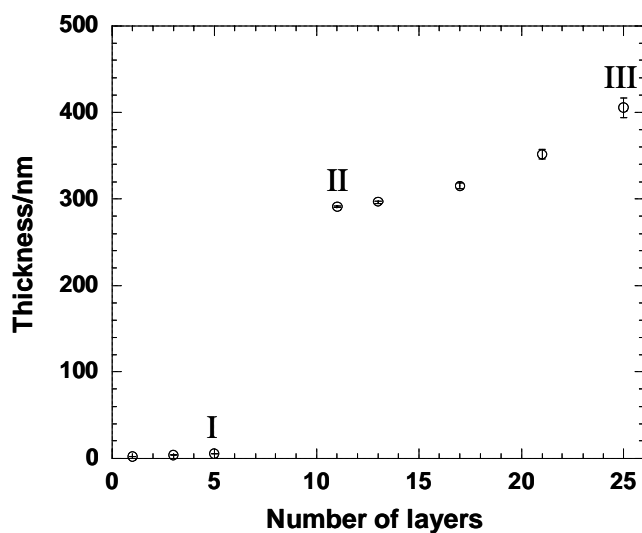


Figure 1: Evolution of the thickness increase of a $PEI-(PGA/PAH)_2-(PGA/SV)-(PGA/PAH)_9$ multilayer obtained by the alternated spraying method. The different steps corresponds to the deposition of : Step I: $PEI-(PGA/PAH)$; Step II: Step I + $(PGA/SV)-(PGA/PAH)_2$; Step III: Step II + $(PGA/PAH)_7$

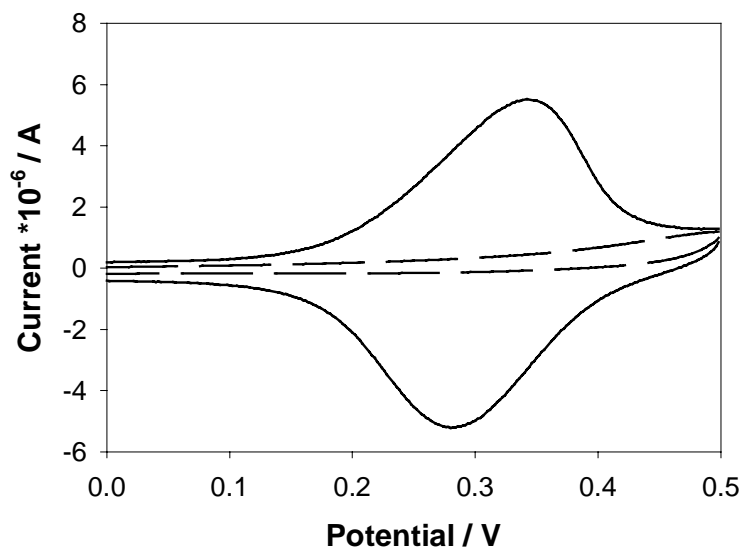


Figure 2: Cyclic voltamograms on the surface of a gold electrode covered with a PEI-(PGA/PAH)₅ multilayer onto which a 1 mM Fe(CN)₆⁴⁻ solution was sprayed. Dashed line: capacitive current obtained before ferrocyanide spraying. Full line: 1 min. after spraying. The scan rate was equal to 200 mV.s⁻¹.

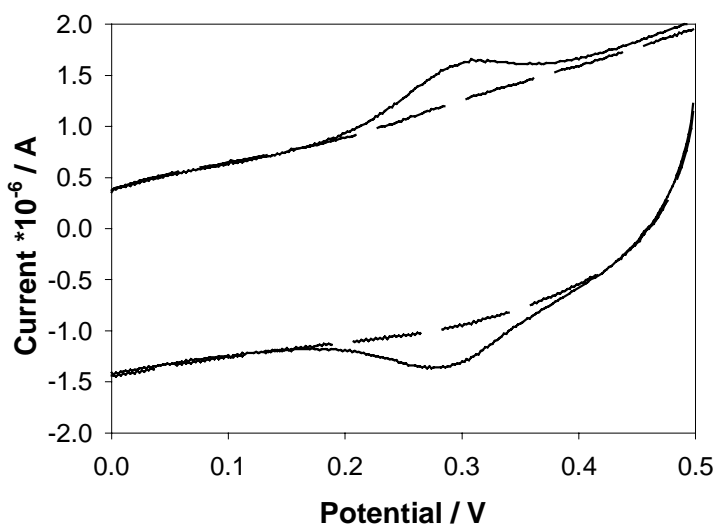


Figure 3: Cyclic voltamograms on the surface of a gold electrode onto which a PEI-(PGA/PAH)₂-(NSV/PAH)-(PGA/PAH)₂ film was sprayed. In this experiment, the vesicles contained ferrocyanide ions.

Dashed line: signal for PEI-(PGA/PAH)₂ before spraying the non stabilized vesicles (capacitive current); full line: cyclic voltamogram obtained about 1 min. after film build up was achieved including non stabilized vesicles. The scan rate was equal to 200 mV.s⁻¹.

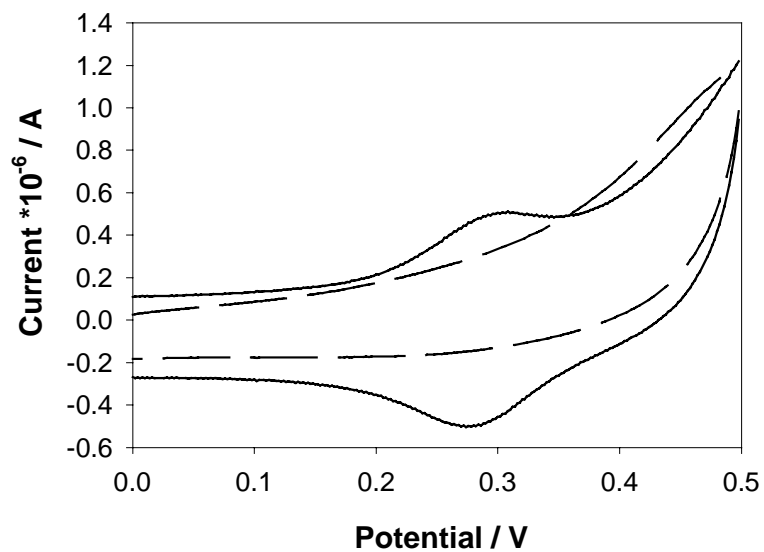


Figure 4: Cyclic voltamograms of a gold electrode covered with a PEI-(PGA/PAH)₂-PGA film onto which stabilized vesicles (SV) were sprayed and kept uncovered. Dashed line: signal obtained before spraying the SV (capacitive current); full line: cyclic voltamogram obtained about 1 min after SV spraying was achieved. The scan rate was equal to 200 mV.s⁻¹.

D. Liposomes incorporés dans des films multicouches de polyélectrolytes : réacteurs submicroniques pour la production de phosphates de calcium

D.1. Résumé

Le dernier travail abordé au cours de ce travail de thèse est consacré à l'utilisation des liposomes incorporés dans un film multicouche en tant que réacteurs immobilisés dans lesquels une réaction enzymatique a permis de produire des cristaux de phosphates de calcium. Ce dernier travail utilise l'ensemble des concepts et des méthodologies développées au cours des études précédentes. En effet, nous avons encapsulé de la phosphatase alcaline, du calcium et de la spermine dans les liposomes (comme dans l'article 1) avant de les stabiliser et de les enfouir sur et dans un film multicouche à base de PGA et de PAH (comme dans l'article 2) en nous assurant que les espèces encapsulées restent localisées au sein des vésicules enfouies au moins pendant le temps correspondant à la réaction de précipitation (comme dans l'article 3). Des expériences effectuées en microscopie à champ proche couplée à de la microscopie à fluorescence (SNOM) nous ont permis de montrer que la phosphatase alcaline encapsulée n'est pas libérée des vésicules lipidiques après leur enfouissement. Nous avons donc un exemple de système pour lequel les vésicules enfouies dans le film multicouche ne libèrent pas leur contenu. Cela était toutefois prévisible vu la grande dimension, plusieurs nanomètres de rayon hydrodynamique, de l'enzyme. Après avoir mis le film contenant les liposomes enfouis au contact d'une solution de paranitrophényl phosphate qui, comme nous l'avons démontré dans la première partie de cette thèse, est capable de diffuser à travers la membrane lipidique mais également à travers le film de polyélectrolytes, va réagir avec les espèces encapsulées. La cinétique de croissance des phosphates de calcium a été suivie *in situ* par spectroscopie infrarouge en mode réflexions totales atténuées, ce qui constitue une avancée notable par rapport au premier travail avec les liposomes géants. Des images de microscopie à force atomique ont révélé la présence de ces cristaux au niveau des liposomes.

**Layer-by-layer Self Assembled Polyelectrolyte Multilayers with
embedded Liposomes : Immobilized Submicronic Reactors for
Mineralization**

Marc Michel, Youri Arntz, Guillaume Fleith, Jean-Claude Voegel, Pierre Schaaf,
and Vincent Ball

**Layer-by-layer Self Assembled Polyelectrolyte Multilayers with embedded Liposomes :
Immobilized Submicronic Reactors for Mineralization**

Marc Michel¹, Youri Arntz², Guillaume Fleith¹, Jean-Claude Voegel², Pierre Schaaf¹,
and Vincent Ball^{2*}

1 : Centre National de la Recherche Scientifique.

Institut Charles Sadron, Unité Propre 22 du CNRS

6 rue Boussingault

67083 Strasbourg Cedex.

France.

2 : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale et Faculté de Chirurgie Dentaire.

11 rue Humann

67085 Strasbourg Cedex.

* : to whom all correspondance should be addressed.

Abstract

The development of chemical reactions in nanospaces is of paramount importance for the development of active nanodevices particularly in nanofluidics. It is then of crucial importance not only to allow liquid flow in nanochannels but also to provide immobilized reservoirs of reactants. It has been shown in a previous paper that phospholipid vesicles can be incorporated into poly-L-glutamic-acid/poly(allylamine) (PGA/PAH) multilayered polyelectrolyte films without spontaneous bilayer rupture. The aim of the present study was to use such a system as an “embedded submicronic reactor” able to trigger precipitation of calcium phosphates within closed spaces through an enzymatic reaction, the enzyme being also encapsulated in the vesicle interior. To this aim, large unilamellar vesicles (LUVs) were produced containing calcium ions as active ions in the mineralization process, spermine as an activator of crystal growth and alkaline phosphatase as catalyst to convert phosphate esters into phosphates. After stabilisation by adding a layer of poly-(D-lysine), these vesicles were embedded in a (PGA-PAH)_n film. A paranitrophenyl phosphate containing solution, was then put in contact with this film. It has previously been demonstrated (Langmuir **2004**, 20, 6127) that this amphiphilic molecule is able to diffuse through the lipidic container and to be subsequently hydrolysed under enzymatic catalysis into active phosphate species which interact with the available calcium and spermine to produce calcium phosphates only in the

interior of the liposomes. In this study the same concept was applied to active large unilamellar vesicles embedded in a polyelectrolyte multilayer and it is shown through infrared spectroscopy in the attenuated total reflexion mode that calcium phosphates, most probably hydroxyapatite, is growing “in” or “on” the polyelectrolyte multilayer. By using scanning near field fluorescence microscopy it is demonstrated that the alkaline phosphate enzyme is most probably located inside the vesicles after their embedding. In addition atomic force microscopy was used to show, after chemical removal of the organic top layer of the film, that the inorganic platelets produced after the precipitation reaction are localized in volumes close to that of the vesicles into which the phosphate ester hydrolysis and subsequent precipitation reaction did occur.

Introduction

Among the different coating methods of solid surfaces, the alternate deposition of polyanions and polycations onto a charged solid substrate leads to the formation of polyelectrolyte multilayers.^{1,2} This method, developed by Decher and coworkers about 14 years ago, allows the buildup of polyelectrolyte multilayered films on almost any kind of surface whatever its shape, and with a large scale of possible polyelectrolytes.^{3,4} Hence, these multilayers can be deposited by alternated adsorption of polyanions or polycations on the surface of charged planar substrates or on colloids.^{5,6} The obtained films whose thickness can be finely tuned by changing the physicochemical conditions in the dipping solution⁷⁻⁹ and/or the nature of the used polyelectrolytes, and mostly their ability to carry strong charge densities^{9,10}, can easily be functionalized and even multi-functionalized with many potential applications ranging from optical materials¹¹⁻¹² up to light emitting diodes¹³⁻¹⁴ biomaterials¹⁵⁻²⁰, filtration membranes²¹, super hydrophobic surfaces²², and corrosion prevention.²³ Functionalization of these films is usually obtained by the incorporation of active species, like proteins²⁴⁻²⁷, DNA²⁸⁻³⁰ or inorganic particles³¹⁻³² into their architectures. One of the main problems encountered with most of the functionalisation methods of polyelectrolyte multilayers is the low loading capacity of a single deposited layer. Namely, if one wishes to deposit active molecules, like peptides covalently linked to polyelectrolytes, the grafting ratio has to be kept low enough in order not to reduce too strongly the linear charge density of the adsorbing polyelectrolyte. Hence if one needs to immobilize large amounts of such molecules one has to repeat a large number of deposition steps. Our aim was then to immobilize, in a single step, a large reservoir able to contain active substances. The initial idea was that the

deposition of phospholipid vesicles into polyelectrolyte multilayers would greatly enhance their loading capacity and should allow the encapsulation of biomolecules into their native aqueous environment without any direct contact with the polyelectrolytes constituting the multilayer. Moreover, liposomes present some advantages like their ease of preparation.³³ However the lack of stability of these vesicles does not allow their deposition on most surfaces (with some exceptions however³⁴) without spontaneous disruption. In a previous paper we described a method to embed liposomes into polyelectrolyte multilayered films built-up by an alternated deposition of polyanions and polycations.³⁵ In order to avoid their rupture and/or their fusion during their deposition, the negatively charged vesicles were rigidified by adding a polycationic layer onto their surface. This protective layer allowed to avoid their fusion once deposited on the multilayer surface. The vesicles adsorb to form a compact and "hard" monolayer as imaged by contact mode AFM in air, after embedding under two PGA/PAH bilayers. The thickness of the adsorbed vesicle layer was close to 250 nm which corresponds to the diameter of the vesicles in solution. We also showed the possibility to deposit the vesicles by means of the spraying method first developed by Schlenoff et al.³⁶ and extended in our group³⁷ as well as the possibility to deposit two vesicular layers separated by a polyelectrolyte film.³⁸ These vesicular layers could act as "reservoirs" as well as "reactors" in which enzymatic reactions could be catalysed if the substrates are able to diffuse both through the polyelectrolyte film and the lipidic bilayer delimiting the vesicles. The aim of this paper is to describe such a submicronic reactor system embedded in a polyelectrolyte multilayered film. As an example, we induce the mineralization process of calcium phosphates within closed spaces. To this aim, large unilamellar vesicles (LUVs) containing calcium ions as active ions in the mineralization process, spermine as an activator of crystal growth and alkaline phosphatase as catalyst were prepared. This enzyme catalyses the hydrolysis of phosphate esters into phosphates. These phosphate esters were provided in the form of paranitrophenyl phosphate outside the liposomes. It is demonstrated that these amphiphilic molecules are able to diffuse through the lipidic container and to be subsequently hydrolysed under enzymatic catalysis into active phosphate species which interact with the available calcium and spermine to produce calcium phosphates only in the interior of the liposomes.

Materials and methods

Throughout this study we used 10 mM Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Gibco BRL) buffers at $pH = 7.4$ with either 0.015 or 0.15 M NaCl (Prolabo, France). The 0.015 M NaCl buffer, which will be called buffer A, was used for the preparation of the liposomes and the 0.15 M NaCl buffer solution, which will be called buffer B was used for the construction of the polyelectrolyte multilayered film.

The lipids used to prepare the vesicles, all purchased from Sigma and used without further purification, were 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC) [(L- α Lecithin, type XVI-E from Egg Yolk, Sigma, ref P-3556, lot 22K5223], Cholesterol [(5-Cholesten-3-ol), Sigma, ref C-8667, lot 050K304] and L- α -phosphatidyl-DL-Glycerol, [β -oleoyl- γ -palmitoyl (C18:1[*cis*]-9/C16:0, POPG), Sigma, ref P-6956, lot 112K5210]. The species to be encapsulated in the liposomes were all dissolved in buffer A. This solution also contained 12 mM Ca^{2+} cations (in the form of calcium chloride, Sigma, C-4901, lot 062K009), 0.5 mg.mL⁻¹ alkaline phosphatase (AP) from porcine intestinal mucosa (Sigma, ref P-4002, lot 65F8195) and 1×10^{-4} M spermine (Sigma, S-2876, lot 32K2600). We added spermine to the calcium and alkaline phosphatase solutions because preliminary studies showed that this tetraamine favors the precipitation of calcium phosphates. Two additional solutions were prepared. The first one was a solution of paranitrophenyl phosphate (PNP) at a concentration of 12 mM. (Sigma, N-4645, Lot 051K53185) in buffer A. The second one was a solution of 0.5 mg.mL⁻¹ Poly-(D-lysine) (PDL) (Sigma, ref. P-4408, lot 020K5940, viscosimetric molecular weight : 2000 g.mol⁻¹) dissolved in buffer A. This polyelectrolyte was used to be adsorbed onto the liposome surfaces, which has been shown to be negatively charged owing to the presence of POPG.³⁵

The polyelectrolytes used to build the polyelectrolyte multilayers were branched polyethylene imine (PEI, Aldrich, Cat. number : 15,188-2, molecular weight : 750 000 g. mol⁻¹), polyallylamine (PAH, Aldrich, cat number : 28,322-3, molecular weight : 65 000 g.mol⁻¹), and poly-L-glutamic acid (PGA, Sigma, ref. P-4886, viscosimetric molecular weight : 17 000 g.mol⁻¹).

Vesicle preparation

The liposomes were prepared by dissolving a mixture of 50 mg POPC, 2.5 mg of POPG and 2.5 mg cholesterol in 5 mL of chloroform. POPG was used to confer a negative charge to the vesicles at pH 7.4, the pH at which the experiments were performed, and cholesterol was used for its ability to rigidify membranes. The lipid solution was dried under a flux of nitrogen and stored under vacuum overnight. 10 mL of buffer A containing 12 mM Ca^{2+} cations, 0.5 mg.mL⁻¹ alkaline phosphatase (AP) and spermine was added to allow for lipid hydration and in the same time for the encapsulation of all the active species. The resulting turbid suspension was then subjected to 15 freeze (in liquid nitrogen) and thaw (in hot water) cycles and finally extruded 10 times through a 0.22 μm Millex GV membrane (Millipore). This method is known to form unilamellar vesicles. The non encapsulated species (AP, spermine, and Ca^{2+}) were eliminated from the solution by using first a Sephadex G200 column and then by dialysis (Spectra/Por, Bioblock with cutoff of 1000 g.mol⁻¹). The z average diameter of the vesicles lies around 250nm with a distribution ranging from 100-300nm and the zeta potential is of (-49 ± 1.2) mV as measured in buffer A (Zetasizer 3000 HS, Malvern Instruments).

For deposition experiments on a multilayer ending with a polycation polyallylamine (PAH) layer, the liposome solutions was diluted by a factor 15 with buffer A and was then slowly dropped into the same volume of a 0.5 mg.mL⁻¹ poly-D-lysine (PDL) solution previously prepared in the same Tris buffer A. Both, the PDL chain length ($M_w = 2000$ g.mol⁻¹) and its concentration (0.5 mg.mL⁻¹) were chosen to be small enough to avoid significant vesicle bridging. Nevertheless the PDL solution has to be concentrated enough to ensure full coverage of the vesicle surface. Moreover the ionic strength of buffer A was chosen small enough to avoid a too strong screening of the repulsive electrostatic forces between identically charged vesicles. Because of the negative liposome surface charge, PDL is assumed to adsorb onto the vesicles. This was verified by means of zeta potential measurement : its value became equal to $(+55.4 \pm 1.4)$ mV after PDL adsorption. Moreover the size distribution of the vesicles remained comparable to the liposome in the absence of the PDL layer with diameters ranging typically from 220 to 350 nm. This clearly excludes significant vesicle aggregation upon PDL adsorption.

Liposomes containing Ca^{2+} , spermine and rhodamine labeled AP were prepared and stabilized in the same way as the non labeled AP. One volume of this solution was mixed to 9 volumes of the liposome solution containing non labeled enzymes. This solution was used for

the SNOM experiments in order to be able to distinguish between liposomes containing fluorescent AP from liposomes with non labelled enzymes.

The labelling of the alkaline phosphatase by a fluorescent molecule was done according to a well described reaction.³⁹ Briefly, the labelling was made in the presence of carbonate buffer (at pH 8.5-9.0) by the addition of a small volume (typically 100 μ L) of dimethylsulfoxide into which the rhodamine was solubilized. The labelling reaction was performed in the dark at ambient temperature (close to 25°C) during one hour. The excess of fluorophore which did not react with the protein was removed by extensive dialysis against buffer A (molecular weight cut off of the membrane : 12 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) until there was no detectable absorption at 485 nm in the solution out of the dialysis bag.

Once the liposomes were prepared and before their adsorption on a PEI-(PGA-PAH)₂-PGA film, we had to eliminate the non encapsulated AP enzymes, spermine and Ca^{2+} from the solution in order to avoid subsequent hydrolysis of PNP outside of the reactors after the PNP addition in the solution. The non encapsulated AP could be separated from the encapsulated one by means of gel permeation chromatography and dialysis, as it is usually done with large or small unilamellar liposomes.

Characterisation methods

To characterise the vesicle incorporation in the polyelectrolyte multilayer as well as the film structure we used atomic force microscopy (AFM, Nanoscope IV, Digital Instrument). AFM images, were obtained after intense washing with Milli-Q water in order to avoid sodium chloride crystallisation arising from the salt present in the buffer. The samples were then dried in air and imaged in the tapping mode with silicium nitride cantilevers.

The formation of inorganic particles in the embedded liposomes was followed by FTIR in attenuated total reflexion mode (ATR) mode. The experiments were performed with an Equinox 55 FTIR spectrometer (Bruker, Germany), using a liquid nitrogen-cooled MCT detector by summing 512 interferograms at a spectral resolution of 2 cm^{-1} .

In order to study the enzyme leakage out of the embedded liposomes, we used a near field optical scanning microscope (SNOM). We used a commercial modified SNOM scanning stage from Triple O implemented on an inverted microscope Axiovert 100 (Zeiss). The light source consisted in a diode from CrystaLaser ($\lambda = 532 \text{ nm}$). The fluorescent light originating from the rhodamine labelled enzyme is filtered with a dichroic mirror and a fluorescence filter ($\lambda > 590 \text{ nm}$). The resulting light is then focused on an avalanche photodiode APD from

Perkin-Elmer. The fibers used for the experiments are aperture type and made by a specific process (Haumann). The typical diameter of the aperture is 100 nm. The sample is placed on an x,y and z moving piezoelectrical crystal stage, the z distance control is made using a tuning fork as a shear force detector.

Buildup of the polyelectrolyte multilayers

For the ATR-FTIR experiments, the multilayer films were constructed in situ directly on a ZnSe crystal. Before the measurement, the crystal was cleaned with Hellmanex at 2 % (v/v) during 30 min, with ethanol and finally extensively rinsed with deionized water (Milli Q plus, Millipore, $\rho = 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$). It was then inserted in the spectrophotometer and put in contact with buffer B. In order to buildup the film, each polyelectrolyte solution was injected in the experimental cell by means of a peristaltic pump at a flow rate of $0.25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. In the case of the PGA-PAH multilayers, a contact time of 10 min between the solution and the surface was sufficient to reach a steady state adsorbed amount.⁴⁰ After the adsorption of a polyelectrolyte layer, the surface was put in contact with buffer B during 10 min in order to eliminate the non adsorbed polyelectrolyte. Hence, a PEI-(PGA-PAH)₂-PGA film was deposited onto the ZnSe crystal. The vesicles stabilized with a PDL layer and suspended in a buffer A solution and containing Ca²⁺, spermine and AP were deposited onto the PEI-(PGA-PAH)₂-PGA film. A contact time of 30 min was sufficient to reach a steady absorbance in the CH₂ stretching region ($2800\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$) of the infrared spectra. After the vesicle deposition, the surface was rinsed again with buffer A and subsequently with buffer B, before continuation of the alternate polyelectrolyte adsorption. Then, a spectrum of the whole architecture was acquired. This spectrum was used as reference to evaluate the further occurrence of inorganic particle growth. A 12 mM p-nitrophenyl phosphate (PNP) solution was finally put in contact with the obtained PEI-(PGA-PAH)₂-(PGA-covered liposomes)-(PGA-PAH)₂ film. 512 scans spectra were regularly acquired during 24 h between 900 and 1200 cm^{-1} , the spectral region corresponding to the absorbances due to the phosphates in calcium phosphates. The reference spectrum was then subtracted from all these spectra. The different spectra were then compared with the spectra of calcium phosphates.⁴¹

We used silicon wafers (Polylabo, Strasbourg, France) to deposit the polyelectrolyte multilayers with embedded vesicles for the AFM experiments. These wafers were cleaned with a 1:1 (v/v) CH₂Cl₂ : MeOH mixture and then with a 10 mM H₂SO₄ solution. They were then extensively rinsed with deionized water and dried under a nitrogen stream. The

adsorption time of the polyelectrolyte solutions and the rinsing steps in buffer B were all equal to 10 min. These adsorption and buffer rinse steps were realized by dipping the silicon wafer into the polyelectrolyte or buffer solutions. To adsorb the PDL protected liposomes on a silicon wafer already covered by a PEI-(PGA/PAH)₂-PGA multilayer some cautions were taken. Indeed one expects the presence of a lipid monolayer at the air/water interface of the vesicle solution. In order to avoid the deposition of a Langmuir-Blodgett film onto the multilayer during the dipping of the silicon wafers into the solution, we avoided direct exposure of the multilayer to the air/water interface. To this aim, the vesicle solution was injected in large excess into an aqueous solution (buffer A) in which the silicon wafer was again immersed. After 30 min of contact, the lipids in the solution at the air/water were eliminated by addition of a large excess of buffer A. We used a similar deposition and rinsing procedure for the deposition of the additional PGA and PAH layers. The wafer was withdrawn from the aqueous solution once the first PGA/PAH bilayer was deposited on top of the vesicle layer and the last PGA/PAH layer pair was then deposited by the dipping method previously described.

The wafer used for AFM and covered with a PEI-(PGA-PAH)₂-(PGA-PDL covered liposomes)-(PGA-PAH)₂ film was put in contact with a 12 mM of p-nitrophenol phosphate (PNP) during 24 h. Finally after 24 h of PNP diffusion in the films and through the lipidic bilayer, the surface was imaged by AFM. In order to observe the particles which are in the interior of the liposomes, the (PGA-PAH)₂ which covers the architecture as well as the lipidic envelope had to be removed. To this aim, a 0.1 M hypochlorite solution at pH 10 was put in contact with the wafer during 3 min. Such a chemical treatment has been shown to induce severe degradation of organic polyelectrolyte multilayers.⁴² The pH of this solution had to be high enough in order to avoid the dissolution of the calcium phosphates. After this treatment, the surface was again imaged by means of AFM.

For the SNOM experiments the same kinds of films were constructed on 12 mm glass slides (Polylabo France) that have been previously cleaned with Hellmanex (at 2 % v/v during 30 min.), with distilled water, 0.1 M. hydrochloric acid and final extensive rinse with distilled water.

Results and discussion

AFM imaging before addition of PNP

The PEI-(PGA-PAH)₂-PGA-(PDL covered liposomes)-(PGA-PAH)₂ film which was deposited on a silicon wafer was stored in buffer B during 1 day before imaging by AFM in air after intense water rinsing and drying with a nitrogen flow. The surface appears completely covered by vesicles in an almost compact monolayer (Figure 1). The spherical morphology of the liposomes is partly maintained and the diameters of the deposited particles lie between 250 to 400 nm. This is larger than their size obtained in solution by dynamic light scattering (220-350 nm). The increase in the observed size could be due to the deformation of the spherical vesicles consecutive to the presence of active species inside the liposomes which accentuate their deformation during the adsorption process. Even, the presence of further polyelectrolyte layers on the top of the vesicle could increase this deformation process. Nevertheless, it exists almost no morphological indication pointing toward vesicle fusion and/or rupture. Moreover, the embedded vesicles seem to be very "hard". Indeed; the maximum force could be applied with the AFM tip on the top of some vesicles without damaging the sample.

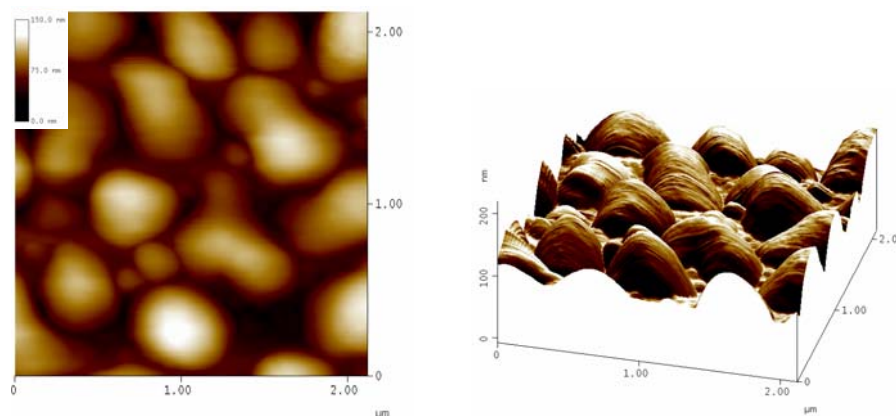


Figure 1. AFM images obtained in the tapping mode of a PEI-(PGA-PAH)₂-(PGA-covered liposomes)-(PGA-PAH)₂ film before its contact with PNP. The image on the left corresponds to the same image but in 3D.

Scanning near field optical microscopy

Although the absence of visible fusion and rupture of the embedded liposomes, it was important to verify their molecular integrity. To this aim, a PEI-(PGA-PAH)₂-PGA-(PDL covered liposomes)-(PGA-PAH)₂ film was built on a silicon wafer. Here, the liposome layer was composed of a mixture of liposomes containing rhodamine labeled AP and of liposomes with unlabeled AP. Each liposome type was filled with Ca²⁺ and spermine. The film was

imaged with a modified commercial SNOM scanning stage implemented on a inverted microscope both in the topographical and in fluorescence mode. The rhodamine label was excited at a wavelength of 532 nm and the fluorescence was collected at $\lambda > 590$ nm. The surface was imaged over a size of 2 μm by 2 μm , and the scan rate was 1 Hz. Two kinds of images were acquired, first a shear force topographical image of the surface covered with liposomes (Figure 2a) and a light transmitted fluorescence image (Figure 2b) Both image acquisitions were made in air. On the topographical image, well defined individual liposomes appear as also previously found with AFM. The analysis of the fluorescence signals clearly indicate a very localised distribution of them on the surface suggesting that labelling is connected to liposome localization and is most probably situated within or around the liposomes. However this second hypothesis is quite less probable because AP diffusion outside the vesicles would most probably lead to a homogeneous distribution of all the molecules at the surface due to surface diffusion of AP in the film. Moreover AP release would be accompanied also by the release of the smaller spermine molecules and calcium present inside the vesicles. As a consequence the observed nucleation process would not only occur inside the vesicles but be observed over the whole surface. Hence, strong evidences exist that the alkaline phosphatase remains in the interior of the vesicles after their embedding in the polyelectrolyte multilayer even after 8 days of storage in the buffer B solution.

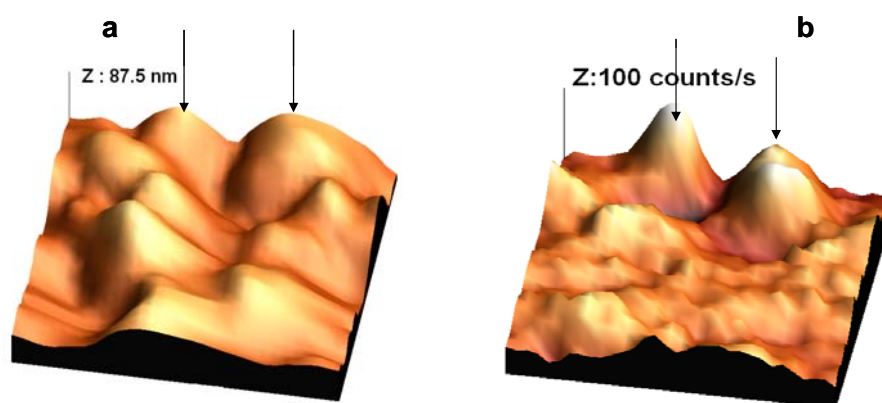


Figure 2. Images obtained by SNOM. The surface was imaged over a size of 2 μm by 2 μm .

Figure 2a corresponds to a shear force topographical image of the surface covered with liposomes. Figure 2b corresponds to a light transmitted fluorescence image. By comparing both images, the fluorescence signal appears well correlated with the topographical position of some of the liposomes showed before on shear force image. Hence one is able to distinguish between the labelled and the non labelled liposomes. The arrows showed where the labelled liposomes are located.

ATR-FTIR experiments

The main goal of this study was to prove that these embedded vesicles can act as sub-micronic reactors. In order to show this, we brought the films containing the vesicles in contact with PNP solutions and followed the evolution of the IR spectra. This allows to follow the formation of calcium phosphate crystals.

After 18 h of contact with PNP, the infrared spectra of the embedded liposomes (Figure 3) revealed the presence of several peaks characteristic of calcium phosphates in the 900-1200 cm^{-1} spectral region.⁴¹ The comparison of the spectra obtained in this study with the tabulated positions of the vibrational bands of calcium phosphates as well as with spectra carried with reference compounds⁴³, suggests that the particles contained in the embedded liposomes appears to be hydroxyapatite (HAP). The spectra reveal the presence of 3 peaks which correspond to the vibrational bands of phosphate groups present in HAP (Table 1). The presence of octacalcium phosphate can be excluded due to the absence of the characteristic peaks of this phase at 1120, 1103 and 1077 cm^{-1} .⁴¹ Similarly the presence of significant amounts of other calcium phosphates like dicalcium phosphate dihydrate could be excluded due to the absence of their characteristic peaks at 1134, 1052 and 994 cm^{-1} . Note however, that the infrared spectra of the inorganic particles were obtained in the presence of a mixture of different lipids and polyelectrolytes. This renders the analysis of the spectrum below 900 cm^{-1} difficult. Moreover, the crystal of ZnSe is not transparent below 700 cm^{-1} a spectral region which contains the characteristic peaks of calcium phosphates.⁴¹

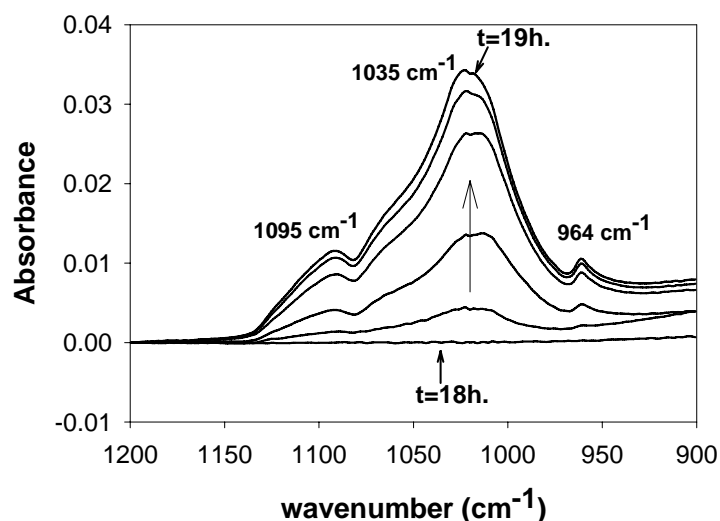


Figure 3 : Mineralization kinetics of inorganic particles within the embedded vesicles followed by ATR-FTIR spectroscopy. The PEI-(PGA-PAH)₂-(PGA-covered liposomes)-(PGA-PAH)₂ film was put in contact with the PNP during 20 hours. After 18h of contact between this film and the PNP solution, the particles start growing.

Measured peak (cm ⁻¹) Embedded Liposomes containing inorganic particles	Tabulated peak (cm ⁻¹)	Assignment to HAP* vibrational modes
964	962	Presence of HPO ₄ ²⁻ or non degenerated symmetric stretching mode, ν of the P-O bond of the phosphate group in HAP.
1035	1032	Triply degenerated asymmetric stretching mode of the P-O bond from the phosphate group
1095	1092	Characteristic peak of hydrogen phosphate group in HAP ^a containing HPO ₄ ²⁻

Table 1 : Assignment of the principal peaks observed in the 900-1200 cm⁻¹ region of the infra red spectra of the inorganic particles produced inside the embedded liposomes.

* : hydroxyapatite.

It is important to notice that the same experiment performed in the absence of spermine, did not lead to the formation of such inorganic particles even after 24 h. of reaction. This again suggests that spermine reacts as an activator either in the nucleation or in the particle growth process as indicated in our previous study.⁴³ Hence, we managed to build embedded reactors that induce growth of solid particles in the reactor container in the presence of an external substance (PNP) through an internal enzymatic activity. No particle formation was observed for reaction times shorter than 18h., This induction time is due to a progressive increase in the concentration of phosphate ions (which was equal to 0 at the beginning of the PNP circulation) and hence to a progressive increase of the saturation with respect to calcium phosphates. This suggests that limiting processes for nucleation are both PNP hydrolysis and PNP diffusion into the vesicles and that the lipidic barrier does not significantly interfere with nucleation.

AFM imaging after PNP addition

In a previous paper we showed that liposomes containing AP, spermine and Ca²⁺ constitute reactors able to produce calcium phosphate crystals after the addition of the amphiphilic PNP phosphate precursor outside of the volume enclosed by the liposomes.⁴³ It was also demonstrated that PNP is able to cross the liposome bilayer and subsequently to

react with the encapsulated AP, producing phosphate anions. The liposome used here contained Ca^{2+} , spermine and alkaline phosphatase. After 20 hours of contact between the PNP solution and the film with embedded and “active” vesicles, this time being selected from the results of the ATR-FTIR experiments, the surface was again imaged by AFM in air and by the tapping mode. The shapes observed are comparable to those observed before PNP addition. Indeed, the vesicles appear slightly deformed but no fusion and rupture were visible. The vesicle sizes range between 250 and 400 nm. As before, the maximum force was applied on the top of the filled liposome in order to open them and thus to observe the particles formed inside. Nevertheless, it was impossible to induce such damages and we had to find an alternative method. We decided to try to remove the PGA-PAH layers coating the liposomes layer as well as the lipidic membrane of the liposomes. To this aim we used a hypochlorite solution to dissolve the polyelectrolyte layers.⁴² However, considering that the presence of calcium phosphate salts inside the vesicles, we had to apply a careful treatment to avoid dissolution during the treatment with hypochlorite. An acidic solution is able to dissolve them rapidly which is not the case with a basic one. For this reason we used a hypochlorite solution with a pH adjusted to 11. This solution was then put in contact with the PEI-(PGA-PAH)₂-(PGA-covered liposomes)-(PGA-PAH)₂ film containing the inorganic particles. A contact time of 2-3 min. was sufficient to remove the (PGA-PAH)₂ layers which covered the liposome layer as well as the lipidic envelope. The surface was then again imaged by AFM in air and in the tapping mode (Figure 4). The AFM images clearly show the presence of particles which have a platelet like aspect. The largest dimension of these particles corresponds closely to the size of the vesicles, namely 200-400 nm. Moreover, the particles form close packings which clearly evoke the initial vesicle shape. This suggests that the inorganic particle growth has taken place only inside the vesicles. Indeed, some steps and edges are clearly visible which suggest that the obtained particles are of crystalline nature. In a previous paper we showed that such kind of platelets are also obtained in a solution containing calcium and phosphate ions (each at 6 mM.) and spermine at 10^{-4} M.⁴³ Under these conditions, the obtained platelets are however much larger than when they are formed in presence of the vesicles which shows the effective role of the vesicles by restricting the volume available for mineralization.

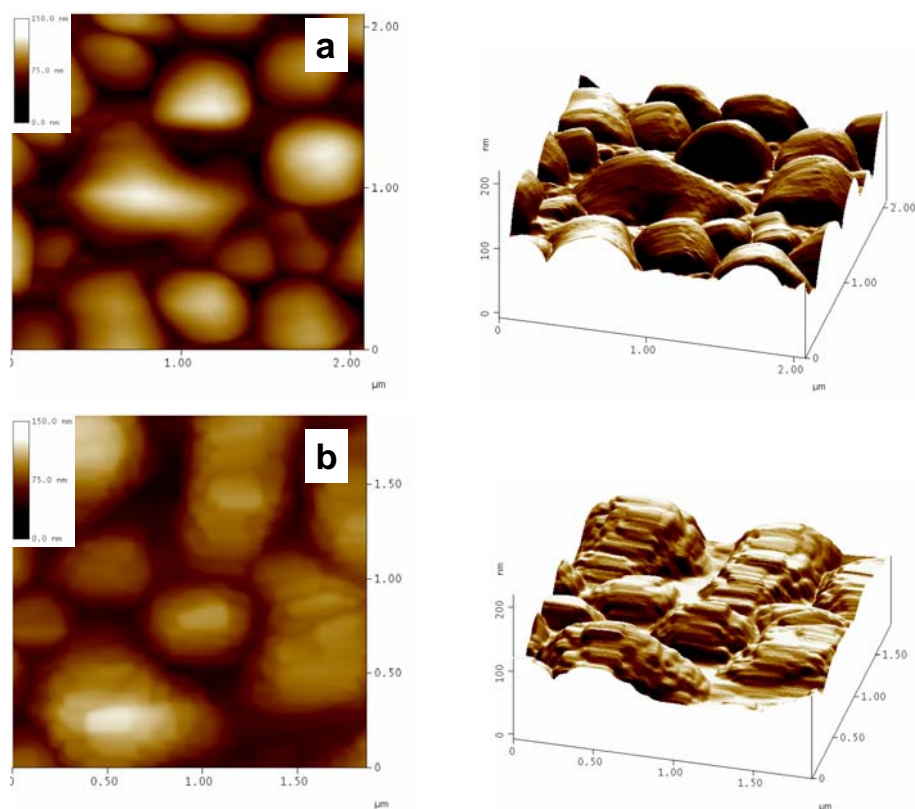


Figure 4. AFM images made by the tapping mode. a) corresponds to the PEI-(PGA-PAH)₂-(PGA-covered liposomes)-(PGA-PAH)₂ film which was put in contact with the PNP during 20 hours. b) the same film after treatment with a hypochlorite solution and thus after removing of the polyelectrolyte/lipid bilayer envelope.

The 3D images (on the left of a) and b)) correspond to the same images as a) and b) but in 3D.

In order to verify that the presence of particles on the surface was not an artefact resulting from the treatment with hypochlorite, the same experiment was performed with a PEI-(PGA-PAH)₂-(PGA-covered liposomes)-(PGA-PAH)₂ film which was not put in contact with a PNP solution. AFM experiments clearly showed that the hypochlorite treatment completely removed the PEI-(PGA-PAH)₂-(PGA-covered liposomes)-(PGA-PAH)₂ film and no residual particles were observed, as expected.

Conclusion

We showed in this paper the possibility to use stabilized liposomes, which contain active species, as submicronic reactors immobilized in a polyelectrolyte multilayered film. These reactors consisted of phospholipid vesicles containing Ca²⁺, spermine and alkaline phosphatase (AP). The reactors were embedded in PGA/PAH multilayers. When these films were brought in contact with paranitrophenyl phosphate (PNP), the formation of calcium

phosphate crystals, certainly hydroxyapatite was observed. The results from the diffusion of PNP first through the multilayer, second into the vesicles and third from the reaction of AP with PNP leading to the formation of phosphate ions. This study also shows that active vesicles can be embedded in polyelectrolyte multilayers without rupture and opens the route toward the engineering of different reactor multilayers with the goal to perform localized chemical reactions into confined layers.

References

1. Decher, G., Hong, J.D., *Macromol. Chem. Macromol. Symp.* **1991**, 46, 321.
2. Decher, G. *Science* **1997**, 277, 1232.
3. Bertrand, P., Jonas, A., Laschewsky, A., Legras, R. *Macromol. Rapid Comm.* **2000**, 21, 319.
4. Hammond, P.T. *Curr Opin. Colloid Interf. Sci.* 1999, 4, 430.
5. Radtchenko, I.L., Sukhorukov, G.B., Leporatti, S., Khomutov, G.B., Donath, E., Möhwald, H., *J. Colloid Interf. Sci.* **2000**, 230, 272.
6. Yoo, D., Shiratori, S.S., Rubner, M.F. *Macromolecules* **1998**, 31, 4309.
7. Shiratori, S.S., Rubner, M.F. *Macromolecules* **2000**, 33, 4213.
8. Schlenoff, J.B., Ly, H., Li, M. *J. Amer. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7626
9. Glinel, K., Moussa, A., Jonas, A.M., Laschewsky, A. *Langmuir* **2002**, 18, 1408-1412.
10. Klitzing, V.R., Wong, J.E., Jaeger, W., Steitz, R., *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.*, 2004, 9, 158
11. Schlenoff, J.B, Laurent, D., Ly, H., Stepp, *J. Chem. Eng. Technol* 1998, 9, 757-759.
12. Nolte, A.J., Rubner, M.F., Cohen, R.E. *Langmuir* 2004, **20**, 3304.
13. Fou, A.C., Onitsuka, O., Ferreira, M., Rubner, M.F., Hsieh, B.R. *J. Appl. Phys.* **1996**, 79, 7501.
14. Eckle, M., Decher, G. *Nano Lett.* **2001**, 1, 45.
15. Jessel, N., Atalar, F., Lavallo, P., Mutterer, J., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.-C., Ogier, J., *Adv. Mater.* **2003**, 15, 692-695.
16. Benkirane-Jessel, N., Schwinte, P., Falvey, P., Darcy, R., Haïkel, Y., Schaaf, P., Voegel, J.C., Ogier, J. *Adv. Funct. Mater.* **2004**, 14, 174.
17. Chluba, J., Voegel, J.C., Decher, G., Erbacher, P., Schaaf, P., Ogier, J. *Biomacromolecules* **2001**, 2, 800.
18. Serizawa, T., Yamaguchi, M., Matsuyama, T., Akashi, M. *Biomacromolecules* **2000**, 1, 306.

19. Mendelsohn, J.D., Yang, S.Y., Hiller, J., Hochbaum, A.I., Rubner, M.F. *Biomacromolecules* **2003**, 4, 96.
20. Thierry, B., Winnik, F.M., Merhi, Y., Silver, J., Tabrizian, M. *Biomacromolecules* **2003**, 4, 1564-1571.
21. Krasemann, L., Toutianoush, A., Tieke, B. *J Membr. Sci.* **2001**, 181, 221.
22. Zhai, L., Cebeci, F.C., Cohen, R.E., Rubner, M.F. , *Nano Lett.* 2004, 4, 1349.
23. Farhat, T.R., Schlenoff, J.B. *Electrochem & Solid State Lett.* 2002, 5, B13.
24. Lvov, Y., Ariga, K., Ichinose, I., Kunitake, T., *J. Amer. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6117.
25. Derbal, L., Lesot, H., Voegel, J.C., Ball, V. *Biomacromolecules* **2003**, 4, 1255-1263.
26. Salloum, D.S., Schlenoff, J.B. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1089-1096.
27. He, P., Hu, N. *J. Phys. Chem. B* **2004**, 13144-13152.
28. Lvov, Y., Decher, G., Sukhorukov, G.B. *Macromolecules* **1993**, 26, 5396-5399.
29. Sukhorukov, G.B., Montrel, M.M., Petrov, A.I., Shabarchina, L.I., Sukhorukov, B.I., *Biosensors & Bioelectronics* **1996**, 9, 913-922.
30. Pei, R., Cui, X., Yang, X., Wang, E. *Biomacromolecules* **2001**, 2, 463-468.
31. Kotov, N.A., Dekany, I., Fendler, J.H. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 13065.
32. Caruso, F., Lichtenfeld, H., Giersig, M., Möhwald, H., *J. Amer. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8523.
33. Bangham, A. D., M. M. Standish, et al. *J. Mol. Biol.* **1965**, 13, 238.
34. Reimhult, E., Höök, F., Kasemo, B. *Langmuir* **2003**, 19, 1681.
35. Michel, M., Vautier, D., Voegel, J.C., Schaaf, P., Ball, V. *Langmuir* **2004**, 20, 4835.
36. Schlenoff, J.B., Dubas, S.T., Farhat, T.R. *Langmuir* **2000**, 16, 9968.
37. Izquierdo, A., Ono, S.S., Voegel, J.-C., Schaaf, P., Decher, G. *Langmuir* **2005**, 21, 7558-7567.
38. Michel, M., Izquierdo, A., Decher, G., Voegel, J.-C., P. Schaaf, P., Ball, V., *Langmuir* **2005**, 21, 7854.
39. Hermanson, G.T. (1996) "Bioconjugate Techniques", Academic Press, pages 303-305.
40. Boulmedais, F., Ball, V., Schwinte, P., Frisch, B., Schaaf, P., Voegel, J.C. *Langmuir* **2003**, 19, 440.
41. Koutsopoulos, S. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 62, 600.

42. Moya, S., Dähne, L., Voigt, A., Leporatti, S., Donath, E., Möhwald, H., *Colloids & Surf. A.* **2001**, 183-185, 27.
43. Michel, M., Winterhalter, M., Darbois, L., Hemmerle, J., Voegel, J.-C., Schaaf, P., Ball, V. *Langmuir* **2004**, 20, 6127.

Conclusion Générale

Le but de ce travail a été de développer une méthode permettant de stabiliser, d'adsorber puis d'enfouir des liposomes sur et dans un film multicouche de polyélectrolytes. Ces vésicules lipidiques unilamellaires enfouies au sein d'un film multicouche devraient constituer un système de réservoirs immobilisés, contenant des molécules actives (par exemple des médicaments tels que des anti-inflammatoires) et capables de libérer leur contenu de façon lente et progressive. De plus il est également possible d'utiliser ces compartiments immobilisés en tant que réacteurs.

Nous avons démontré, dans la première partie de ce travail, qu'il est possible de créer des microréacteurs en solution à partir de liposomes géants (de quelques microns de diamètre). Ces vésicules géantes unilamellaires contenaient de la phosphatase alcaline de la spermine et des ions calcium dans leur compartiment aqueux interne. Ceci a permis la précipitation de phosphates de calcium via une réaction d'hydrolyse d'un ester de phosphate amphiphile, le paranitrophényl phosphate. Ce dernier est capable de diffuser à travers la bicouche lipidique. Après diffusion du paranitrophényl phosphate à travers la bicouche, son hydrolyse en paranitrophénol et en ions phosphate est catalysée au contact de l'enzyme encapsulée. Les ions phosphate produits lors de l'hydrolyse enzymatique ont interagi avec la spermine et les ions calcium déjà présents dans les liposomes, donnant lieu à la précipitation de particules inorganiques. Ces dernières ont été caractérisées, à la fois par microscopie optique, par spectroscopie infrarouge, par microscopie électronique à balayage et par diffraction des électrons. Compte tenu des résultats obtenus, il apparaît que les particules inorganiques sont fort probablement constituées d'hydroxyapatites faiblement cristallines. De plus, la taille moyenne des particules obtenues est compatible avec la distribution de diamètre des vésicules au sein desquelles la synthèse a eu lieu.

La partie suivante a été consacrée à optimiser une méthode permettant la stabilisation de liposomes unilamellaires de grande taille (de quelques centaines de nanomètres de diamètre) dans le but de les adsorber puis de les enfouir sur et dans un film multicouche de polyélectrolytes. Un grand nombre de travaux de la littérature récente ont montré que selon la nature de la surface, de la composition lipidique des vésicules et des propriétés physicochimiques de la solution aqueuse (température, force ionique), les vésicules lipidiques subissaient des déformations importantes lorsqu'elles sont mises au contact d'une surface solide conduisant le plus souvent à leur rupture. Ainsi, nous avons également démontré que

des vésicules lipidiques constituées d'un mélange de phosphatidylcholine (un phospholipide neutre), de phosphatidylglycérol (un phospholipide chargé négativement dans les conditions de pH de l'expérience) et de cholestérol subissaient des déformations importantes, des ruptures et des coalescences avec des vésicules voisines lors de leur adsorption sur un film de polyélectrolytes de type PEI-(PGA/PAH)₂. Il a donc fallu trouver un moyen de stabiliser et de rigidifier ces vésicules afin d'atteindre l'objectif que nous nous étions fixés. La stratégie de stabilisation des vésicules a été inspirée par les travaux du groupe du professeur Helmut Möhwald. Il a ainsi été démontré que des vésicules lipidiques chargées et recouvertes par l'adsorption d'une monocouche de polyélectrolytes restaient intactes, lors de la mise en contact avec un détergent alors qu'en l'absence de monocouche de polyélectrolyte ces vésicules conduisent à des micelles mixtes. La monocouche de polyélectrolytes adsorbée à la surface des vésicules semble augmenter le module de rigidité de la membrane. Inspirés par ces résultats, nous avons adsorbé une monocouche de poly-D-lysine de masse moléculaire relativement faible, sur la surface des vésicules. Des chaînes polycationiques relativement courtes (d'un degré de polymérisation moyen proche de 10 et de 100) ont été utilisées afin de réduire la probabilité de pontage inter-vésiculaire. Après l'optimisation des conditions expérimentales (force ionique de la solution aqueuse, concentration de vésicules), il a été démontré par microscopie à force atomique que les vésicules modifiées conservent leur forme après leur adsorption puis leur enfouissement dans un film de type PEI-(PGA/PAH)_n. De plus, la taille moyenne des vésicules est à peine augmentée lors de l'enfouissement. La cinétique de dépôt des vésicules modifiées sur un film multicouche PEI-(PGA-PAH)₂-PGA a été suivie par microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation. Le signal obtenu correspondait au dépôt de vésicules intactes sans rupture induite par l'adsorption (d'après les critères définis dans le groupe du professeur Bengt Kasemo).

Nous avons donc démontré que notre méthode de stabilisation était efficace et permettait l'adsorption puis l'enfouissement des liposomes sur et dans un film multicouche de polyélectrolytes sans les déformer de façon notable.

Dans la partie suivante de notre étude, nous avons étudié l'intégrité moléculaire des vésicules incorporées au sein des films multicouches de type PEI-(PGA-PAH)_n. Pour cela, du ferrocyanure de potassium a été encapsulé au sein des liposomes. Le film multicouche de polyélectrolytes ainsi que la couche de liposomes ont ensuite été déposés sur une électrode d'or par pulvérisation couche par couche. Cette nouvelle méthode de nébulisation, optimisée au sein de notre laboratoire, permet de réduire la durée de préparation du film multicouche de

façon significative. Ceci représente un avantage certain dans la mesure où nous voulions étudier la cinétique de libération des espèces électroactives encapsulées dans nos vésicules. La cinétique de libération du ferrocyanure dans le film PEI-(PGA-PAH)₂-PGA-vésicules stabilisées-PGA-(PAH-PGA)₂ a été alors suivie par voltampérométrie cyclique. L'évolution temporelle des courants d'oxydation et de réduction des ions ferrocyanure a révélé que ces ions sont libérés des vésicules de manière lente et progressive. Ceci montre que ces ions chargés et hydrophobes peuvent être libérés hors des réservoirs lipidiques enfouis dans le film de polyélectrolytes. Si cette libération était due à l'apparition de pores dans les vésicules, les courants mesurés auraient augmentés de façon discontinue par "sauts". Il a également été démontré dans ce travail qu'il est possible de déposer deux "couches" de liposomes séparées par un film de polyélectrolytes. Les mesures électrochimiques effectuées sur ce dernier système ont révélé que l'intégrité des liposomes n'était pas affectée par l'ajout d'une couche supplémentaire de liposomes dans l'édifice. Nous avons donc mis au point un système de réservoirs immobilisés de quelques centaines de nanomètres de diamètre. Ces différentes couches de réservoirs pourront contenir des médicaments de nature différente dans des applications à venir, des anticancéreux et des anti-inflammatoires par exemple.

Le dernier travail effectué au cours de cette thèse a consisté à utiliser les films de polyélectrolytes fonctionnalisés avec des liposomes en tant que réacteurs immobilisés. Pour atteindre ce but, nous avons utilisé tous les concepts et méthodologies développées au cours des études précédentes. Nous avons donc encapsulé de la phosphatase alcaline, du calcium et de la spermine dans les liposomes unilamellaires de grande taille (comme dans la première partie de ce travail) avant de les stabiliser et de les enfouir dans un film multicouche à base de PGA et de PAH (comme dans la seconde partie). Nous voulions vérifier que les espèces encapsulées restaient localisées au sein des vésicules enfouies au moins pendant le temps correspondant à la réaction de précipitation (tout comme dans la troisième partie de ce travail). Pour cela nous avons effectué des expériences consistant à détecter la phosphatase alcaline rendue fluorescente par une technique de microscopie en champ proche couplée à de la microscopie de fluorescence (SNOM). Nous avons ainsi démontré que la phosphatase alcaline encapsulée n'est pas libérée des vésicules lipidiques après leur enfouissement. Contrairement à l'étude précédente, qui a montré que les espèces électroactives étaient libérées de façon progressive, nous avons un exemple de système pour lequel les vésicules enfouies dans le film multicouche ne libèrent pas leur contenu (au moins au bout de quelques jours). Cela était toutefois prévisible vu la grande dimension, plusieurs nanomètres de rayon

hydrodynamique, de l'enzyme. Après avoir vérifié l'absence de libération de l'enzyme, nous avons utilisé ces films, contenant des liposomes avec des espèces encapsulées, en tant que réacteurs. Pour cela le film a été mis au contact d'une solution de paranitrophényl phosphate qui, comme nous l'avons démontré dans la première partie de cette thèse, est capable de diffuser à travers la membrane lipidique. Des études plus anciennes effectuées dans notre équipe ont montré que ces molécules diffusaient également à travers les films de polyélectrolytes. La cinétique de croissance des phosphates de calcium a été suivie *in situ* par spectroscopie infrarouge en mode réflexions totales atténuées. Cette méthode de caractérisation nous a permis de mettre en évidence la présence de phosphates de calcium au sein des films multicouches. Une comparaison des spectres infrarouge obtenus avec des spectres de référence pour des phosphates de calcium indique que les particules formées sont probablement constituées d'hydroxyapatite. La microscopie à force atomique de l'édifice multicouche après la réaction de précipitation a montré que les particules obtenues étaient localisées principalement au niveau des liposomes. Cela semble indiquer que la minéralisation s'est effectuée au sein même des liposomes enfouis.

En définitive, ce travail de thèse nous a permis de mettre au point une méthode de stabilisation des liposomes qui sont utilisés afin de fonctionnaliser des films multicouches de polyélectrolytes. Nous avons montré que ces systèmes hybrides multicouches-liposomes stabilisés pouvaient être employés afin de créer des réservoirs ainsi que des réacteurs. Ce travail peut donc constituer le point de départ vers la mise au point de nouveaux types de matériaux à fonctionnalités multiples. Cependant, un grand nombre de travaux devront être menés à bien afin d'optimiser notre système. Dans un premier temps il serait important de conférer des propriétés de biocompatibilité à nos films, cela pour des raisons évidentes d'utilisations biologiques ultérieures. En effet, la poly(allylamine) utilisée au cours de cette étude n'est pas dégradée par les enzymes protéolytiques présentes au sein d'un sérum physiologique. Des essais avec d'autres polyélectrolytes totalement hydrolysables ont déjà été envisagés, avec des films (PGA-PLL)_n par exemple. Malheureusement, les expériences effectuées ont révélé que les vésicules subissaient des déformations importantes menant généralement à leur rupture. A l'heure actuelle, et par manque de temps, aucune explication convaincante n'a été émise. C'est pourquoi il serait nécessaire de procéder à des études plus poussées afin de comprendre le mécanisme de rupture des vésicules stabilisées en fonction de la nature des polyélectrolytes utilisés pour réaliser l'enfouissement des liposomes. Nous envisageons également d'étudier le rôle exercé par la poly-D-lysine dans la stabilisation des

liposomes (par des mesures de force en AFM ou encore par des expériences d'aspiration par micropipette). Ces mesures permettraient de déterminer l'augmentation du module de rigidité des liposomes engendré par l'adsorption d'une monocouche de polyelectrolyte.

D'autre part, nous pourrions utiliser d'autres types de lipides afin de préparer nos vésicules. Il serait intéressant de travailler avec des lipides dont la température de transition de phase est plus élevée que celle des lipides avec lesquelles nous avons travaillé. Dans notre cas, toutes nos études ont été menées à température ambiante (environ 20-25°C), température à laquelle la membrane lipidique utilisée est à l'état fluide.

Une fois le système optimisé, nous pourrions envisager une myriade d'utilisations de nos films contenant des liposomes stabilisés. La situation idéale serait de pouvoir enfouir des réservoirs totalement imperméables aux réactifs considérés et de provoquer leur libération par applications de perturbations extérieures. Nous aurions ainsi un contrôle absolu de la cinétique de libération des substances encapsulées. Nous pourrions envisager de réaliser des réacteurs chimiques enfouis au sein des multicouches de polyelectrolytes avec deux familles de vésicules contenant chacune un réactif capable de réagir avec le réactif contenu dans l'autre type de vésicule. Si les deux réactifs diffusent progressivement en dehors de chaque compartiment vésiculaire, ou de façon contrôlée sous l'effet d'une perturbation (de nature électrique, thermique ou mécanique), la réaction chimique envisagée se fera progressivement.

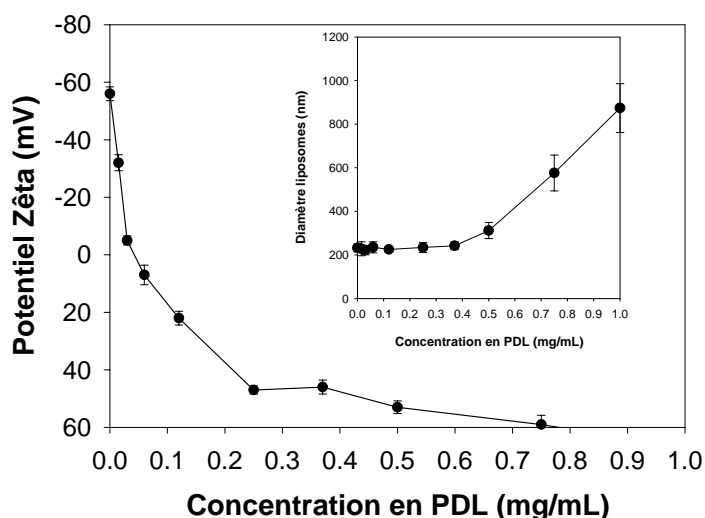
Par exemple, un film de multicouche contenant des liposomes, pourrait être soumis à une traction mécanique générant des pores transitoires au niveau de la membrane lipidique, offrant ainsi la possibilité aux molécules encapsulées d'être libérées. D'autre part, l'insertion dans la membrane lipidique de canaux protéiques, comme des ATPases), dont l'ouverture du canal est commandée par l'ajout d'ATP peut être envisagée

Nous avons également réfléchi au type de molécules à encapsuler dans les vésicules lipidiques. Tout naturellement nous avons pensé à des molécules à applications thérapeutiques et plus spécifiquement celles appartenant à la classe des anticancéreux. A titre d'exemple nous pouvons citer les plus connues : le taxol et la doxorubicine, mais également une molécule qui semble très prometteuse et qui a déjà prouvé son efficacité dans les tests pré-cliniques : l'ophioboline.

Annexes

Mesures du potentiel zêta et de la diffusion dynamique de la lumière effectuées sur des solutions liposomes chargés/polyélectrolyte

Des mesures potentiels zêta et de diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont été effectuées sur des solutions contenant des liposomes de (200-300 nm de diamètre) chargés négativement. De la poly(D-lysine) a été ajoutée à un volume donné de cette solution de liposomes de façon à obtenir différentes concentrations en polyélectrolyte pour une concentration lipidique fixée. Le but de ces expériences est de déterminer la concentration en PDL idéale à partir de laquelle il y a inversion du signe du potentiel zêta sans pour autant engendrer l'agrégation des vésicules.



Mesures de l'évolution du potentiel zêta et du diamètre hydrodynamique (en insert) effectuées sur des solutions contenant des liposomes de (200-300 nm de diamètre) chargés négativement et de la poly(D-lysine) à différentes concentrations en polyélectrolyte. Les concentrations figurant en abscisse correspondent à la concentration totale en PDL dans la solution de liposomes.

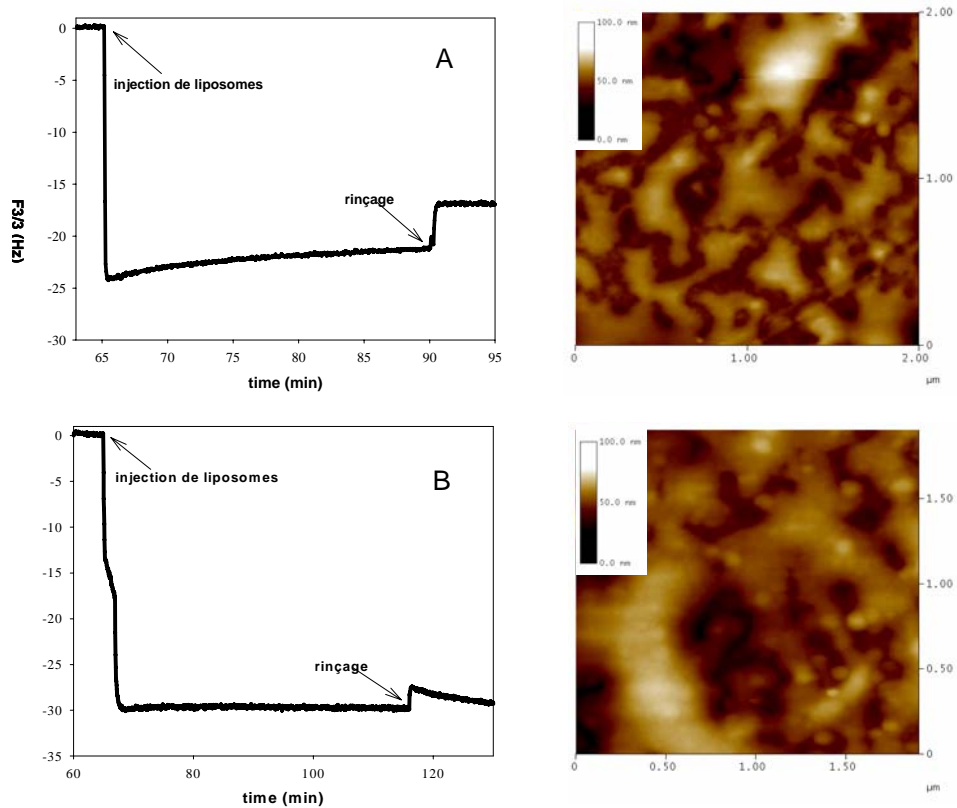
Les mesures de potentiels zêta en fonction de la concentration en polyélectrolyte montrent que le point isoélectrique est atteint à des concentrations en PDL proche de $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A partir de cette valeur de concentration, le potentiel zêta s'inverse. Cependant, lorsque la concentration en PDL dépasse $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, les liposomes s'agrègent. Cette agrégation provient vraisemblablement d'un pontage inter-vesiculaire induit par les chaînes de polyélectrolyte.

Influence du taux de cholestérol sur la stabilité des vésicules enfouies

Lors de nos études nous avons tenté de déterminer la quantité idéale de cholestérol à insérer dans la membrane lipidique des liposomes afin de les rigidifier au maximum et d'éviter ainsi leur éclatement lors de leur adsorption à l'interface solide-liquide. Ainsi, des liposomes composés d'un mélange de POPC, de POPG et de différentes concentrations de cholestérol ont été préparés. Ces liposomes ont ensuite été enrobés d'une couche de PDL, déposés sur un film PEI-(PGA-PAH)₂-PGA puis ont été recouverts d'une couche de (PGA-PAH)₂. Les cinétiques d'adsorption des liposomes sur PEI-(PGA-PAH)₂-PGA a été suivie par QCM-D et les films PEI-(PGA-PAH)₂-(PGA-liposomes stabilisés)-(PGA-PAH)₂ ont été imagés par AFM.

Les expériences de QCM-D montrent que la déposition des liposomes sur le film PEI-(PGA-PAH)₂-PGA engendre le même changement de la fréquence de résonance du cristal et cela quelque soit la concentration en cholestérol dans la membrane. Le temps nécessaire afin d'atteindre un état stationnaire du changement de fréquence est dans les trois cas assez rapide. Cela est compatible avec les expériences faites dans le cas des liposomes contenant 5 % en masse de cholestérol et enrobés de PDL. Cependant, il semble que la phase de rinçage engendre la rupture des vésicules. Le profil de la cinétique d'adsorption-rinçage semble être identique à celui obtenu avec des liposomes contenant 5 % en masse de cholestérol non stabilisés par de la PDL. Les images AFM montrent que, pour des concentrations en cholestérol supérieures à 10 %, les liposomes se rompent. De plus, il semble que le phénomène de fusion entre les liposomes est accentué lorsque la concentration en cholestérol augmente.

Ces expériences mettent en avant le fait que plus la concentration en cholestérol dans la membrane lipidique augmente et plus les liposomes fusionnent et se rompent (cela même en présence d'une couche de PDL).



Expériences de QCM-D et d'AFM en mode tapping effectuées sur des films PEI-(PGA-PAH)₂-(PGA-liposomes stabilisés)-(PGA-PAH)₂ contenant des liposomes dont les membranes lipidiques contiennent A) POPC 85 %, POPG 5 %, cholestérol 10 % ; B) POPC 75 %, POPG 5 %, cholestérol 20 %. Les pourcentages des différents lipides correspondent à des pourcentages en masse.

Enfouissement de liposomes stabilisés dans un film multicouche (PGA-PLL)_n

Dans cette partie nous avons tenté d'enfouir des liposomes stabilisés par une couche de PDL dans un film multicouche contenant un polycation autre que le PAH mais en gardant l'acide poly-L-glutamique en guise de cation. Aussi, nous avons construit l'architecture suivante : PEI-(PGA-PLL)₂-(PGA-liposomes stabilisés par la PDL)-(PGA-PLL)₂ (avec PGA et PLL dont les masses moléculaires moyennes sont respectivement 17 000 et 574 500 g. mol⁻¹).

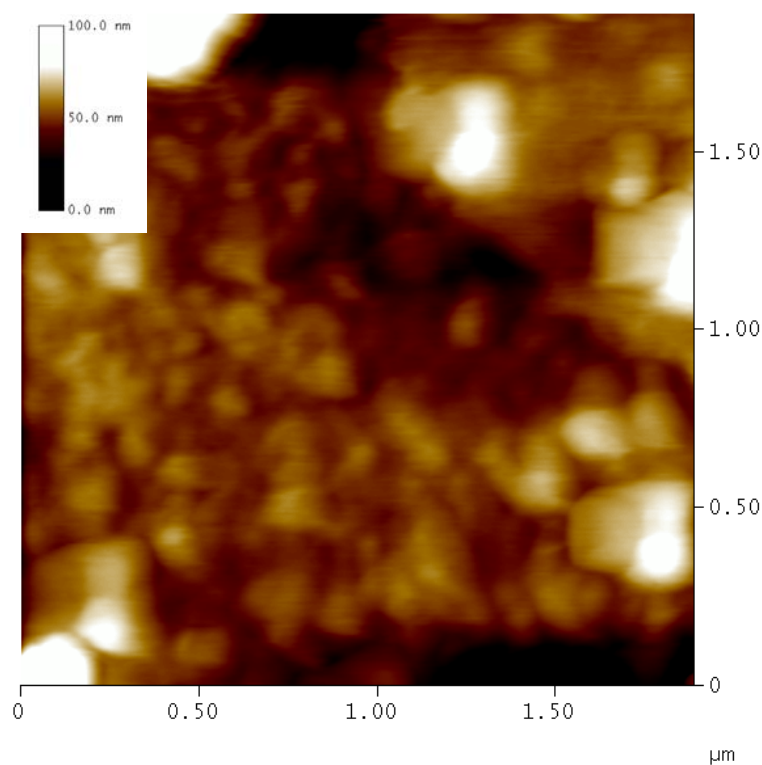


Image AFM obtenue en mode tapping et à l'air pour un film PEI-(PGA-PLL)₂-(PGA-liposomes stabilisés par la PDL)-(PGA-PLL)₂.

L'image topographique en AFM montre clairement que les liposomes, pourtant stabilisés par une couche de PDL, se rompent. La surface ne semble pas contenir un seul liposome intact. Pour l'instant aucune explication n'est avancée. Aussi, d'autres études doivent être menées afin de comprendre ce phénomène.

Fonctionnalisation de films multicouches de polyélectrolytes avec des liposomes enfouis : création de réacteurs immobilisés.

Le but de ce travail a été de développer une méthode permettant de stabiliser, d'adsorber puis d'enfouir des liposomes, de quelques centaines de nanomètres, sur et dans un film multicouche de polyélectrolytes, permettant ainsi de créer non seulement des réservoirs, mais également des réacteurs immobilisés. La stratégie de stabilisation a consisté à adsorber une monocouche de polyélectrolyte à la surface des liposomes ce qui avait pour effet d'augmenter le module de rigidité de la membrane. Après l'optimisation des conditions expérimentales, il a été démontré par diverses techniques que les vésicules modifiées conservent leur forme après leur adsorption, puis leur enfouissement sur et dans un film multicouche de polyélectrolytes. Afin d'étudier l'intégrité moléculaire des vésicules stabilisés ensuite incorporées au sein des films multicouches, des espèces électroactives ont été encapsulées au sein des liposomes et la cinétique de libération de ces espèces dans le film a été suivie par une technique électrochimique. Cette dernière a révélé que ces espèces sont libérées des vésicules de manière lente et progressive ce qui constitue un système de réservoirs immobilisés. Le dernier travail effectué a consisté à utiliser notre système en tant que réacteur immobilisé. Pour atteindre ce but, une enzyme, du calcium et un agent de nucléation ont été encapsulés dans les liposomes avant de les enfouir dans un film multicouche de polyélectrolytes. Après avoir vérifié l'absence de libération de l'enzyme, le film a été mis au contact d'une solution d'ester de phosphates qui est capable de diffuser à travers le film multicouche et à travers la membrane lipidique avant d'interagir avec les espèces encapsulées donnant lieu à la précipitation de particules de phosphate de calcium. Les particules obtenues étaient localisées principalement au niveau des liposomes indiquant que la minéralisation s'est principalement effectuée au sein des liposomes enfouis.

Fonctionnalization of polyelectrolyte multilayered films with embedded liposomes : creation of immobilized reactors.

The aim of this work was to stabilize, to adsorb and to embed liposomes onto and into a polyelectrolyte multilayered film in order to create not only reservoirs but also immobilized reactors. The method of stabilization consisted in the adsorption of a polyelectrolyte monolayer onto liposomes which leads to an increase of the rigidity modulus of the lipid membrane. After optimization of the experimental conditions, it has been shown with different techniques that modified liposomes keep their shapes after their adsorption and their embedding onto and into a polyelectrolyte multilayered film. In order to verify the molecular integrity of the embedded liposomes, electroactive species were encapsulated in the vesicles and the kinetic of leakage was followed by electrochemistry. This technique showed that the release of these electroactive species is slow and progressive. This work also showed that such film can be used as immobilized reservoirs. The last part of this thesis consisted to use our system as immobilized reactors. To this aim, an enzyme, calcium ions and a nucleation activator were encapsulated in liposomes before being embedded in a polyelectrolyte multilayered film. After having verified the absence of enzyme leakage, the film was put in contact with a phosphate ester solution. This molecule is able to diffuse not only through the polyelectrolyte layers but also through the lipid membrane before reacting with the encapsulated species. This reaction leads to the precipitation of calcium phosphate particles. Moreover, the particles form close packages which clearly evoke the initial vesicle shape. This suggests that the inorganic particle growth has taken place only inside the vesicles.