



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Institut Charles Sadron (UPR CNRS n° 22)

THÈSE

présentée par

Phuc Nghia NGUYEN

Soutenue le 18 avril 2013

pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Strasbourg

Influence de Composés Perfluoroalkylés sur des Films Minces de Phospholipides à une Interface Gaz/Eau

Thèse dirigée par

KRAFFT Marie Pierre

Directrice de recherche au CNRS
Université de Strasbourg

VANDAMME Thierry

Professeur, Université de Strasbourg

Rapporteurs

GERARDIN Christine

Professeur, Université de Lorraine

TSAPIS Nicolas

Chargé de recherche au CNRS

Université de Paris Sud

Examineurs

MARKVICHEVA Elena

Professeur, Institute Bioorganic Chemistry
Shemyakin-Ovchinnikov, RAS

GALLANI Jean-Louis

Directeur de recherche au CNRS
Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à remercier Mme Marie Pierre Krafft, Directrice de recherche au CNRS, et M Thierry Vandamme, Professeur de l'Université de Strasbourg, pour m'avoir proposé cette thèse et pour l'avoir dirigée. Merci de tout mon cœur pour leurs conseils, leurs discussions et leur soutien durant ces quatre années.

Un grand merci à M Gilles Waton, Chargé de recherche au CNRS, qui, par son expérience et son enthousiasme, m'a beaucoup appris et m'a donné des idées précieuses tout au long de cette thèse.

Je tiens à remercier Mme Christine Gerardin, Professeur de l'Université de Lorraine, Mme Elena Markvicheva, Professeur à l'Institut de chimie bio-organique Shemyakin-Ovchinnikov de Moscou, M Nicolas Tsapis, Chargé de recherche à l'Université de Paris-Sud et M Jean-Louis Gallani, Directeur de recherche à Université de Strasbourg, pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de mon jury de thèse.

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe SOFFT à l'Institut Charles Sadron (ICS) de Strasbourg. Je remercie Jean-Michel Guenet et Jean-François Legrand, directeur et ancien directeur de l'ICS pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire, et pour m'avoir permis de profiter d'excellentes conditions de travail. J'adresse aussi mes remerciements à tous les membres de l'équipe SOFFT. Je souhaite néanmoins remercier plus particulièrement Nicole Benoît pour m'avoir aidé à relire la thèse et pour sa disponibilité durant les années passées dans l'équipe. Je remercie tous mes collègues de l'ICS, en particulier, ceux qui m'ont aidé lors de ce travail de thèse. Je tiens à remercier Julie Quillé pour les expériences de diffusion de lumière, Marc Schmutz pour celles de microscopie électronique à transmission et Catherine Saettel pour celles de calorimétrie.

Mes remerciements vont également à mes collègues de l'IPCMS, Geneviève Pourroy, Lai Truong Phuoc et Julien Jouhannaud pour la synthèse des nanoparticules magnétiques.

Enfin, je voudrais adresser mes remerciement à ma famille, pour tout le soutien moral et les encouragements qu'ils m'ont apportés malgré la distance. Merci à mon épouse Thai pour avoir toujours été là, à côté de moi, et m'avoir aidé à passer les moments les plus difficiles. Sans elle, je n'aurais pas pu aller jusqu'au bout de la thèse.

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I : Monocouches de tensioactifs à une interface courbe ou plane	7
I.1. Adsorption de tensioactifs à la paroi d'une bulle	8
I.1.1. Généralités sur la tension interfaciale	8
I.1.2. Tension interfaciale d'équilibre	9
I.1.3. Isotherme d'adsorption à l'équilibre	11
I.1.3.1. Isotherme de Henry	11
I.1.3.2. Isotherme de Langmuir	11
I.1.3.3. Isotherme de Frumkin	12
I.1.4. Tension interfaciale dynamique	13
I.1.5. Calcul des paramètres de la tension interfaciale dynamique	14
I.1.5.1. Le modèle de diffusion	14
I.1.5.2. Le modèle de diffusion-cinétique	14
I.1.6. Perturbation d'une monocouche à l'équilibre. Cas des faibles perturbations	15
I.2. Microbulles à paroi de tensioactifs	17
I.2.1. Stratégies de stabilisation des microbulles	17
I.2.1.1. Composition de la paroi	17
I.2.1.2. Composition de la phase gazeuse interne	18
I.2.2. Mécanisme de dissolution des microbulles	19
I.2.2.1. Microbulles d'air	19
I.2.2.2. Microbulles stabilisées par un fluorocarbure	20
I.2.2.3. Microbulles d'air stabilisées par un film de tensioactif	21
I.2.3. Microbulles dans un champ ultrasonore	22
I.3. Les monocouches de phospholipides comme modèle simplifié du surfactant pulmonaire	24
I.3.1. Surfactants pulmonaires	24
I.3.1.1. Composition du surfactant pulmonaire natif	24
I.3.1.2. Rôle du surfactant pulmonaire	25
I.3.1.3. Déficience en surfactant pulmonaire	26
I.3.2. Propriétés spécifiques des perfluorocarbures	28
I.3.2.1. Caractéristiques physico-chimiques	28
I.3.2.2. Les tensioactifs fluorés	29
I.3.2.3. Biocompatibilité des fluorocarbures	29

I.3.3. Fluorocarbures en thérapie pulmonaire	31
I.3.3.1. Effets des fluorocarbures sur la respiration	31
I.3.3.2. Effets anti-inflammatoires	32
I.3.3.3. Effets sur la croissance pulmonaire	32
I.3.4. Effets des fluorocarbures sur les monocouches de phospholipides	32
I.3.5. La monocouche de Gibbs : un modèle simplifié de surfactant pulmonaire	33
Chapitre II : Méthodes expérimentales	35
II.1. Mesure de la tension interfaciale par analyse du profil de la bulle	36
II.1.1. Généralités	36
II.1.1.1. Méthode de mesure de la force de mouillage	36
II.1.1.2. Méthode de mesure de la forme de la goutte	36
II.1.2. Principe de la méthode	37
II.1.3. Tensiomètre Tracker	38
II.2. Mesure de la tension interfaciale sous oscillations	39
II.3. Protocole d'étude de l'interface air saturé en fluorocarbure/eau	40
II.4. Détermination de la taille des microbulles	40
II.4.1. Mesure acoustique de la taille de microbulles en dispersion aqueuse	40
II.4.2. Diffusion statique de la lumière	42
II.4.3. Microscopie optique	42
Chapitre III : Résultats sur l'adsorption des phospholipides et/ou des fluorocarbures à l'interface air/eau	43
III.1. Adsorption d'hydrocarbures et de fluorocarbures en phase gaz	44
III.1.1. Etat de l'art	44
III.1.2. Matériels et méthodes	45
III.1.3. Résultats	47
III.1.4. Conclusion	52
III.2. Adsorption des phospholipides en présence de fluorocarbures	53
III.2.1. Effet du perfluorohexane	53
<u>Publication 1</u>	
<i>"A Nonpolar, Nonamphiphilic Molecule Can Accelerate Adsorption of Phospholipids and Lower their Surface Tension at the Air/Water Interface."</i>	54
P.N. Nguyen, T.T. Trinh Dang, G. Waton, T. Vandamme, M.P. Krafft, <i>Chemphyschem</i> 2011 , 12, 2646-2652.	
III.2.2. Effet d'autres fluorocarbures	66

III.3. Adsorption des phospholipides sous oscillations périodiques	67
<u>Publication 2</u>	
<i>“Behavior of an Adsorbed Phospholipid Monolayer Submitted to Prolonged Periodical Surface Density Variations.”</i>	68
P.N. Nguyen, G. Waton, T. Vandamme, M.P. Krafft, <i>Angewandte Chemie</i> 2013 , DOI: 10.1002/anie.201301974.	
III.4. Adsorption des phospholipides en présence d’albumine	77
<u>Publication 3</u>	
<i>“Prolonged Sinusoidal Oscillations Can Reverse the Course of the Competitive Adsorption of Phospholipids and Proteins at an Air/Water Interface; a Fluorocarbon Gas Accelerates the Phenomenon.”</i>	78
P.N. Nguyen, G. Waton, T. Vandamme, M.P. Krafft, sousmis à <i>Chemical Science</i> .	
 Chapitre IV : Résultats sur les microbulles	 87
IV.1. Stabilisation des microbulles par des phosphates perfluoroalkylés	88
<u>Publication 4</u>	
<i>“Self-Assembled Microbubbles That Do Not Collapse.”</i>	89
G. Nikolova, P.N. Nguyen, P. Polavarapu, G. Waton, M.P. Krafft, à soumettre.	
IV.2. Microbulles stabilisées par des nanoparticules magnétiques	102
<u>Publication 5</u>	
<i>“Compressible Multi-Scale Magnetic Constructs: Decorating the Outer Surface of Self-Assembled Microbubbles with Iron Oxide Nanoparticles.”</i>	103
P.N. Nguyen, G. Nikolova, P. Polavarapu, G. Waton, L. Truong Phuoc, G. Pourroy, M.P. Krafft, <i>RSC Advances</i> 2013 , 3, 7743-7746.	
 Conclusion générale	 113
 Références	 117

Introduction générale

Introduction

Les fluorocarbures ont un fort potentiel en médecine et dans le domaine biomédical, principalement en raison de leur inertie biologique - ils ne sont pas métabolisés et sont excrétés inchangés par les voies respiratoires - et de leur forte capacité à dissoudre les gaz. Les fluorocarbures possèdent d'autres propriétés intéressantes pour les applications comme leur forte hydrophobie liée à un caractère lipophile prononcé, leur faible solubilité dans l'eau, et la grande sensibilité du noyau ^{19}F en résonance magnétique nucléaire. Formulés sous forme de microbulles, de microcapsules ou d'émulsions, les fluorocarbures sont largement étudiés comme composants de substituts du surfactant pulmonaire, de nouveaux agents thérapeutiques, et comme transporteurs d'oxygène.

Cependant, et en dépit du fait que certaines formulations employant des fluorocarbures sont utilisées en clinique, on constate qu'il n'existe que relativement peu d'études destinées à déterminer les interactions entre une molécule de fluorocarbure et une membrane de phospholipides. C'est une question importante à deux titres. D'une part, les phospholipides participent souvent à la composition des agents thérapeutiques ou de diagnostic qui impliquent des fluorocarbures. C'est par exemple le cas des microbulles et des émulsions utilisées comme agents de contraste en échographie et/ou en imagerie par résonance nucléaire (IRM). D'autre part, les phospholipides sont les molécules constitutives des membranes des cellules des tissus et des organes. Sous forme de monocouches ou de bicouches, les phospholipides entrent nécessairement en interaction avec les fluorocarbures lors de leur administration. Dans le cas des substituts du surfactant pulmonaire, une approche récente consiste à administrer à des lapins prématurés, donc déficients en surfactant pulmonaire natif, une émulsion de fluorocarbures stabilisée par des phospholipides. La compréhension des mécanismes d'interaction entre les fluorocarbures et la monocouche de phospholipides est déterminante dans le développement de cette approche.

L'objectif central de cette Thèse est d'étudier les interactions entre les fluorocarbures et une monocouche de phospholipides. Dans ce but, cette dernière a été adsorbée à la surface de bulles millimétriques, et mise en contact avec une atmosphère d'air saturée en fluorocarbure. De plus, nous avons élaboré et étudié des bulles micrométriques en dispersion aqueuse. Ces microbulles sont stabilisées par un fluorocarbure gazeux par effet osmotique et un renforcement mécanique de la paroi des bulles. La stabilité exceptionnelle de ces bulles a permis le greffage de nanoparticules magnétiques à leur surface.

Nous nous sommes intéressés à l'interface phospholipide/fluorocarbure car elle représente un modèle simplifié de membrane pour le développement de substituts synthétiques du surfactant pulmonaire dans la composition desquels entrent des fluorocarbures. Le surfactant pulmonaire est un complexe lipoprotéique dont le composant majoritaire est la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), qui est adsorbée à la surface des « bulles » millimétriques que constituent les alvéoles pulmonaires. D'autre part, nos bulles millimétriques sont des modèles des bulles micrométriques développées comme agents de contraste et qui sont stabilisées osmotiquement par un fluorocarbure.

Cette Thèse comporte quatre Chapitres. Le premier Chapitre expose les concepts et éléments bibliographiques qui sous-tendent notre travail. Une première partie présente les méthodes d'études de films de tensioactifs adsorbés depuis une solution aqueuse à la surface d'une bulle d'air millimétrique. Les théories développées pour la tension interfaciale à l'équilibre et la tension interfaciale dynamique seront discutées, ainsi que l'incidence sur la tension interfaciale de perturbations sinusoïdales de forte ou faible amplitude appliquées à la bulle. Nous présenterons dans une seconde partie un rapide état de l'art sur les stratégies de stabilisation des microbulles utilisées en diagnostique, ainsi que les mécanismes de dissolution des microbulles. Ces derniers dépendent fortement des tensioactifs qui forment la paroi des microbulles et de la nature de la phase gazeuse. Dans la troisième partie nous discutons l'approche consistant à utiliser des fluorocarbures en thérapie de remplacement du surfactant pulmonaire natif. Pour ceci, il est nécessaire de rappeler au préalable quelques généralités sur le surfactant pulmonaire et les conséquences pathologiques liées à sa déficience ou à sa détérioration. Nous rappelons aussi les propriétés spécifiques qui servent de base à l'application des fluorocarbures en thérapie pulmonaire.

Le second Chapitre décrit les méthodes expérimentales utilisées. Une attention particulière a été apportée à la tensiométrie par analyse de profil de bulle, qui a été notre technique de prédilection (partie 1). Le protocole décrivant les expériences effectuées aux interfaces air/eau et air saturé en fluorocarbure/eau (partie 2) est présenté tant en mode statique que lorsque la bulle est soumise à des oscillations périodiques (partie 3). Nous présentons ensuite la méthodologie d'analyse de taille des microbulles par mesure d'atténuation d'une onde ultrasonore, diffusion statique de la lumière et microscopie optique (partie 4).

Dans le troisième Chapitre, après avoir étudié l'adsorption des fluorocarbures et des hydrocarbures à l'interface air/eau d'une bulle millimétrique (partie 1), nous présentons une

première série de résultats liés aux caractéristiques de l'adsorption des phospholipides à cette interface en présence et en l'absence d'un fluorocarbure (partie 2). Nous avons montré qu'un fluorocarbure totalement apolaire et dépourvu de caractère amphiphile comme le perfluorohexane abaissait néanmoins considérablement la tension interfaciale d'une série de phospholipides et accélérât fortement son adsorption. Cette découverte surprenante a fait l'objet d'une publication parue en 2011 dans *ChemPhysChem*. Dans la partie 3, nous montrons que des oscillations périodiques appliquées à la bulle avaient également comme conséquence d'abaisser la tension interfaciale à l'équilibre en induisant une transition d'un film de DPPC vers un état mieux organisé (publication parue dans *Angew. chem* en 2013). Enfin, nous avons étudié l'effet de l'albumine sérique bovine sur l'adsorption de la DPPC (partie 4). En effet, la présence de cette protéine est souvent liée aux troubles pulmonaires dus au mauvais fonctionnement du surfactant pulmonaire. L'application d'oscillations sinusoïdales à la bulle permet à la DPPC d'expulser la protéine qui s'adsorbe plus rapidement à l'interface et colonise cette dernière plus rapidement (publication soumise en 2013). Nous avons enfin commencé à explorer l'impact des fluorocarbures sur ce système complexe.

Le Chapitre IV rapporte les résultats obtenus sur les bulles de taille micrométrique. Nous avons effectué un travail de sélection d'un tensioactif permettant de stabiliser des microbulles à la fois petites et stables. Nos résultats ont permis de choisir une famille de phosphates perfluoroalkylés. En effet, les chaînes fluorées ont une tension interfaciale faible et avaient, a priori, une meilleure affinité pour l'air que leurs analogues hydrocarbonés. Le choix de la tête phosphate est lié à un second objectif, celui de greffer des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer à la surface des microbulles. De telles microbulles décorées de nanoparticules constituent des agents de contraste bimodaux pour l'IRM et l'échographie et ont été développées dans le cadre d'un projet européen (NanoMagdye). Nous avons obtenu des microbulles submicroniques exceptionnellement stables (plusieurs semaines dans certains cas) grâce à la série homologue de phosphates perfluoroalkylés qui a été synthétisée au Laboratoire. En particulier, l'évènement de collapse de la monocouche qui détermine la destruction de la microbulle, évènement classiquement visualisé pour des parois de phospholipides, n'intervient pas ou intervient seulement sur des temps considérablement plus longs, lorsque c'est le phosphate perfluoroalkylé qui forme la paroi des microbulles. Les caractéristiques des monocouches de Langmuir de ces phosphates ont été mesurées afin de déterminer les raisons de cette durée de vie hors norme (partie 1, publication en préparation). Nous avons également réussi à former des bulles couvertes par des nanoparticules

magnétiques, en gardant la flexibilité de la paroi. Ces bulles sont très stables, échogènes et peuvent spontanément s'aligner en fonction de la direction du champ magnétique (partie 2, publication parue en 2013 dans *RSC Advances*).

Une conclusion générale résume les découvertes qui ont été faites au cours de ce travail dans l'Equipe SOFFT.

Chapitre I

Monocouches de tensioactifs à une interface courbe ou plane

I.1. Adsorption de tensioactifs à la paroi d'une bulle

I.1.1. Généralités sur la tension interfaciale

La tension interfaciale est un paramètre qui dépend de la nature de l'interface entre deux milieux. Elle traduit le fait que l'énergie de contact doit être minimale. Elle a la dimension d'une force par unité de longueur ou d'une énergie par unité de surface. Un exemple bien connu d'effet de la tension interfaciale est celui où une goutte de liquide tend vers une forme sphérique pour minimiser le rapport surface sur volume.

La cause moléculaire de la tension interfaciale réside dans le fait que des molécules situées à une interface entre deux liquides ou entre un liquide et un gaz ont des interactions différentes de celles des molécules en volume. Par exemple pour une interface liquide-gaz (Figure 1), au sein du liquide, les molécules sont entourées de tous côtés par des molécules de même nature. A l'interface, par contre, les molécules ont du côté gaz des interactions avec des molécules beaucoup moins nombreuses et éventuellement de nature différente. Le

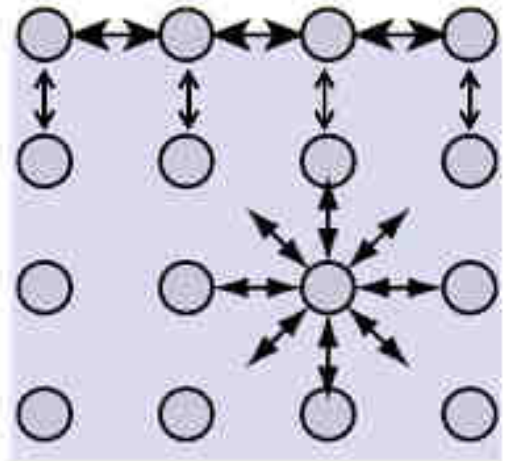


Figure 1 : Molécules au voisinage de l'interface.

déplacement d'une molécule du volume à la surface (création d'une surface) modifie donc l'énergie du système. La variation de l'énergie libre de Gibbs dG lors d'une variation de surface dA peut s'écrire : $dG = \gamma dA$ (à température T et pression P constantes) où la quantité γ ($J m^{-2}$) est appelée énergie libre de surface ou tension interfaciale.^[1, 2]

A une interface liquide-gaz, la tension interfaciale est en général élevée car dans les liquides, les interactions intermoléculaires sont plus fortes que dans les gaz où la distance entre les molécules est plus grande. Cette dissymétrie entre les deux côtés de l'interface entraîne une forte tension interfaciale. A une interface liquide-liquide, cette dissymétrie est nettement plus faible, ce qui conduit à une tension interfaciale plus basse. La tension interfaciale air-eau ($72 mN m^{-1}$), élevée en comparaison avec celles d'autres liquides, est liée au fort caractère cohésif de l'eau qui résulte du moment dipolaire de la molécule d'eau et des liaisons hydrogène qui se forment.^[3, 4]

La tension interfaciale d'un liquide pur est modifiée quand des molécules sont mises en solution dans celui-ci. On appelle agents de surface, tensioactifs ou surfactants, des

molécules qui, à très faibles concentrations, modifient fortement la tension interfaciale. En général, ce sont des molécules amphiphiles, c'est à dire composées de deux segments qui ont des affinités différentes. Les molécules possédant des propriétés tensioactives dans l'eau ont une extrémité polaire ou ionique (partie hydrophile) et l'autre extrémité qui est non polaire (partie lipophile) est généralement constituée d'une chaîne carbonée. Les tensioactifs sont classés en quatre grandes familles : les anioniques, les cationiques, les zwitterioniques (les deux charges positives et négatives sont portées par la tête polaire), et les non ioniques, en fonction de la nature du groupe hydrophile.

En solution aqueuse, les tensioactifs peuvent former des agrégats, par exemple des micelles, car seules les parties hydrophiles sont en contact avec l'eau alors que les parties hydrophobes sont en contact les unes avec les autres et constituent le cœur des micelles. Une partie des tensioactifs en solution s'adsorbe à l'interface liquide-gaz ce qui réduit la tension interfaciale. Cette réduction dépend du nombre de molécules adsorbées par unité de surface. La relation qui lie la tension interfaciale et la concentration de molécules adsorbées à l'interface est connue sous le nom d'isotherme de Gibbs.

I.1.2. Tension interfaciale d'équilibre

Lors de la création d'une interface, la tension interfaciale évolue au cours du temps car les échanges entre l'interface et la phase continue ne sont pas instantanés, mais nécessitent la diffusion des molécules dans la phase continue. Selon Rosen et Hua ^[5, 6], une courbe d'évolution typique de la tension interfaciale peut être divisée en quatre régions : la région d'induction, la région d'abaissement rapide de la tension, la région de méso-équilibre et la région d'équilibre. Une fois la solution à l'équilibre, les équations thermodynamiques classiques peuvent s'appliquer au système ; l'équation de l'énergie de Gibbs ^[4] s'obtient en ajoutant un terme surfacique et s'écrit comme (I.1) :

$$G = TS + \sum_i \mu_i N_i + \gamma A \quad (\text{I.1})$$

Où N_i est le nombre de molécules de l'espèce i , A l'aire de l'interface, T la température, S l'entropie et μ_i le potentiel chimique du composant chimique i .

La dérivée totale de cette l'équation donne l'équation (I.2) :

$$dG = TdS + SdT + \sum \mu_i dN_i + \sum N_i d\mu_i + \gamma dA + Ad\gamma \quad (\text{I.2})$$

Par ailleurs, le changement de l'énergie libre est la conséquence du changement de l'énergie thermique, chimique et mécanique. Nous avons donc l'équation (I.3) :

$$dG = TdS + \sum \mu_i dN_i + \gamma dA \quad (I.3)$$

La comparaison avec l'équation (I.2) donne (I.4) :

$$SdT + \sum N_i d\mu_i + Ad\gamma = 0 \quad (I.4)$$

A température constante, nous avons (I.5) :

$$d\gamma = - \sum_i \frac{N_i}{A} d\mu_i = - \sum_i \Gamma_i d\mu_i \quad (I.5)$$

où $d\gamma$ est le changement de la tension interfaciale, Γ_i la concentration de surface et $d\mu_i$ le changement du potentiel chimique du composant i du système. Lorsque le système est à l'équilibre, le potentiel chimique de la molécule i est le même à l'interface et dans la solution. Si on considère que le nombre de molécules à l'interface est négligeable par rapport au nombre de molécules dans le volume, la valeur du potentiel chimique dépend de la concentration c_i de molécule i dans la solution, et sa variation est donnée par $d\mu_i = RT d \ln c_i$.

L'équation de Gibbs devient donc (I.6) et (I.7) :

$$d\gamma = -RT\Gamma_i d \ln c_i \quad (I.6)$$

$$\Gamma_i = - \frac{1}{nRT} \frac{d\gamma}{d \ln c_i} \quad (I.7)$$

où R est la constante des gaz parfaits, T la température ; $n = 1$ pour les surfactants non-ioniques, les molécules neutres, les surfactants ioniques en présence d'excès d'électrolyte ; $n = 2$ pour les surfactants ioniques monovalents, en supposant que la surface est électriquement neutre.

La tension interfaciale dépend de la concentration du tensioactif dans la solution ainsi qu'à l'interface (Figure 2). Un brusque changement de pente intervient à la concentration micellaire critique (CMC).

Au-delà de la CMC, des micelles se forment et conduisent à une valeur constante de la tension interfaciale. Ce phénomène est dû au fait que la concentration en molécules libres de

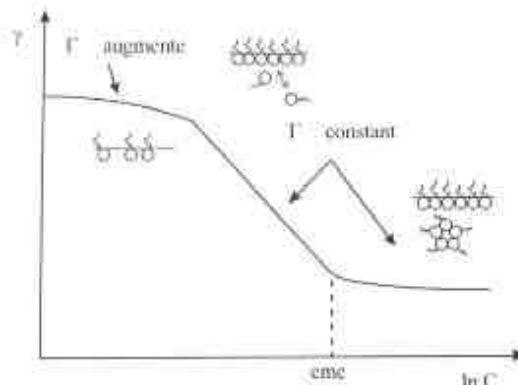


Figure 2 : Variation de la tension interfaciale γ en fonction de la concentration du surfactant

tensioactif ne change plus, et donc que le potentiel chimique est constant. En-dessous de la CMC, la concentration de surface Γ peut être estimée à partir de la pente de la courbe ^[7].

Pour déterminer la tension interfaciale à l'aide de l'équation (I.6), il faut établir une relation appelée « isotherme » entre la concentration des molécules de tensioactifs dans la solution et à l'interface. On peut trouver plusieurs relations dans la littérature qui dépendent du mécanisme d'échange entre le volume et la surface.

I.1.3. Isotherme d'adsorption à l'équilibre

I.1.3.1. Isotherme de Henry

Pour un système à un seul composant, l'isotherme le plus simple est l'isotherme de Henry ^[8], qui est donné par (I.8) :

$$\Gamma = K_H c \quad (\text{I.8})$$

La constante d'adsorption K_H , qui a la dimension d'une longueur, est une mesure de la probabilité qu'une molécule de tensioactif en solution soit ancrée à l'interface. Cette isotherme est valable pour une faible concentration de surface. Joint à l'équation de Gibbs, on a l'équation d'état (I.9) :

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma = nRTK_H c = nRT\Gamma \quad (\text{I.9})$$

Où Π est la pression de surface, γ_0 est la tension interfaciale de l'eau pure et γ est la tension interfaciale de la solution.

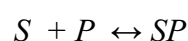
I.1.3.2. Isotherme de Langmuir

L'isotherme non linéaire le plus utilisé est l'isotherme de Langmuir ^[9-11] (I.10)

$$\Gamma = \Gamma_m \frac{Kc}{1 + Kc} \quad (\text{I.10})$$

où Γ_m est la concentration maximale de surface, K est la constante d'équilibre d'adsorption qui dépend du rapport entre la probabilité qu'une molécule de surfactant en solution vienne se fixer à l'interface et la probabilité qu'une molécule se détache de l'interface. Aux faibles concentrations pour lesquelles $Kc \ll 1$, l'isotherme de Langmuir devient l'isotherme de Henry, alors $K_H = \Gamma_m K$.

L'équation de Langmuir est dérivée de la relation d'équilibre entre le nombre de sites de surfaces vides S , celui des sites remplis de molécules SP et la quantité de molécules en solution P . L'équation d'échange est :



Les concentrations des différentes espèces sont liées par la relation :

$$K = \frac{[SP]}{[S][P]}$$

La constante d'équilibre K ne dépend pas de la concentration des constituants du système, mais essentiellement de la température.

Comme le nombre de sites de surface remplis SP est proportionnel à la couverture partielle de la surface θ , le nombre de sites de surface non remplis S est proportionnel à $1-\theta$, et le nombre de molécules est proportionnel à la pression osmotique ou à la concentration c , l'équation peut être réécrite comme (I.11) :

$$K = \frac{\theta}{(1-\theta)c} \quad (\text{I.11})$$

Cette équation conduit à l'équation de Langmuir (I.12) :

$$\theta = \frac{\Gamma}{\Gamma_m} = \frac{Kc}{1 + Kc} \quad (\text{I.12})$$

Avec $\Gamma_m = 1/s$ où s est la surface occupée par une molécule de tensioactif. La valeur de la tension interfaciale est obtenue par intégration de la relation de Gibbs (I.6). Le résultat est la relation de Szyszkowski (I.13) :

$$\Pi = \frac{RT}{s} \ln(1 + Kc) \quad (\text{I.13})$$

$\Pi = \gamma_0 - \gamma$, où γ_0 et γ sont les tensions interfaciales du solvant et de la solution.

1.1.3.3. Isotherme de Frumkin

Les modèles décrits précédemment ne permettent pas de tenir compte d'éventuelles interactions entre les molécules formant le film à l'interface. Pour pallier à ces insuffisances, Frumkin a développé un modèle qui a été utilisé pour de nombreux systèmes et qui est le plus approprié pour un tensioactif non ionique. Il a supposé que la surface, s , occupée par une molécule de surfactant adsorbée à l'interface dépend de la pression de surface Π .

En négligeant la contribution de la non-idéalité de l'entropie, l'équation d'état de Frumkin (I.14) et les isothermes d'adsorption (I.15) sont donnés par :

$$Kc = \frac{\theta}{1-\theta} \exp[-2b\theta] \quad (\text{I.14})$$

$$\Pi = \frac{RT}{s} [\ln(1-\theta) + b\theta^2] \quad (\text{I.15})$$

Ici, b est la constante d'interaction entre les molécules formant le film à l'interface.

Ce système d'équation n'a pas de solution analytique, on doit déduire le coefficient phénoménologique b ainsi que la constante d'équilibre K et la surface s occupée à l'interface par une molécule par ajustement des équations (I.14) et (I.15) aux données expérimentales [7, 12].

I.1.4. Tension interfaciale dynamique

Dans la partie précédente, nous avons présenté les relations entre la tension interfaciale et les paramètres thermodynamiques du système. Nous avons aussi vu que la concentration de tensioactif à la surface dépendait de sa concentration dans la phase continue. Si la valeur de la surface de l'interface est modifiée, un échange de molécules a lieu entre celle-ci et la solution. Ce rééquilibrage ne peut se réaliser instantanément, la vitesse de diffusion des molécules ralentissant leur accès à l'interface.

La Figure 3 montre une variation typique de la tension interfaciale d'une goutte juste après sa création. On observe une diminution de la tension interfaciale qui correspond à l'adsorption progressive des molécules de tensioactif à l'interface jusqu'à l'équilibre entre l'interface et la phase continue. Cet équilibre est obtenu quand le nombre de molécules de tensioactif qui se détachent de l'interface par unité de temps est égal au nombre de molécules qui s'y fixent.

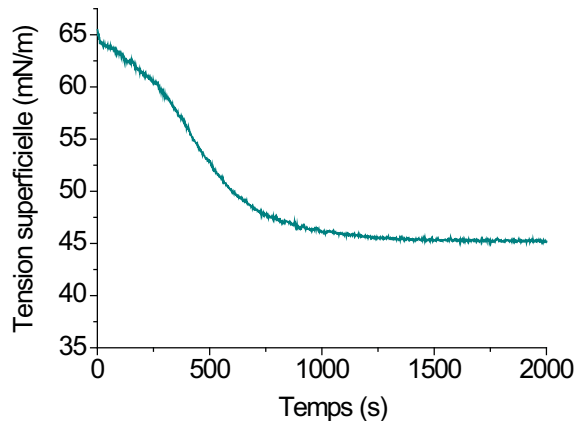


Figure 3. Adsorption du dioctanoylphosphatidylcholine ($5 \cdot 10^{-6} M$) à l'interface air/eau en fonction du temps

Cette expérience montre qu'après la création d'une nouvelle interface dans une solution de tensioactif, un temps fini est nécessaire pour parvenir à un équilibre entre la concentration de surface et la concentration volumique du surfactant. Le comportement dynamique d'adsorption est régi par un processus en deux étapes : (1) l'échange des molécules entre la solution et la sous-couche (couche de quelques nanomètres située sous l'interface) et (2) le transfert des molécules entre la sous-couche et l'interface.

Lorsque les molécules de tensioactif sont adsorbées à la nouvelle interface, la concentration diminue d'abord dans la sous-couche. La diffusion intervient dans un second temps et tend à rétablir la concentration initiale dans la sous-couche par la migration des molécules de soluté depuis la solution volumique. Le domaine dans lequel a lieu la diffusion est beaucoup plus grand que l'épaisseur de la couche d'adsorption^[7, 13].

La première étape est un processus d'adsorption. La deuxième étape est un processus de transfert volumique, principalement régi par la diffusion. Pour simplifier l'analyse du phénomène d'adsorption, on peut supposer deux cas. Dans le premier cas, les molécules

diffusent du volume à la sous-couche et, une fois dans la sous-couche, s'absorbent directement à l'interface. Le processus qui contrôle la vitesse d'adsorption est alors le transfert des molécules à la sous-couche. Dans le second cas, appelé cinétique mixte d'adsorption, la molécule diffuse aussi du volume à la sous-couche, mais le processus qui contrôle la vitesse d'adsorption est le transfert des molécules à l'interface. Une fois que la molécule est dans la sous-couche, il peut y avoir différents obstacles qui empêchent son adsorption. Par exemple, seules les molécules présentant une certaine orientation, une déshydratation partielle ou formant une paire d'ions avec des contre-ions en solution, peuvent s'adsorber à l'interface. Ces conditions, qui réduisent le nombre de molécules pouvant être "efficaces", augmentent le temps de transfert.

I.1.5. Calcul des paramètres de la tension interfaciale dynamique

Pour les deux modèles mentionnés ci-dessus, la variation temporelle de la tension interfaciale peut être mise en équation.

I.1.5.1. Le modèle de diffusion

Dans ce modèle, les molécules diffusent du volume à la sous-couche et une fois à proximité de l'interface, elles s'adsorbent très rapidement. La cinétique qui contrôle le processus est la diffusion parce que sa vitesse est beaucoup plus lente que celle d'adsorption. Ce modèle, a été décrit par Ward et Tordai ^[14, 15]. Ces auteurs obtiennent l'équation (I.16) pour la variation de la concentration de surface Γ :

$$\Gamma(t) = 2c_0 \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} - 2 \sqrt{\frac{D}{\pi}} \int_0^{\sqrt{t}} c_s d(\sqrt{t-\tau}) \quad (\text{I.16})$$

où c_0 est la concentration dans la solution très loin de l'interface, c_s la concentration dans la sous-couche, D le coefficient de diffusion de la molécule, et τ la variable muette d'intégration.

I.1.5.2. Le modèle de diffusion-cinétique

Dans ce modèle, les molécules diffusent aussi du volume vers la sous-couche, mais une fois dans la sous-couche, elles doivent remplir des conditions spécifiques pour être adsorbées. Cette barrière à l'adsorption peut être :

Une barrière de potentiel : les molécules doivent avoir une énergie supérieure à une énergie d'activation spécifiée pour s'adsorber à la surface. C'est le cas par exemple de la répulsion électrostatique.

L'orientation de la molécule : une molécule ne peut être adsorbée à la surface que si elle se présente suivant une orientation bien définie. C'est le cas pour des molécules allongées ou amphiphiles.

La présence de micelles : si la concentration dans la solution est supérieure à la CMC, il existe des micelles. Les molécules dans les micelles ne sont pas disponibles pour s'adsorber à la surface, elles doivent d'abord sortir de la micelle pour devenir une molécule libre. Ce processus a donc besoin de temps.

Pour prendre en compte les différents cas envisagés ci dessus, Liggieri et Ravera ont proposé un modèle dérivé de celui de Ward et Tordai auquel ils ont ajouté une barrière de potentiel. Cette approche conduit à renormaliser le coefficient de diffusion par un terme fonction de la barrière de potentiel. Ce coefficient de diffusion normalisé D^* s'écrit (I.17):

$$D^* = D \exp\left(-\frac{\varepsilon_a}{RT}\right) \quad (\text{I.17})$$

où ε_a est l'énergie d'adsorption. Quand $\varepsilon_a \rightarrow 0$, $D^* \rightarrow D$ et le modèle de diffusion-cinétique devient celui de diffusion. L'équation de Ward et Tordai devient (I.18)

$$\Gamma(t) = 2c_0 \sqrt{\frac{D_a t}{\pi}} - 2 \sqrt{\frac{D_a}{\pi}} \int_0^{\sqrt{t}} c_s d(\sqrt{t-\tau}) \quad (\text{I.18})$$

où

$$D_a = \frac{D^{*2}}{D} = D \exp\left(-\frac{2\varepsilon_a}{RT}\right) \quad (\text{I.19})$$

I.1.6. Perturbation d'une monocouche à l'équilibre. Cas des faibles perturbations

Nous avons présenté précédemment la cinétique de formation d'une monocouche sur une interface nouvellement créée. Nous devons aussi envisager le cas où une monocouche existante est très faiblement étirée ou compressée.

Le module de dilatation de surface E est défini comme la variation de la tension interfaciale γ pour une petite variation de la surface A à température constante^[16-19] (I.20) :

$$E = \frac{d\gamma}{d \ln(A)} \quad (\text{I.20})$$

Ce coefficient peut être représenté par un nombre complexe $E = E_r + iE_i$, où la partie réelle est appelée module d'élasticité, et la partie imaginaire module de perte, ou module visqueux^[19].

Deux cas limites peuvent être étudiés. Dans le premier cas les molécules formant la monocouche sont insolubles. Les molécules ne peuvent pas se dissoudre dans la sous-phase, c'est-à-dire qu'il n'y aura pas d'échange de molécules entre la surface et la phase continue. Le module de dilatation est donné par ^[16, 20] (I.21) :

$$E = -\Gamma \frac{\partial \gamma}{\partial \Gamma} \quad (\text{I.21})$$

où Γ est la concentration de surface.

Dans le second cas les molécules formant la monocouche sont solubles. Il y aura des échanges entre la surface et la phase continue pour équilibrer la concentration de surface. Si la monocouche est comprimée, quelques molécules se dissolvent dans la phase continue et, si la monocouche est étirée, des molécules s'adsorbent à la surface. Dans le cas où la cinétique d'adsorption des molécules à la surface est contrôlée par un simple mécanisme de diffusion, les parties réelle et imaginaire du module viscoélastique sont données en fonction de la fréquence de la perturbation par les équations (I.22) (I.23) ^[16, 19] :

$$E_r(\omega) = E_o \frac{1 + \zeta}{1 + 2\zeta + 2\zeta^2}; \quad (\text{I.22})$$

$$E_i(\omega) = E_o \frac{\zeta}{1 + 2\zeta + 2\zeta^2} \quad (\text{I.23})$$

où $\zeta = \sqrt{D/2\omega}$ et $E_o(c) = -d\gamma/d\ln\Gamma$ est la limite de l'élasticité à fréquence infinie, Γ , c , D et ω sont, respectivement, la concentration de surface, la concentration volumique, le coefficient de diffusion, et la fréquence des oscillations produites.

Lorsque d'autres processus de relaxation interviennent à l'interface ou près de l'interface, comme la formation de micelles, les phénomènes de convection, les processus d'adsorption avec barrière de potentiel, les réactions à l'interface, des modèles plus complexes ont été développés ^[16, 21].

Il est important de remarquer que dans le cas des phospholipides, les temps d'adsorption sont très longs, et de ce fait les valeurs des grandeurs thermodynamiques à l'équilibre sont rarement atteintes. Pour cette raison, nous avons étudié l'adsorption des phospholipides sur des durées de plusieurs heures (chapitre III).

I.2. Microbulles à paroi de tensioactifs

Au cours des dix dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés dans le développement des microbulles utilisables dans une grande variété d'applications biomédicales. La capacité unique de couplage acoustique des microbulles avec les ultrasons leur permet d'être des agents de contraste d'une grande efficacité pour l'imagerie ultrasonore, l'échographie par imagerie moléculaire, ou la délivrance ciblée et contrôlée par ultrasons de médicaments ou de gènes [22-28]. Les microbulles doivent avoir un diamètre compris entre 1 et 7 μm avec une distribution de taille étroite, afin de maximiser la résonance avec le champ d'ondes ultrasonores tout en préservant leur capacité à pénétrer dans les plus petits capillaires sanguins [24]. Une microbulle est composée d'un cœur gazeux, souvent stabilisé par un fluorocarbure.[24] Leur paroi est constituée par des protéines, des phospholipides ou des polymères.

I.2.1. Stratégies de stabilisation des microbulles

I.2.1.1. Composition de la paroi

La paroi permet de diminuer la tension interfaciale et donc la pression de gaz à l'intérieur de la bulle. Elle peut aussi ralentir la solubilisation du gaz dans la phase liquide.

Parois constituées de protéines

La première formulation de microbulles utilisables comme agents de contraste pour l'échographie a utilisé l'albumine comme agent de stabilisation. Ces microbulles, commercialisées sous le nom d'Albunex[®], ont été approuvées par la Food and Drug Administration (FDA). C'est une suspension qui contient $\sim 7 \times 10^8$ microbulles de 1-15 μm de diamètre par ml [29]. Ces microbulles sont formées par sonication d'une solution d'albumine sérique humaine. Elles restent stable pendant au moins deux ans à une température de 2-8°C. C'est grâce à Albunex[®] que les premiers essais cliniques d'imagerie cardiaque ont été effectués et ont montré que le contraste entre le muscle du cœur et le volume sanguin était très fortement accru. Une autre formulation de microbulles à base d'albumine, Optison[®] a été développée à partir d'Albunex[®] [30]. Un perfluorocarbure est utilisé au lieu de l'air.[24] D'autres protéines ont été utilisées comme composants de la paroi des microbulles, tel que le lysozyme [31] ou des mélanges d'albumine et d'avidine [32].

Parois constituées de phospholipides ou de tensioactifs

Des microbulles à parois de phospholipides sont commercialisées sous le nom de Definity[®] et Sonovue[®]. La monocouche de phospholipides permet d'obtenir une tension interfaciale très basse. En fonction de la structure moléculaire des phospholipides, la monocouche est dans un état liquide ou semi-cristallin à la température du corps. Dans l'état liquide, la compressibilité de la monocouche est élevée. Aussi, quand la microbulle entre en résonance sous l'effet du champ acoustique, la présence de la monocouche ne perturbe pas les qualités du résonateur acoustique que constitue la bulle. De plus, les microbulles dont la paroi est constituée de phospholipides peuvent être facilement fonctionnalisées pour la délivrance de médicaments [22, 26, 33]. Un mélange de surfactants constitués de Span-40 et de Tween-40, proposé par Wheatley et al. [34, 35], permet d'obtenir des microbulles très stables.

Parois constituées de polymères

Des microcapsules stabilisées par des multicouches de polyélectrolytes de charges opposées (e.g. polyallylamine hydrochloride et polystyrene sulfonate) ont été préparées.^[36] Ces « microbulles » rigides ont une excellente stabilité, et leur charge et fonctionnalisation de surface peuvent être facilement ajustées. La paroi de ces microcapsules est beaucoup plus épaisse que celles des bulles stabilisées par les phospholipides. Aussi, son élasticité, qui est en général importante, entraîne une modification du couplage entre la bulle et le champ ultrasonore qui conduit à une diminution de l'intensité des échos.

1.2.1.2. Composition de la phase gazeuse interne

Des bulles peuvent être formées avec des gaz comme l'oxygène ou l'azote. Cependant, ces gaz étant très solubles dans les milieux aqueux, la taille des bulles obtenues diminuent rapidement en raison de leur dissolution. L'utilisation d'un fluorocarbure incorporé à la phase gazeuse a permis d'obtenir des microbulles avec une durée de vie acceptable pour l'échographie médicale [25, 37]. Les fluorocarbures sont quasiment insolubles dans l'eau et ont une tension de vapeur très élevée pour leur masse moléculaire, alors que leur tension interfaciale est très basse. Leur grande inertie chimique et biologique favorise leur utilisation pour des applications médicales.

I.2.2. Mécanisme de dissolution des microbulles

I.2.2.1. Microbulles d'air

Dans un milieu liquide, les microbulles d'air sont soumises à la pression de Laplace (P_{Lap}) et à la pression atmosphérique (P_{atm}). La pression de l'air à l'intérieur de la bulle (P_{int}) est égale à la somme de ces deux pressions (I.24) [38] :

$$P_{int} = P_{Lap} + P_{atm} = \frac{2\gamma}{r} + P_{atm} \quad (I.24)$$

Où γ est la tension interfaciale entre la bulle et le milieu liquide, r le rayon de la bulle.

La quantité de gaz dissous est proportionnelle à sa pression (loi de Henri). Comme celui-ci est à l'équilibre avec le gaz atmosphérique d'un côté et avec l'air à l'intérieur de la bulle, de l'autre, un flux gazeux s'établit qui conduit à un dégonflement de la bulle. Ce phénomène a un caractère catastrophique car, plus le rayon diminue, plus la pression de Laplace augmente ce qui augmente la vitesse du flux gazeux. La surpression à l'intérieur de la bulle étant proportionnelle à sa tension interfaciale, plus cette dernière est faible, plus la pression de Laplace sera faible, ce qui conduit à diminuer la vitesse de dissolution des bulles.

Les équations permettant la description de la cinétique de dissolution d'une bulle de gaz dans un liquide ont été proposées par Epstein et Plesset [39]. À partir de la loi de diffusion de Fick et en posant comme condition aux limites que le flux gazeux est le même des deux côtés de l'interface air eau de la bulle, l'équation suivante est obtenue (I.25) :

$$\frac{dr}{dt} = -L \frac{1-F + \frac{2\gamma}{P_{atm}r}}{1 + \frac{4\gamma}{3P_{atm}r}} \left(\frac{D_w}{r} + \sqrt{\frac{D_w}{\pi t}} \right) \quad (I.25)$$

où D_w est le coefficient de diffusion dans l'eau des molécules composant la phase gazeuse, F le rapport entre la concentration en gaz dissous dans l'eau et sa concentration quand celle-ci est à l'équilibre avec l'air à la pression atmosphérique, L le coefficient d'Ostwald, égal au rapport entre la concentration en gaz dissout dans le milieu liquide et sa pression dans la phase gazeuse.

La solution numérique de cette équation différentielle qui n'a pas de solution analytique montre que le temps de dissolution d'une bulle ayant un rayon de quelques micromètres est de quelques secondes. Pour ralentir la dissolution des microbulles, l'usage d'un gaz osmotique a été proposé. Le gaz idéal devrait être totalement insoluble dans l'eau et avoir une vitesse de diffusion très faible et donc une grande masse moléculaire. Par conséquent, les

fluorocarbures, qui ont une masse moléculaire élevée et qui présentent une faible température d'ébullition sont de très bons candidats.

1.2.2.2. Microbulles stabilisées par un fluorocarbure

Lorsque des microbulles contenant un fluorocarbure gazeux sont préparées et laissées en suspension dans une solution aqueuse, l'évolution de leur taille va se faire en trois étapes ^[24, 37]. En effet, si nous considérons que l'échange à travers l'interface de la bulle des molécules d'oxygène et d'azote est beaucoup plus rapide que celui du gaz fluoré, la quantité de gaz fluoré que contient la bulle lors de sa préparation déterminera le diamètre de la bulle. En effet durant les quelques secondes qui suivent la création de la bulle, le gaz fluoré est piégé à l'intérieur ; la condition d'équilibre des pressions conduit à un rayon tel que la pression de Laplace soit égale à la pression partielle du gaz fluoré et que la pression de l'air à l'intérieur de la bulle soit égale à la pression atmosphérique.

Après les quelques secondes nécessaires à ce premier équilibre, la dissolution du gaz fluoré dans la solution s'effectue lentement et la pression partielle de l'air à l'intérieur de la bulle reste constante et égale à la pression atmosphérique durant tout le processus de dissolution du gaz fluoré.

La diffusion du gaz fluoré en fonction du temps est donnée par l'équation (I.26) :

$$\frac{d}{dt} \left(C_f \frac{4\pi r^3}{3} \right) = -4\pi r D_f (c_f(r) - c_f(\infty)) \quad (\text{I.26})$$

où C_f est la concentration molaire de gaz fluoré à l'intérieur de la bulle, $c_f(r) = L_f C_f$ est la concentration de gaz fluoré dans l'eau au voisinage de la paroi, avec L_f le coefficient d'Oswald, $c_f(\infty)$ la concentration en gaz fluoré loin de la bulle et D_f le coefficient de diffusion du gaz fluoré dans l'eau.

Comme la pression partielle du gaz fluoré est égale à la pression de Laplace, on a l'équation (I.27) :

$$P_f = C_f RT = \frac{2\gamma}{r} \quad (\text{I.27})$$

La combinaison de (I.26) avec $c_f(\infty) = 0$ (absence de gaz fluoré à l'extérieur de la solution) et avec (I.27) nous donne la variation du rayon de la bulle (I.28) :

$$\frac{d}{dt} r^2 = -3D_f L_f \quad (\text{I.28})$$

La diminution de la surface (S) de la bulle en fonction du temps est donnée par l'équation (I.29) :

$$\frac{dS}{dt} = -12\pi D_f L_f \quad (I.29)$$

Cette dernière équation montre que, quelle que soit la taille de la bulle, sa surface diminue linéairement avec le temps.

Durant cette deuxième étape, la pression partielle du gaz fluoré à l'intérieur de la bulle augmente progressivement pour compenser l'augmentation de la pression de Laplace due à la diminution du rayon de la bulle. Cependant, la pression partielle du gaz fluoré ne peut pas augmenter indéfiniment. En effet, au-dessus de la pression de saturation, le gaz fluoré se condense. Aussi, pour une pression de Laplace supérieure à la pression de saturation, celui-ci ne joue plus son rôle et la taille des bulles diminue très vite. Le rayon (r_{min}) à partir duquel se produit ce phénomène peut être calculé avec l'équation (I.30) :

$$r_{min} = \frac{2\gamma}{P_{sat}} \quad (I.30)$$

où P_{sat} est la pression de saturation du gaz fluoré.

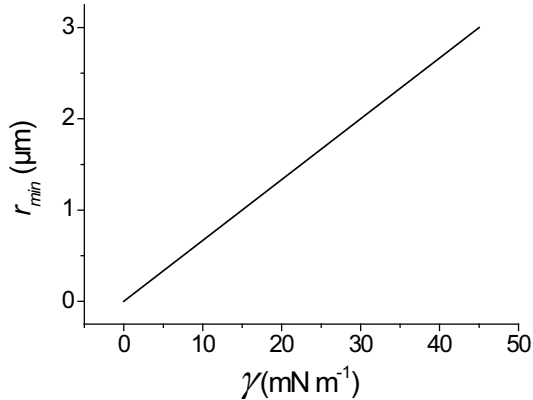


Figure 4 : Variation de rayon minimum en fonction de la tension interfaciale pour des microbulles stabilisées par le perfluorohexane.

Par exemple à 25°C, la pression de saturation du perfluorohexane est $\sim 30\,000$ N m⁻² ; pour une tension interfaciale de 45 mN m⁻¹, $r_{min} = 3$ μ m. Il est impossible de faire des bulles stables de moins de 3 μ m avec le perfluorohexane. La variation de r_{min} en fonction de la tension interfaciale est donnée par la figure 4. Pour le perfluorohexane, $D_f = 5.8 \cdot 10^{-9}$, $L_f = 23 \cdot 10^{-6}$ [37], ce qui donne une décroissance de r^2 de $0.4 \mu^2 \text{ s}^{-1}$.

I.2.2.3. Microbulles d'air stabilisées par un film de tensioactif

Dans la plupart des cas, un film de tensioactif soluble ralentit la dissolution des microbulles, en raison de l'abaissement de la pression de Laplace mais modifie peu la diffusion du gaz à l'interface [40]. En effet, à la surface de la bulle, il existe toujours des échanges des tensioactifs entre la surface et la phase continue pour équilibrer la concentration de surface. Ces adsorptions et désorptions des tensioactifs créent des surfaces temporairement

nues, qui permettent de transférer librement des molécules de gaz via l'interface de la bulle ^[41]. Les microbulles stabilisées par un film de tensioactif soluble se dissolvent donc selon l'équation d'Epstein et Plesset (I.25).

Pour un film de tensioactif insoluble, en revanche, l'échange des molécules est considérablement ralenti. Des tensioactifs insolubles ont été étudiés et ont montrés qu'ils réduisent la perméabilité de l'interface gaz-liquide et donc, augmentent la résistance au transfert de masse interfaciale.^[42, 43] Un modèle a été proposé par Borden et Longo à partir de celui d'Epstein et Plesset, pour tenir compte des effets de résistance de la paroi sur la vitesse de dissolution des bulles (I.31) ^[44]. La résistance de la paroi à la diffusion gazeuse est un facteur prépondérant dans la stabilisation des microbulles.

$$\frac{dr}{dt} = -\frac{L}{\frac{r}{D_w} + R_p} \left(\frac{\left(1 + \frac{2\gamma}{P_{atm} r}\right) - F}{1 + \frac{4\gamma}{P_{atm} r}} \right) \quad (I.31)$$

où R_p est la résistance de la paroi à la diffusion gazeuse

I.2.3. Microbulles dans un champ ultrasonore

Les microbulles sont par nature des résonateurs. En effet, si on fait une analogie avec une masse et un ressort, la masse est l'eau entraînée par le mouvement de la paroi de la bulle ; le ressort est le gaz compressible à l'intérieur de la bulle. Pour calculer la résonance de la bulle, on peut utiliser l'équation du mouvement des parois (I.32) donnée par Rayleigh et Plesset, puis développée par Keller qui a tenu compte de la viscosité du liquide entourant la bulle ^[45] :

$$\left(1 + \frac{4\mu}{\rho c r_0}\right) \ddot{X} + 2 \left(\frac{2\mu}{\rho r_0^2} + \frac{r_0(2\pi f)^2}{2c}\right) \dot{X} + (2\pi f_0)^2 X = \frac{P_A}{\rho r_0^2} \quad (I.32)$$

où r_0 est le rayon initial de la bulle, et X sa variation relative, \ddot{X} et \dot{X} sont les dérivés seconde et première de X , respectivement, ρ est la masse volumique de la phase continue, c la vitesse de l'onde acoustique, f la fréquence, P_A la pression atmosphérique, μ la viscosité du liquide environnant.

On obtient à l'aide de cette équation la valeur de la fréquence de résonance (f_0) (I.33) :

$$f_0^2 = \frac{1}{4\pi^2 \rho r_0^2} \left[3\kappa \left(P_A - P_V + \frac{2\gamma}{r_0} \right) - \frac{2\gamma}{r_0} \right] \quad (I.33)$$

où γ est la tension interfaciale, P_V la pression de vapeur de l'eau, κ l'indice polytropique, qui est égal au rapport des chaleurs spécifiques s'il n'y a pas d'échange de chaleur entre la bulle

et le liquide environnant (cas adiabatique, lorsque la fréquence est très élevée), et à 1 si la température de la bulle est égale à celle du liquide (cas isotherme, lorsque la fréquence est très basse).

Après une excitation du résonateur, le mouvement de la paroi de la bulle obéit à une loi de type sinusoïde amortie. L'amortissement est dû à trois termes : la perte visqueuse, l'émission d'une onde acoustique et l'échange de chaleur entre la bulle et le liquide environnant.

Les ondes ultrasonores sont des variations sinusoïdales de pression. Lorsqu'une microbulle est soumise à des ondes ultrasonores, elle oscille et entre en résonance si la fréquence de l'onde incidente est très proche de sa fréquence caractéristique. Ce couplage va avoir deux effets. Le premier est que la bulle devient une source d'émission d'ondes ultrasonores qui vont pouvoir être détectées par le récepteur d'un échographe. Le second est que le transfert d'énergie de l'onde ultrasonore à la bulle conduit à une atténuation de l'onde incidente. Pour une faible amplitude d'onde et une faible concentration de bulles, le coefficient d'atténuation α est donné par l'équation (I.34) :

$$\alpha = \frac{f^2}{2\pi k} \frac{3X_b}{r_0^2} \frac{\beta f}{(f_0^2 - f^2)^2 + 4(\beta f)^2} \quad (\text{I.34})$$

où f est la fréquence de l'onde incidente, k le nombre d'onde, $k = 2\pi f/c$, X_b la fraction volumique des bulles ; β , somme des effets visqueux, thermique et de réémission, est donné par l'équation (I.35) :

$$\beta = \frac{2\mu}{\rho r_0^2} + 3 \frac{P_g}{4\pi \rho f r_0^2} \text{Im}(\kappa) + \frac{r_0 (2\pi f)^2}{2c} \quad (\text{I.35})$$

L'atténuation est maximale lorsque la fréquence de l'onde acoustique est égale à la fréquence de résonance de la bulle (Figure 5).

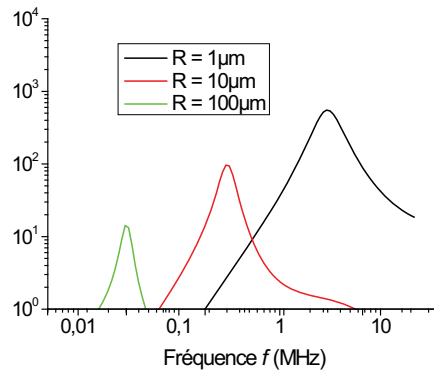


Figure 5: Variation du coefficient d'atténuation en fonction de la fréquence, pour des ondes ultrasonores traversant des dispersions de microbulles de diamètre 100, 10 et 1 μm ^[46]. La concentration des bulles est 0.1% v/v.

I.3. Les monocouches de phospholipides comme modèle simplifié du surfactant pulmonaire

Le surfactant pulmonaire (SP) a fait l'objet de nombreuses études depuis le début du siècle dernier. En 1929, Kurt von Neergard a découvert l'importance de la tension interfaciale sur la mécanique des poumons. Il a émis l'hypothèse que les alvéoles contiennent un matériau tensioactif spécifique capable d'abaisser leur tension interfaciale. Nous disposons à présent de beaucoup d'informations sur la composition du SP ainsi que sur l'importance de ses fonctions. Deux maladies extrêmement graves, le syndrome de détresse respiratoire néonatal (RDS) et le syndrome de détresse respiratoire aigu (ARDS), proviennent du mauvais fonctionnement de ce surfactant. Le SP est un mélange complexe de lipides et de protéines qui forment une monocouche à l'interface entre l'alvéole pulmonaire et l'air ^[47, 48]. Il est synthétisé dans le réticulum endoplasmique des pneumocytes de type II et est stocké dans le cytoplasme sous forme de corps lamellaires avant d'être sécrété dans l'espace alvéolaire par exocytose ^[49]. Son rôle principal est de réduire la tension interfaciale air/liquide créée par la fine couche de liquide se trouvant à la surface des alvéoles pulmonaires. La réduction de tension facilite l'expansion des alvéoles à l'inspiration et les maintient ouvertes pendant l'expiration.

Les fluorocarbures ont un fort potentiel en médecine et pour la recherche biomédicale. ^[50-53] En particulier, la découverte récente d'un effet fluidifiant de FC gazeux sur un film de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), qui est le composant majeur du SP, a ouvert des perspectives de développement de nouveaux substituts de surfactants pulmonaires ^[54, 55]. La DPPC, en l'absence des protéines qui l'accompagnent normalement, forme des films semi-cristallins lors de l'expiration, qui se ré-étalent difficilement à la surface des alvéoles pulmonaires lors de l'inspiration. Le FC, en empêchant la formation de la phase semi-cristalline du phospholipide, ou en la dissolvant si elle est déjà formée, pallie cette déficience ^[54, 56]. Une étude a également montré que le FC limitait l'insertion de l'albumine dans une monocouche de DPPC ^[57].

I.3.1. Surfactants pulmonaires

I.3.1.1. Composition du surfactant pulmonaire natif

La composition du surfactant pulmonaire (SP) des différentes espèces animales est assez similaire. Il se compose d'environ 90% de lipides et 10% de protéines en poids (Figure 6) ^[58].

La quantité de protéines est faible, mais celles-ci sont très importantes pour l'activité normale des poumons. Il y a quatre protéines spécifiques : SP-A, SP-B, SP-C, SP-D [59]. SP-A est la protéine la plus abondante. SP-A et SP-D sont des grosses protéines hydrophiles [60-62], tandis que SP-B et SP-C sont des petites protéines hydrophobes [63, 64].

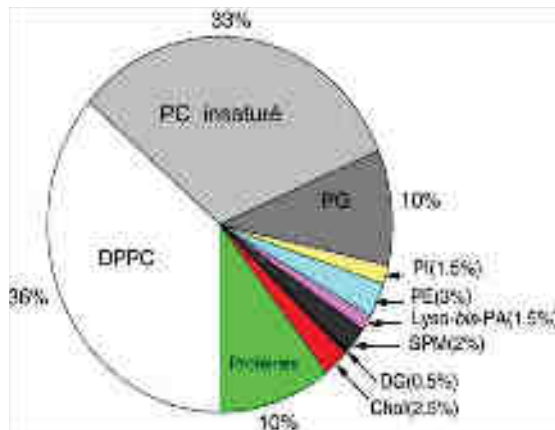


Figure 6 : La composition du surfactant pulmonaire bovin [65]. DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine. PC : phosphatidylcholine. PG : phosphatidylglycérol. PI : phosphatidylinositol. PE : phosphatidyléthanolamine. Lyso-bis-PA : acide lyso-bisphosphatidique. SPM : sphingomyéline. DG : diacylglycérol. Chol : cholestérol

La majorité des lipides (90% à 95%) du surfactant pulmonaire sont des phospholipides (PLs) et seulement une petite quantité (5 - 10 %) est constituée de lipides neutres, principalement des cholestérols. Parmi les PLs, les phosphatidylcholines (PC) sont les plus abondantes et représentent 80% des PLs totaux. La dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), qui est un PL zwitterionique à chaîne saturée constitue environ 36% des PC [65]. La DPPC est le principal composant du SP, responsable de la diminution de la tension interfaciale entre les alvéoles pulmonaires et l'air. Les autres PCs présents en quantité significative sont le palmitoylmyristoylphosphatidylcholine (PMPC) et de PCs insaturés.

1.3.1.2. Rôles du surfactant pulmonaire

La fonction principale du surfactant pulmonaire est de former une monocouche à la surface des alvéoles, qui diminue la tension interfaciale. Il contribue au bon fonctionnement de la respiration en réduisant l'énergie nécessaire pour gonfler les poumons lors de l'inspiration et diminuant la probabilité de collapsus des alvéoles pulmonaires pendant l'expiration [65]. La DPPC est le composant majoritaire du surfactant pulmonaire. Elle est capable de générer une tension interfaciale proche de zéro à l'interface entre l'alvéole pulmonaire et l'air durant l'expiration. Cependant, la DPPC s'adsorbe très lentement à l'interface eau/air pour former une monocouche et elle est donc incapable d'agir seule en tant qu'agent de remplacement du surfactant. La présence de phospholipides insaturés et de protéines dans le surfactant pulmonaire natif (Figure 7) compense ces limitations [66, 67]. Ils apportent une fluidité suffisante, qui est très importante pour permettre l'adsorption du SP. En outre, SP-B et SP-C sont très efficaces dans la promotion de l'adsorption des surfactants

lipidiques sur des monocouches partiellement remplies, et permettent que la tension interfaciale d'équilibre soit rapidement atteinte. Pendant la formation du film de lipides, SP-B et SP-C réalisent cette fonction par interaction avec SP-A [68]. SP-A règle la quantité de surfactant dans les alvéoles, accélère aussi l'adsorption de surfactants à l'interface et augmente la réaction de défense qui dépend des macrophages. Il empêche aussi l'inhibition du surfactant par les protéines non tensioactives.

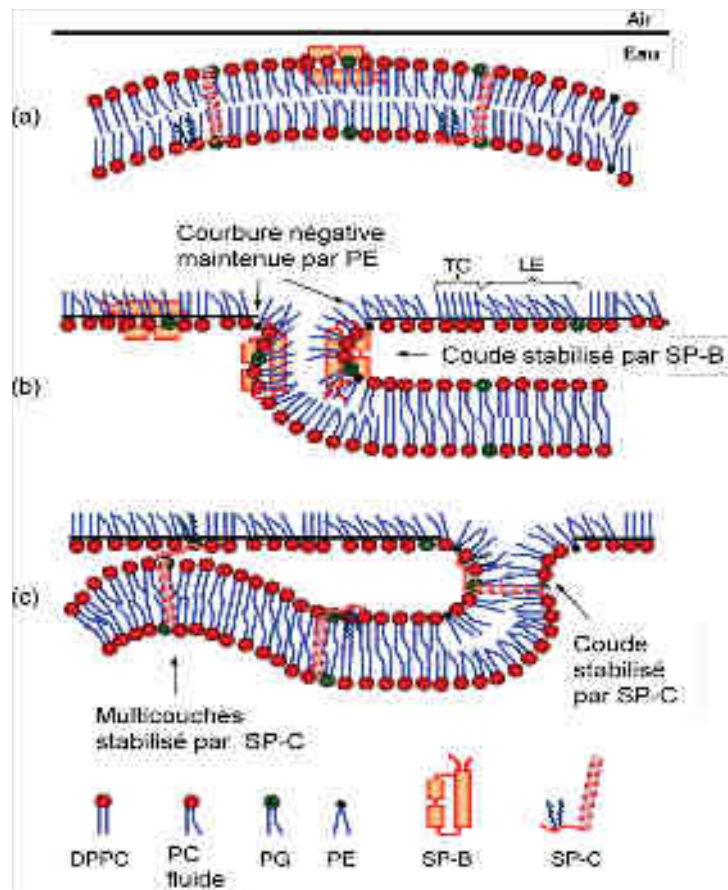


Figure 7 : L'adsorption du surfactant pulmonaire. (a) Diffusion de vésicule/bicouche vers l'interface eau/air. (b) Fusion de vésicule/bicouche à l'interface, stabilisé par SP-B. (c) Fusion de vésicule/bicouche à l'interface, stabilisé par SP-C [65].

Le rôle des autres constituants lipidiques du surfactant pulmonaire est moins bien défini. Le cholestérol augmente la viscosité de la monocouche et favorise la dispersion des domaines cristallins de DPPC dans la phase fluide du surfactant [69].

1.3.1.3. Déficience en surfactant pulmonaire

Le surfactant pulmonaire stabilise le poumon par la diminution de la tension interfaciale entre l'air et des alvéoles, en particulier pendant l'expiration. De plus, la surface des alvéoles, en condition normale, est toujours maintenue très élevée pour un échange efficace des gaz.

S'il y a insuffisance de surfactant pulmonaire (quantité de surfactant inadéquate ou surfactant présent inactif), le travail nécessaire à la respiration augmente, la réouverture des alvéoles pulmonaires ne se fait pas correctement et les échanges gazeux sont inadaptés. Ceci peut conduire aux syndromes RDS (syndrome de détresse respiratoire néonatal) et ARDS (syndrome de détresse respiratoire aigu).

Le RDS est dû à une déficience primaire en surfactant pulmonaire. La physiopathologie du RDS est liée à une immaturité des fonctions de synthèse des pneumocytes de type II chez les bébés prématurés. Au contraire, l'ARDS est lié à une déficience secondaire en surfactant pulmonaire. Il est dû à une réaction inflammatoire pulmonaire directe ou à la propagation d'une réaction inflammatoire systémique aux poumons à travers les capillaires pulmonaires. Parmi les atteintes pulmonaires directes, les infections pulmonaires et l'aspiration de liquide gastrique sont les plus fréquentes, tandis que les septicémies et les polytraumatismes avec transfusions multiples sont les causes les plus usuelles des atteintes pulmonaires indirectes. Les deux maladies, RDS et ARDS, sont la cause d'une mortalité importante. Il est donc nécessaire de remplacer le SP déficient par une thérapie basée sur l'administration de surfactants exogènes.

Les surfactants exogènes peuvent être classés en deux catégories selon qu'ils contiennent, ou non, les protéines spécifiques du surfactant (SP-B et SP-C). Les préparations qui contiennent les protéines SP-B et SP-C sont des préparations naturelles isolées de poumons bovin (Survanta[®], Alveofact[®]) ou porcine (Curosurf[®]). Ils ne contiennent pas les protéines SP-A et SP-D, car elles sont éliminées par les procédés d'extraction et de purification. La DPPC est le phospholipide majoritaire dans ces préparations. De plus, il existe également des surfactants synthétiques qui contiennent le SP-C (VenticuleTM) ou un peptide présent dans la protéine SP-B (SurfaxinTM). Les préparations qui ne contiennent pas les protéines spécifiques du surfactant sont des préparations synthétiques à base de DPPC (Exosurf[®]).

Les surfactants exogènes qui contiennent les protéines spécifiques sont efficaces dans le traitement de RDS et ARDS. Ils améliorent de manière significative la fonction pulmonaire mais il reste de nombreuses limitations. Le coût de ces produits est très élevé à cause de la complexité de leur méthode de préparation. De plus, si les surfactants sont d'origine bovine ou porcine, ils comportent des risques potentiels de contaminations virales ou bactériennes, et des risques immunologiques. Les préparations qui ne contiennent pas de protéines spécifiques sont moins coûteuses, facile à produire, mais elles sont aussi moins efficaces.

I.3.2. Propriétés spécifiques des perfluorocarbures

I.3.2.1. Caractéristiques physico-chimiques

La plupart des propriétés des chaînes fluorées résultent des caractéristiques spécifiques de l'atome de fluor (Tableau 1) : sa forte électronégativité, sa faible polarisabilité, sa liaison très forte avec le carbone due à un très bon recouvrement de leurs orbitales 2s et 2p respectives.

Tableau 1 : Paramètres atomiques de l'atome de fluor comparés à ceux d'autres atomes ^[70].

Atome	Potentiel d'ionisation (kcal mol ⁻¹)	Affinité électronique (kcal mol ⁻¹)	Polarisabilité atomique (Å ³)	Rayon de van der Waals (Å)	Electronégativité de Pauling X_P
H	313,6	17,7	0,667	1,20	2,20
F	401,8	79,5	0,557	1,47	3,98
Cl	299,0	83,3	2,18	1,75	3,16
Br	272,4	72,6	3,05	1,85	2,96
I	241,2	70,6	4,7	1,98	2,66
C	240,5	29,0	1,76	1,70	2,55
N	335,1	-6,2	1,10	1,55	3,04
O	314,0	0,82	0,82	1,52	3,44

Ainsi la liaison carbone-fluor est celle qui possède l'énergie de cohésion intramoléculaire la plus forte (487 kJ mol⁻¹ dans un CF₄ contre 418 kJ mol⁻¹ dans un CH₄). Cette liaison est même renforcée par ajout d'atomes de fluor jusqu'à une énergie maximale de 531 kJ mol⁻¹ dans le groupe CF₃ ^[71]. La taille de l'atome de fluor permet également, en partie d'expliquer les propriétés particulières des chaînes fluorées. Atome relativement petit, son rayon de Van der Waals (1.47 Å) est cependant beaucoup plus élevé que celui de l'hydrogène (1.20 Å). La section transversale des FC, par conséquent, est plus grande (30 Å² comparé à 20 Å²) (Figure 8) ^[72]. Les chaînes perfluoroalkylées sont plus rigides que leurs analogues hydrocarbonés. En raison de la faible polarisabilité du fluor, les interactions de van der Waals avec les chaînes fluorées sont extrêmement faibles.

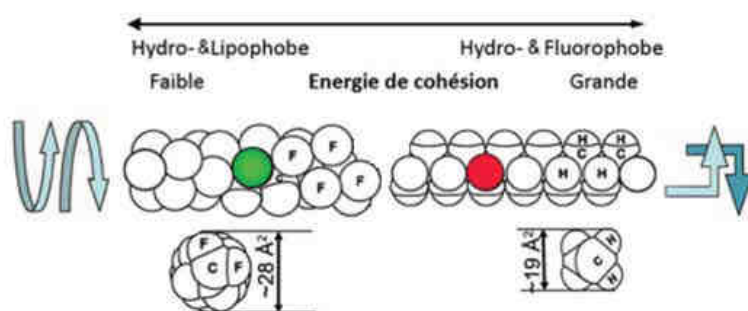


Figure 8 : Représentation d'une chaîne fluorée et d'une chaîne hydrocarbonée ^[73].

Les fluorocarbures possèdent des propriétés physico-chimiques remarquables parmi lesquelles de faibles interactions intermoléculaires, une rigidité, une compressibilité et une stabilité plus importantes que celles de leurs analogues hydrocarbonés. Les constantes diélectriques des fluorocarbures et leurs indices de réfraction sont très faibles. Ils combinent une hydrophobie extrême avec une lipophobie prononcée, à l'origine de leur très faible tension interfaciale ; l'énergie de cohésion est faible permettant une importante capacité de dissolution des gaz, d'excellentes propriétés d'étalement et une grande fluidité ainsi que des pressions de vapeur élevées ^[74, 75].

1.3.2.2. Les tensioactifs fluorés

Les tensioactifs fluorés sont connus pour avoir une activité de surface très forte, plus importante que celle de leurs homologues hydrogénés ^[76]. Ils s'auto-assemblent dans l'eau et aux interfaces, et diminuent la tension interfaciale jusqu'à des valeurs très faibles, typiquement 15 ou 20 mN m^{-1} contre $30-40 \text{ mN m}^{-1}$ pour les tensioactifs hydrogénés. La cmc des tensioactifs fluorés est plus basse que celles de leurs homologues hydrogénés, avec une valeur de cmc équivalente à celles des agents tensioactifs hydrocarbonés ayant une chaîne plus longue de 50% ^[77]. Les chaînes fluorées ont aussi des effets sur la morphologie des micelles qui tendent à avoir la forme de bâtonnets. Cela a été prédit par des calculs basés sur la géométrie des amphiphiles fluorés ^[78] et confirmé par des données expérimentales sur des amides polyéthoxylés fluorés ^[79, 80].


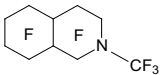
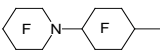
1.3.2.3. Biocompatibilité des fluorocarbures

Les fluorocarbures utilisés dans le domaine biomédical ont des structures variées. Ils peuvent être linéaires ou cycliques, et contenir des atomes d'hydrogène, d'azote ou d'halogène. Les fluorocarbures sont biologiquement très inertes (faible toxicité, absence

d'effets cancérogènes, mutagènes ou tératogènes). Ils ne provoquent pas de réactions immunologiques [75, 81, 82].

La pharmacocinétique et les mécanismes d'excrétion des émulsions injectables de perfluorocarbures ont été étudiés en détail [75, 83-86]. Un modèle pharmacocinétique à quatre compartiments a été proposé [86, 87]. Les perfluorocarbures sont stockés temporairement dans les organes du système réticuloendothélial, principalement le foie, la rate et la moelle osseuse, puis vont progressivement réintégrer la circulation sanguine par diffusion à travers les membranes cellulaires. Une partie des perfluorocarbures est temporairement distribuée dans le tissu adipeux où leur persistance est plus importante avant de retourner dans la circulation sanguine. Lorsqu'ils arrivent dans le compartiment sanguin, ils sont pris en charge par les transporteurs lipidiques, principalement par les lipoprotéines et les chylomicrons et sont acheminés vers les poumons où ils sont excrétés sans modification par exhalation. La biocompatibilité d'une classe particulière d'amphiphiles perfluorés, les alcanes semi-fluorés $C_nF_{2n+1}C_mH_{2m+1}$, a été aussi étudiée en détail [73]. Aucune toxicité n'a été décrite pour ces composés. Ils ne sont pas métabolisés et leur demi-vie dans l'organisme est acceptable [88]. Les fluorocarbures les plus connus avec leurs propriétés sont repris dans le Tableau 2 :

Tableau 2 : Perfluorocarbures les plus utilisés pour des applications biomédicales avec quelques-unes de leurs propriétés [75].

Composé	Pression de vapeur saturante à 37°C (kPa)	Température d'ébullition (°C)	Solubilité de O ₂ et CO ₂ (volume % à 37°C)	Demi-vie dans l'organisme (jours)
Perfluorodécaline FDC 	1,66	142	42 142	7
Perfluorotripropylamine FTPA N(C ₃ F ₇) ₃	2,39	131	45 166	65
Perfluoro-N-méthyl décahydro isoquinoléine FMIQ 	0,26	-	42 -	11
Perfluorométhylcyclohexyl pipéridine FMCP 	2,53	168	40 -	90

Bromure de perfluorooctyle PFOB $C_8F_{17}Br$	1,46	143	50 210	4
Bis(perfluorobutyl) éthène F-44E $C_4F_9CH = CHC_4F_9$	1,66	150	50 247	7
1,8-dichloro-perfluorooctane PFDCO $Cl(CF_2)_8Cl$	0,79	155	43 -	7
Perfluorooctyléthane PFOE $C_8F_{17}C_2H_5$	1,53	164	-	-

I.3.3. Fluorocarbures en thérapie pulmonaire

De nombreuses études ont montré que les fluorocarbures ont des effets importants sur le fonctionnement du poumon et aident la délivrance de médicaments à cet organe. La ventilation liquide par les fluorocarbures permet de maintenir les échanges gazeux et l'équilibre acide-base chez les animaux et les humains présentant un dysfonctionnement respiratoire ^[89-91]. En comparaison avec la ventilation gazeuse, la ventilation liquide élimine l'interface gaz-liquide, réduit ainsi la tension interfaciale alvéolaire et conduit à améliorer le bon fonctionnement et l'oxygénation du poumon chez les patients souffrant de troubles respiratoires sévères ^[91]. Des médicaments (bronchodilatateurs, antioxydants, stéroïdes, surfactants exogènes ou agents chimio-thérapeutiques) sont souvent administrés en même temps que le traitement de la ventilation liquide.

Le perfluorocarbure le plus utilisé pour les applications pulmonaires est le bromure de perfluorooctyle (PFOB).^[75] Ce composé a été utilisé dans la majorité des travaux expérimentaux et la totalité des études cliniques. A 37°C, il est caractérisé par une tension interfaciale de 18 mN m⁻¹, une forte densité (1,93), ainsi qu'une forte capacité à dissoudre l'oxygène (50 mL O₂/ 100 mL PFOB) et le dioxyde de carbone (210 mL CO₂ / 100 mL PFOB) ^[92].

I.3.3.1. Effets des fluorocarbures sur la respiration

La réduction de la tension interfaciale alvéolaire apportée par les fluorocarbures facilite le gonflement des alvéoles à l'inspiration et limite leur collapsus à l'expiration. La présence des fluorocarbures liquides, de par leur densité et leur distribution préférentielle dans les zones pulmonaires profondes, favorise également la réouverture des alvéoles pulmonaires effondrées ^[93]. De plus, la présence des fluorocarbures augmente la pression intra-alvéolaire,

diminuant ainsi le flux sanguin pulmonaire au niveau de ces régions faiblement ventilées. De ce fait, le flux sanguin pulmonaire est redistribué vers les régions ventilées ce qui diminue le shunt pulmonaire et permet d'homogénéiser les rapports ventilation – perfusion ^[94].

I.3.3.2. Effets anti-inflammatoires

Plusieurs études *in vitro* ont démontré les propriétés anti-inflammatoires des fluorocarbures. Les fluorocarbures diminuent la production de radicaux libres et de cytokines pro-inflammatoires des monocytes et des macrophages alvéolaires ^[95-97]. Ils diminuent également l'expression des molécules d'adhésion (intercellular adhesion molecule 1 : ICAM1, E-sélectine) à la surface des cellules endothéliales ^[98]. Ces effets, encore incomplètement compris, semblent liés à l'effet barrière qu'exercent les fluorocarbures du fait de leurs propriétés physicochimiques.

Les fluorocarbures présentent également une activité anti-inflammatoire pulmonaire *in vivo*. Ils peuvent diminuer la perméabilité vasculaire pulmonaire et limiter ainsi le flux de facteurs inflammatoires dans l'espace alvéolaire ^[99]. Il a également été montré que la ventilation liquide partielle diminue la réponse inflammatoire pulmonaire ^[100] et exerce un effet protecteur sur les pneumocytes de type II ^[101]. L'effet cyto-protecteur des FCs est attribué à une réduction des tensions interfaciales intercellulaires. De plus, de par leur densité, les FCs mobilisent les débris alvéolaires et limitent ainsi la réaction inflammatoire. Plusieurs études histologiques ont mis en évidence une nette diminution de l'infiltrat inflammatoire, des hémorragies et de l'exsudat intra-alvéolaires par rapport à la ventilation mécanique conventionnelle ^[102].

I.3.3.3. Effets sur la croissance pulmonaire

Des études ont montré que la croissance pulmonaire postnatale est accélérée lors d'une administration continue des fluorocarbures pour ventiler les poumons ^[103]. L'effet des fluorocarbures sur la croissance des poumons est attribué à une stimulation mécanique provoquée par des périodes prolongées de ventilation liquide (7 à 21 jours).

I.3.4. Effets des fluorocarbures sur des monocouches de phospholipides

Récemment, Gerber et al ^[54, 56] ont montré les effets des FCs gazeux sur la monocouche de DPPC, le composant majeur du surfactant pulmonaire, en utilisant la technique de la balance de Langmuir. Ces auteurs ont montré que durant l'étalement (inspiration), les molécules de FCs sont susceptibles d'être insérées dans la monocouche ce qui empêche la formation de domaines cristallins de DPPC et faciliter le ré-étalement. Lors de la compression

(expiration), les molécules de FCs sont expulsées, laissant la monocouche de DPPC qui est capable de produire une tension interfaciale proche de zéro. Les molécules de FCs restent très facilement accessibles comme un film condensé liquide mince en dessous de la monocouche de DPPC. Ils ont également montré par des images de microscopie de fluorescence et les spectres de diffraction des rayons X que les FCs gazeux étaient aussi capables d'induire la dissolution des domaines cristallins de DPPC préexistant dans la monocouche. Lorsque ces domaines cristallins sont mis au contact d'un FC gazeux, ils se ré-étaient très rapidement pour former une phase fluide homogène. Cet effet est comparable à l'effet fluidifiant apporté par les protéines dans les surfactants pulmonaires commerciaux.

Dans une autre publication, Gerber et al ^[57] ont prouvé que la présence de fluorocarbures gazeux modifie profondément l'effet de l'albumine sur les compression/expansion et la morphologie de la monocouche de DPPC. Les isothermes de compression et les images de microscopie de fluorescence montrent que le gaz fluoré facilite le ré-étalement d'une monocouche de DPPC collapsée lors de l'expansion sur une sous-phase contenant de l'albumine.

I.3.5. La monocouche de Gibbs : un modèle simplifié de surfactant pulmonaire

Le tensiomètre à goutte permet de former une bulle millimétrique avec une interface air/eau et donc de modéliser l'interface entre une alvéole pulmonaire et l'air. Par cette technique, nous pouvons créer une bulle quasi-sphérique dans une dispersion de DPPC. La température de la cuvette contenant la dispersion, peut être fixée à la température du corps humain, soit à 37 °C. La variation de taille de la bulle (5-20 % de la surface) ainsi que la variation de fréquence (0,03 à 0,3Hz) des oscillations appliquées permettent de simuler approximativement les conditions physiologiques chez l'adulte. L'étude de la variation de la tension interfaciale en fonction de la variation de la taille de la bulle permet également de déterminer les paramètres rhéologiques de l'interface (module viscoélastique). De plus, la monocouche de DPPC est en contact direct avec des vésicules de DPPC dans la phase aqueuse. Des vésicules sont présentes *in vivo* dans le mucus qui tapisse les alvéoles. Elles agissent comme des réservoirs de molécules de DPPC et jouent un rôle important dans les processus de relaxation pendant l'expiration.

Chapitre II

Méthodes expérimentales

II.1. Mesure de la tension interfaciale par analyse du profil de la bulle

II.1.1. Généralités

La mesure de la tension interfaciale est importante pour comprendre la nature des phénomènes qui se passent à l'interface. Le choix de la technique à utiliser dépend de la nature de l'interface, de la rhéologie du liquide, de la gamme des valeurs à mesurer et de la température du système à étudier^[104]. Nous allons présenter deux grands principes de mesure fréquemment utilisés : la mesure de la force de mouillage et la mesure de la forme d'une goutte.

II.1.1.1 Méthode de mesure de la force de mouillage

La méthode est basée sur la mesure de la force engendrée par le phénomène de mouillage. Celle-ci peut être la force nécessaire pour détacher un anneau de la surface du liquide, comme dans la méthode de Du Noüy^[105] dans laquelle l'anneau est tiré jusqu'à ce que le ménisque se brise. La méthode de la plaque de Wilhelmy^[106] mesure la force exercée sur une plaque orientée perpendiculairement à l'interface. Cette dernière est utilisée dans la technique de la « balance de Langmuir » qui est une technique simple et pratique.

L'équation (II.1), qui permet de calculer la tension interfaciale, est l'équation de la force F due au mouillage :

$$F = \gamma l \cos \varphi \quad (\text{II.1})$$

où l est le périmètre mouillé, φ l'angle dynamique de contact et γ la tension interfaciale^[104].

II.1.1.2. Méthode de mesure de la forme de la goutte

Un système est stable quand l'énergie libre est minimale. Pour minimiser l'énergie libre, la surface doit diminuer spontanément et, pour cette raison, les gouttes et les bulles ont toujours tendance à avoir une forme sphérique. L'équation de Laplace-Young (II.2)^[107, 108] donne la relation entre la tension interfaciale (γ), les rayons de courbure principaux (r_1 et r_2) (Figure 9), et la surpression (Δp) à l'intérieur de la goutte ou de la bulle :

$$\Delta p = \gamma \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \quad (\text{II.2})$$

Les mesures de la pression et de la courbure donnent

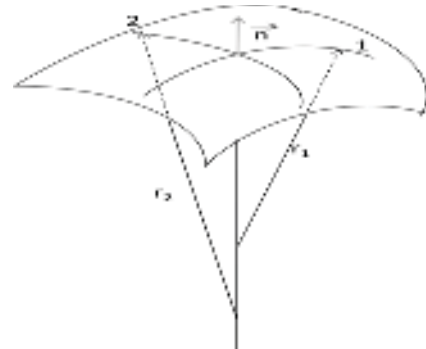
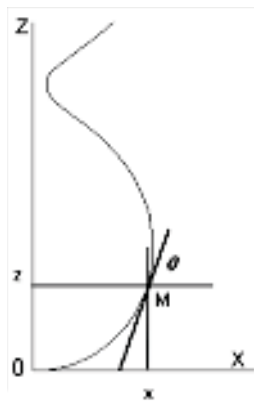


Figure 9 : Schéma représentant les deux rayons de courbure principaux

accès à la tension interfaciale. Comme les pressions sont généralement très faibles, elles sont difficiles à mesurer avec précision. Aussi l'étude de la forme de la goutte permet, par le calcul, d'en déduire la tension interfaciale. Cette méthode est utilisée dans la technique de la goutte pendante, dans celle de la goutte posée et de la goutte captive.

II.1.2. Principe de la méthode

La tension interfaciale entre deux milieux fluides peut être déterminée à partir de l'étude du contour d'une bulle ou d'une goutte présentant une symétrie de révolution (II.1.1.2). Le principe de la méthode est de former une bulle, ou une goutte, dans la solution à mesurer, et de calculer la valeur de la tension à partir de l'expression théorique de la forme de la bulle (goutte) (Figure 10).



Cette forme est déterminée par la combinaison des effets de la tension interfaciale et de ceux de la gravité. La tension interfaciale tend à diminuer la surface de la bulle (goutte) et à lui faire prendre une forme sphérique tandis que la force due à la gravité tend à l'allonger. Au final, la bulle (goutte) a une forme en poire. Lorsque l'importance de ces effets est du même ordre de grandeur, on peut déterminer la tension interfaciale à partir de la forme du contour de la goutte avec une très bonne précision ^[109].

Figure 10 : Profil de la goutte. x et z sont les coordonnées de M sur le contour de la goutte, θ est l'angle de la tangente en M

L'expression analytique du contour d'une goutte est obtenue à partir de deux relations. La première, l'équation de Laplace – Young, traduit que la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la goutte créée par la courbure de l'interface, est proportionnelle aux courbures en M et à la tension interfaciale : (II.3)

$$\Delta p = \gamma \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \quad (\text{II.3})$$

où Δp est la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la goutte, r_1 et r_2 les rayons de courbures principaux de la surface, respectivement, γ la tension interfaciale.

En raison de la symétrie axiale de l'interface en $z = 0$, la courbure est constante dans toutes les directions et les deux rayons principaux sont égaux (II.4).

$$\frac{1}{r_1} = \frac{1}{r_2} = b \quad (\text{II.4})$$

où b est la courbure en ce point.

A partir de l'équation (II.3), la différence de pression (Δp_o) en $z = 0$ peut être exprimée comme (II.5) :

$$\Delta p_o = 2b\gamma \quad (\text{II.5})$$

si la pesanteur est la seule force externe ^[109] Δp est égale à :

$$\Delta p = \Delta p_o + (\Delta\rho)gz = 2b\gamma + (\Delta\rho)gz \quad (\text{II.6})$$

où z est la coordonnée verticale de goutte, $\Delta\rho$ la différence de masses volumiques entre les deux fluides, g l'accélération de la pesanteur.

En normalisant la pression Δp , la courbure b et la coordonnée verticale de goutte z par :

$$\Delta\bar{p} = \frac{\Delta p}{\gamma/r_c}; \quad \bar{z} = \frac{z}{r_c}; \quad \bar{b} = \frac{b}{1/r_c}$$

où r_c est le rayon à l'extrémité du capillaire où est formée la goutte ou la bulle, on obtient (II.7) :

$$\Delta\bar{p} = B_0\bar{z} + 2\bar{b} \quad (\text{II.7})$$

où B_0 est un nombre sans dimension, qui décrit l'importance relative de la gravité par rapport à la force capillaire (II.8) ^[110]

$$B_0 = \frac{\Delta\rho g r_c^2}{\gamma} \quad (\text{II.8})$$

Pour une valeur modérée de B_0 , la forme de l'interface n'est plus sphérique et ne dépend que des valeurs de r_c , de $\Delta\rho$ et de γ . Si nous connaissons les valeurs de r_c et de $\Delta\rho$, nous pouvons déduire la valeur de γ par un algorithme d'optimisation qui donne la valeur des paramètres permettant le meilleur ajustement entre les contours mesurés et la courbe théorique.

II.1.3. Tensiomètre Tracker

Les mesures de tension interfaciale ont été effectuées à l'aide du tensiomètre à bulle Tracker[®] (Teclis, Longessaigne, France) (Figure 11). Pour former une bulle, on injecte au moyen d'une seringue parfaitement verticale (4) un volume de gaz dans une cuvette (3) remplie de la solution à étudier. La bulle est éclairée par une source lumineuse (2) et son image est formée à l'aide d'un objectif sur la partie photosensible d'une caméra CCD (6). L'image numérique est transférée dans la mémoire d'un ordinateur. Un algorithme de traitement d'image permet d'obtenir la position du bord du profil de la goutte. A partir de ce profil, un algorithme d'optimisation permet la détermination de la tension interfaciale. La

seringue, ainsi que la cuve de mesure, sont thermostatées par un bain à circulation. Un couvercle placé sur la cuve permet d'éviter l'évaporation. Tous les paramètres de formation de la bulle sont contrôlés par l'ordinateur. Les résultats des mesures de la tension interfaciale, du volume et de la surface de la goutte, de l'angle de contact et de la température sont affichés en temps réel sur le moniteur de l'ordinateur.

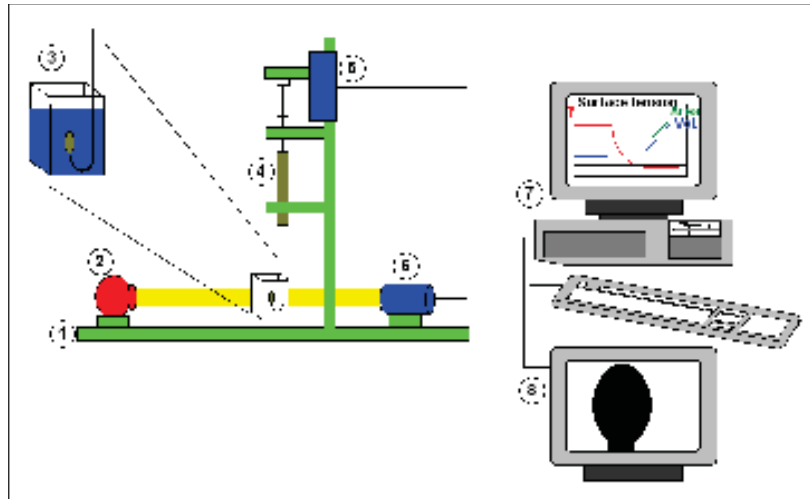


Figure 11: Le tensiomètre à bulle Tracker®. 1. Banc optique, 2. Source lumineuse, 3. Cellule de mesure thermostatée, 4. Seringue, 5. Moteur, 6. Caméra CCD, 7. Ordinateur, 8. Moniteur pour régler la goutte.

L'appareil est facile à manipuler. De petites quantités d'échantillon sont nécessaires pour effectuer la mesure. L'appareil couvre un large domaine de valeurs de tension interfaciale. Les images des bulles sont stockées numériquement et il est possible de reprendre les calculs une fois l'expérience terminée ^[111, 112]. Le principal inconvénient de la méthode découle du principe de la mesure : il faut que la forme de la goutte s'écarte suffisamment de la forme sphérique. Quand la bulle est proche de la forme sphérique, les résultats peuvent être entachés d'une forte inexactitude. En effet, un petit changement de forme conduit à un grand changement de la tension interfaciale ^[109].

II.2. Mesure de la tension interfaciale sous oscillations

La bulle formée à l'extrémité du capillaire est soumise à des oscillations sinusoïdales dont l'amplitude est comprise entre 5% et 20% et dont la fréquence est inférieure à 0,3 Hz. Les variations des valeurs de surface des bulles et de leur tension interfaciale permettent de calculer le module viscoélastique de Gibbs E :

$$E = \frac{d\gamma}{d(\ln A)} \quad (\text{II.9})$$

où γ est la tension interfaciale et A la surface de la bulle.

II.3. Protocole d'étude de l'interface air saturé en fluorocarbure/eau

Le protocole suivant a été mis en place afin de permettre de mesurer de façon reproductible la tension interfaciale entre une bulle d'air saturé en fluorocarbure gazeux et la phase aqueuse. Un volume d'air en contact avec le fluorocarbure liquide est soigneusement prélevé dans un ballon placé dans un bain thermostaté. La seringue est remplie avec l'air saturé en fluorocarbure gazeux en réalisant trois remplissages et vidanges successifs. A chaque température correspond une valeur de pression de vapeur qui peut être déduite, soit d'un abaque, soit de la formule d'Antoine (II.10)^[113]

$$\log P = A - \frac{B}{T + C} \quad (\text{II.10})$$

où P est la pression de vapeur (Pa), T est la température (°K), A , B , C sont les coefficients d'Antoine.

II.4. Détermination de la taille des microbulles

II.4.1. Mesure acoustique de la taille de microbulles en dispersion aqueuse

Le principe de la mesure est de déterminer la fréquence de résonance des microbulles qui est une fonction univoque de leur rayon. Le couplage entre les ultrasons et les microbulles est maximum lorsque la fréquence ultrasonore est égale à la fréquence de résonance de la bulle. Il en résulte que l'énergie dissipée par l'oscillation des bulles conduit à un maximum d'absorption des ondes acoustiques à cette fréquence. La méthode consiste en une mesure du coefficient d'atténuation α d'ondes ultrasonores traversant une dispersion de microbulles, en fonction de la fréquence d'émission. Les équations qui permettent de calculer la fréquence de résonance (f_0) ainsi que le coefficient d'atténuation (α) ont été présentées dans le Chapitre I, paragraphe I.2.3 (équations I.33, I.34, I.35).

Les fréquences utilisées vont de 0,3 à 6,6 MHz, ce qui correspond aux fréquences de résonance de microbulles dans l'eau dont la taille est comprise entre 0,4 μm et 10 μm . A partir du spectre d'atténuation obtenu, la distribution de taille des microbulles et son évolution au fil du temps sont déterminées.

La cellule (Figure 12) est composée de deux transducteurs piézo-électriques circulaires collés sur deux lames de verre opposées. Le transducteur émetteur est relié à un générateur de signaux. Sept impulsions successives d'ondes courtes ($\sim 10 \mu\text{s}$) sont émises à des fréquences centrales de $\sim 0,45$; 0,75 ; 1,2 ; 2,4 ; 3,3 ; 5,7 et 6,6 MHz. Le transducteur récepteur reçoit les signaux après passage à travers la solution étudiée et les convertit en signaux électriques. Le

signal reçu est pré-amplifié, numérisé et enregistré sur un ordinateur. Le spectre de fréquence est obtenu en réalisant la transformée de Fourier du signal numérisé à l'aide de l'algorithme FFT (Fast Fourier Transform) standard. Comme l'onde acoustique doit traverser quatre interfaces (émetteur/verre, verre/eau, eau/verre et verre/récepteur), le signal, au niveau du transducteur récepteur, présente plusieurs pics à cause des réflexions multiples de l'onde ultrasonore dans la cellule. Seul le premier pic du signal transmis, qui correspond au plus court trajet de l'onde acoustique, est pris en compte dans le traitement. Pour obtenir la contribution des MB à l'atténuation, le spectre obtenu est divisé par celui obtenu en l'absence de microbulles. La distribution de taille est obtenue par déconvolution du spectre par l'expression théorique du coefficient d'atténuation en fonction de la taille.

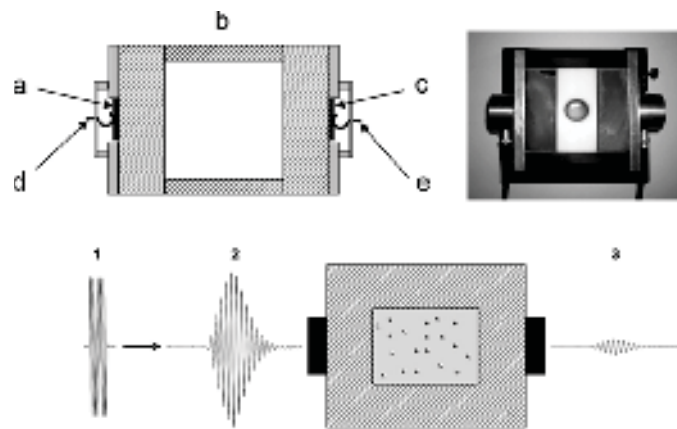


Figure 12: Dispositif acoustique de multifréquence pour l'étude des tailles des microbulles. (a) transducteur émetteur (b) cellule verre (c) transducteur récepteur (d) générateur (e) récepteur.

Pour réaliser une mesure, un petit volume de microbulles est injecté dans une cellule cubique pré-remplie par de l'eau. Les microbulles sont maintenues sous forme de dispersion par un agitateur (~ 250 rpm). La cellule est thermorégulée à 25°C pendant la mesure.

Cette technique présente beaucoup d'avantages. Le principal est que la mesure ne dépend pas du mouvement des bulles. Nous pouvons donc agiter la dispersion afin d'empêcher que les bulles ne remontent à la surface ou s'agrègent. La mesure, effectuée à une puissance acoustique faible, n'altère pas les bulles ce qui permet de suivre leur stabilité en fonction du temps (de quelques secondes à quelques heures). Par rapport à d'autres dispositifs existants^[114, 115], nous avons fait le choix d'émettre sous la forme de sept signaux à bande étroite plutôt que d'un signal à bande large. Ceci augmente la complexité des calculs numériques mais cette stratégie conduit à des résultats beaucoup plus précis.

II.4.2. Diffusion statique de la lumière

La diffusion statique de la lumière (DSL) est une technique qui mesure l'intensité de la lumière diffusée en fonction de l'angle de diffusion pour calculer les distributions granulométriques. La DSL est basée sur les théories de Mie et Fraunhofer ^[116]. Lorsqu'un faisceau de lumière traverse une dispersion de particules, la lumière subit des processus de diffraction, réfraction, réflexion et absorption. Si la taille de particules est nettement plus grande que la longueur d'onde de la lumière incidente (à partir de plusieurs micromètres), le modèle de diffraction de la lumière par des sphères est retenu. Ce phénomène est analysé avec la théorie de Fraunhofer. Si la granulométrie est de taille proche ou inférieure à la longueur d'onde de la lumière incidente, la théorie de Mie est utilisée car elle tient compte des propriétés optiques (réfraction et absorption) des particules. Plus les particules sont petites, plus la contribution de la réfraction et de l'absorption est élevée.

Pour les expériences de DSL, nous avons utilisé l'analyseur granulométrique laser (Beckman Coulter LSTM 13320 MW). Un laser est appliqué pour éclairer la cuvette contenant la dispersion des microbulles. Les microbulles sont maintenues en suspension en agitant. Plusieurs détecteurs sont utilisés pour mesurer la valeur de l'intensité de la lumière en fonction de l'angle de diffusion. A partir de ces valeurs, la taille des bulles peut être calculée.

La diffusion statique de la lumière est une technique largement utilisée car le temps nécessaire pour une mesure est assez court (de l'ordre de quelques min). La gamme de taille mesurée est bien adaptée aux microbulles (de 0,5 μm à quelques μm). Cependant, la forme haute et étroite de la cellule de mesure ne nous permet pas de garder longtemps les bulles en suspension, et donc d'étudier la stabilité des bulles au fil du temps.

II.4.3. Microscopie optique

Un microscope optique (Nikon Eclipse 90i) équipée d'une caméra CCD a été utilisé. La caméra est connectée à un ordinateur, ce qui permet de prendre les images des bulles. A partir de ces images, les rayons ont été calculés en mesurant la surface des bulles, avec le logiciel ImageJ^[117].

Chapitre III : Résultats

Adsorption des phospholipides et/ou des fluorocarbures à l'interface air/eau

Une meilleure compréhension des interactions entre phospholipides et fluorocarbures à l'interface air/eau est nécessaire pour le développement de nouveaux substituts synthétiques du surfactant pulmonaire basés sur les fluorocarbures et des microbulles gazeuses utilisées en échosonographie comme agents de contraste. Nous présentons dans ce Chapitre nos résultats concernant les interactions entre des fluorocarbures gazeux et des monocouches de phospholipides adsorbés à une interface air/eau et en équilibre avec des vésicules du même phospholipide en suspension dans la solution aqueuse. Les monocouches de lipides sont adsorbées à la surface d'une bulle millimétrique et étudiées par tensiométrie d'analyse de profil.

La section III.1 concerne les fluorocarbures adsorbés seuls (sans phospholipides) à la surface de l'eau ; une série d'hydrocarbures a aussi été étudiée à des fins de comparaison. La section III.2 présente l'influence d'un fluorocarbure apolaire, le perfluorohexane, sur l'adsorption d'une série de phosphatidylcholines possédant différentes longueurs de chaînes hydrophobes. L'effet de deux autres fluorocarbures utilisés dans la pratique médicale, le bromure de perfluorooctyle et le perfluorooctyléthane, a aussi été étudié. Afin de se rapprocher de la réalité physiologique de la respiration, nous avons soumis une monocouche de dipalmitoylphosphatidylcholine à des oscillations périodiques prolongées (Section III.3). Enfin, nous avons étudié l'adsorption compétitive de l'albumine et de la dipalmitoylphosphatidylcholine à l'interface air/eau sous oscillations (Section III.4).

III.1. Adsorption d'hydrocarbures et de fluorocarbures en phase gaz

Les fluorocarbures étant, avec les phospholipides, un composant essentiel de notre travail, nous avons tout d'abord étudié l'influence des fluorocarbures gazeux à une interface air/eau dénuée de toute substance amphiphile. Nous commencerons par exposer l'état de l'art sur l'adsorption des hydrocarbures à la surface de l'eau. Nous présenterons ensuite nos résultats sur le comportement

III.1.1. Etat de l'art

La surface d'un liquide est homogène et donc idéale pour des études d'adsorption. L'adsorption de molécules sous forme gazeuse à la surface de l'eau a été étudiée par des mesures de tension interfaciale en fonction de la pression partielle. Ces études montrent que l'adsorption des composés à l'interface air/eau dépend fortement de leur nature.

Ottewill *et al.* ont étudié l'adsorption d'hydrocarbures (saturés linéaires, saturés ramifiés et insaturés cycliques) à la surface de l'eau, à l'aide de la méthode de la plaque de Wilhelmy^[118, 119, 120]. Les énergies libres, les enthalpies et les entropies d'adsorption ont été calculées à partir des mesures de tensions interfaciales effectuées à différentes températures. Les hydrocarbures pénètrent l'interface et modifient la structure de l'eau proche de la surface. Pour des pressions partielles élevées, des gouttelettes en forme de lentille sont formées par le toluène, alors que des *n*-alcane tels que le pentane, l'hexane ou l'heptane peuvent former des multicouches à la surface. En utilisant la méthode du capillaire, C. Jho *et al.* ont étudié l'adsorption d'hydrocarbures gazeux (méthane, éthylène, éthane, *n*-butane, isobutane) et du dioxyde de carbone à l'interface avec l'eau à différentes températures^[121]. Les mesures ont été effectuées en fonction de la pression. Les paramètres thermodynamiques ont été calculés à partir des isothermes d'adsorption. Le méthane présente une isotherme caractéristique de la formation d'une monocouche, alors que les isothermes des gaz de masses moléculaires plus élevées sont caractéristiques de la formation de multicouches. Plus récemment, Roth *et al.* ont mesuré l'adsorption à la surface de l'eau d'un grand nombre de composés organiques sous forme vapeur par chromatographie gazeuse sur phase inverse^[122]. Les coefficients d'adsorption $K_{i \text{ eau/air}}$ ont été déterminés. Un modèle général d'adsorption a été présenté pour la prédiction de l'adsorption des vapeurs des composés organiques.

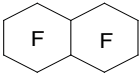
Nous pouvons trouver dans la littérature les coefficients d'adsorption de nombreux hydrocarbures. Cependant aucune étude, à notre connaissance, ne traite de l'adsorption des fluorocarbures. Nous avons donc réalisé les expériences que nous présentons dans cette partie

afin de caractériser les échanges d'un fluorocarbure à l'interface entre l'eau et l'air. Pour déterminer les coefficients d'adsorption des vapeurs de fluorocarbure, nous avons mesuré, à l'aide du tensiomètre Tracker, la tension interfaciale air/eau en fonction de la pression partielle des fluorocarbures présents dans l'air. L'adsorption à l'interface des fluorocarbures est comparée à celles des hydrocarbures.

III.1.2. Matériels et méthodes

Une solution de tampon HEPES (20 mM) $C_8H_{18}N_2O_4S$ (N-[2-hydroxyéthyl] piperazine -N'- [2-ethanesulfonic acide] ($M = 238.3$, $pK_a = 7,5$) est préparée dans une solution de 150 mM NaCl (Eau MilliQ, tension interfaciale $71,7 \pm 0,2 \text{ mN m}^{-1}$ à 20°C). Le pH de la solution est ajusté à 7,4 avec NaOH 0,1 N. La tension interfaciale d'équilibre du tampon est $69,7 \pm 0,2 \text{ mN m}^{-1}$ à 25°C . Les caractéristiques des hydrocarbures et des fluorocarbures utilisés sont données dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques des hydrocarbures et des fluorocarbures utilisés^[75]

Composé	Formule	Masse moléculaire	Pression de vapeur saturante (25°C) (kPa)	Température d'ébullition (°C)
Pentane	C_5H_{12}	72	70,26	36.0
Hexane	C_6H_{14}	86	20,13	68.7
Octane	C_8H_{18}	114	1,89	125,7
Perfluoropentane (PFP)	C_5F_{12}	288	86,79	29.2
Perfluorohexane (PFH)	C_6F_{14}	338	30,39	57
Perfluorooctane (PFO)	C_8F_{18}	438	5,17	102
Bromure de perfluorooctane (PFOB)	$C_8F_{17}Br$	499	0,867	143
Perfluorooctyl éthane (PFOE)	$C_8F_{17}C_2H_5$	445	0,347	164
Bis(perfluorobutyl)éthène (F-44E)	$C_4F_9CH=CHC_4F_9$	464	0,678	150
Perfluorodécaline (FDC)		462	0,920	142

Les tensions interfaciales ont été mesurées par le tensiomètre Tracker (Teclis, Longessaigne, France) à 25°C. Le principe de la méthode a été présenté au chapitre II.

Calcul de la pression de vapeur des gaz en fonction de la température

Les pressions de vapeur des composés gazeux varient en fonction de la température à laquelle le mélange est réalisé. Nous avons utilisé l'équation d'Antoine (III.1) pour calculer la pression partielle des fluorocarbures à partir de la température du mélange :

$$\log P = A - \frac{B}{T + C} \quad (\text{III.1})$$

où P est la pression de vapeur (Pa), T est la température (°K), A, B, C sont les coefficients d'Antoine, dépendant de la température.

Les valeurs de A, B et C sont données dans le Tableau 4 pour différents gaz.

Tableau 4 : Valeurs des coefficients d'Antoine ^[123]

Composés	A	B	C
Pentane	3,98920	1070,617	-40,454
Perfluoropentane	4,30216	1130,731	-38,982
Hexane	4,00266	1171,53	-48,784
Perfluorohexane	4,07362	1113,329	-56,472

On calcule la concentration molaire du gaz c_M grâce à l'équation des gaz parfaits (III.2)

$$PV = nRT \quad (\text{III.2})$$

où V est le volume de gaz (m³), n le nombre de moles (mol) et $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Calcul du coefficient d'adsorption des gaz

A l'équilibre, le nombre de molécules qui quittent la surface par unité de temps doit être égale au nombre de celles qui s'adsorbent à la surface, venant de la phase gazeuse. Nous avons l'équation (III.3) :

$$\alpha \Gamma = (1 - s\Gamma)\beta c \quad (\text{III.3})$$

où α est la probabilité par unité de temps pour qu'une unité de surface possédant une seule molécule devienne vide, Γ la concentration des molécules à la surface, s la surface occupée par une molécule, β la probabilité par unité de temps pour qu'une molécule seule dans un

volume unité vienne s'adsorber sur une surface unité, c la concentration volumique des molécules dans la phase gazeuse, et $(1 - s\Gamma)$ la valeur de la surface libre de molécules.

Le coefficient d'adsorption des gaz ($K_{i/a}$) est défini par l'équation (III.4) :

$$K_{i/a} = \frac{\beta}{\alpha} \quad (\text{III.4})$$

On a

$$s\Gamma = (1 - s\Gamma) K_{i/a} c s \quad (\text{III.5})$$

D'autre part, dans l'équation de Langmuir (voir chapitre I)

$$s\Gamma = \frac{Kc}{1 + Kc} \quad (\text{III.6})$$

K est la constante d'équilibre d'adsorption définie comme la surface moyenne occupée par une molécule.

Nous avons donc la relation (III.7) :

$$K = K_{i/a} s \quad (\text{III.7})$$

III.1.3. Résultats

Dans un premier temps, on a mesuré les adsorptions de deux hydrocarbures (pentane et hexane) et de deux fluorocarbures (perfluoropentane et perfluorohexane), à l'interface gaz/eau, en fonction de leur pression partielle. Les pressions partielles des gaz ont été obtenues en faisant le mélange de l'air avec les vapeurs des liquides organiques étudiées à quatre températures.

Pour tous les composés, les tensions interfaciales chutent immédiatement et sont très rapidement constantes. Les vitesses d'adsorption sont plus rapides que dans le cas d'un liquide parce que le coefficient de diffusion de translation d'un gaz est environ quatre fois plus grand que celui d'un liquide. L'insertion des molécules à la surface est aussi favorisée par une vitesse de rotation des molécules plus grandes. Les tensions à l'équilibre sont plus faibles pour les fluorocarbures

Nous avons reporté dans les Tableaux 5 et 6 les valeurs des tensions interfaciales à l'équilibre des composés étudiés.

Tableau 5. Adsorption du perfluorohexane et de l'hexane à l'interface gaz/eau à 25°C

Température (*) (°C)	perfluorohexane		hexane	
	Pression de vapeur (**) (10 ⁵ Pa)	Tension interfaciale (mN m ⁻¹) ± 0,2	Pression de vapeur (**) (10 ⁵ Pa)	Tension interfaciale (mN m ⁻¹) ± 0,2
5	0,11	69,3	0,08	69,5
10	0,14	68,9	0,10	68,7
15	0,18	67,8	0,13	68,0
20	0,23	67,2	0,16	67,5

*Température à laquelle est effectué le mélange de l'air avec les vapeurs des liquides étudiés

**Les calculs de pressions de vapeur sont basés sur l'équation d'Antoine

Tableau 6. Adsorption du perfluoropentane et du pentane à l'interface gaz/eau à 25°C

Température (*) (°C)	perfluoropentane		pentane	
	Pression de vapeur (**) (10 ⁵ Pa)	Tension interfaciale (mN m ⁻¹) ± 0,2	Pression de vapeur (**) (10 ⁵ Pa)	Tension interfaciale (mN m ⁻¹) ± 0,2
5	0,37	69,1	0,30	69,2
10	0,46	67,9	0,38	67,9
15	0,57	67,3	0,40	67,2
20	0,71	66,2	0,56	66,6

*Température à laquelle est effectué le mélange de l'air avec les vapeurs des liquides étudiés

**Les calculs de pressions de vapeur sont basés sur l'équation d'Antoine

La Figure 13 montre la variation des pressions de surface Π en fonction de la pression de vapeur pour les différents composés.

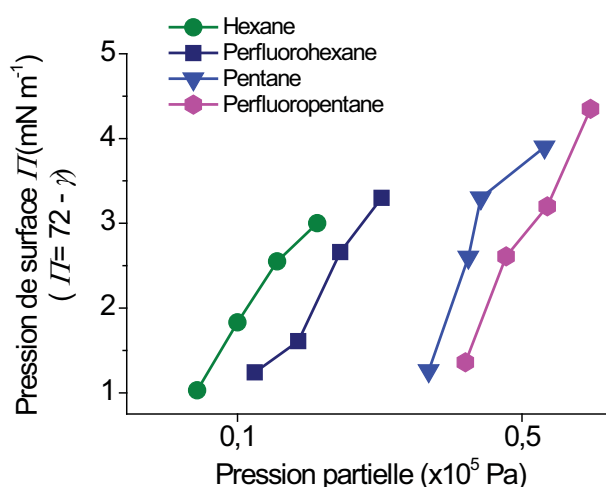


Figure 13: Variation des pressions de surface en fonction de la pression de vapeur pour les fluorocarbures et hydrocarbures adsorbés à l'interface gaz/eau à 25°C.

Ces valeurs permettent de calculer les paramètres d'adsorption ainsi que le coefficient $K_{i/a}$, (Tableau 7).

Tableau 7 : Paramètres d'adsorption des composés à 25°C

Composés	Surface occupée par une molécule (nm ²)	Constante d'interaction	Coefficients d'adsorption ($K_{i/a}$) expérimentale	$K_{i/a}$ ref (25°C)
Hexane	0,93	2,1	$8,68 \cdot 10^{-8}$	$12,6 \cdot 10^{-8}$ [124]
Pentane	0,83	1,8	$2,86 \cdot 10^{-8}$	$6,02 \cdot 10^{-8}$ [124]
Perfluorohexane	0,86	1,5	$7,86 \cdot 10^{-8}$	–
Perfluoropentane	0,83	1,8	$2,4 \cdot 10^{-8}$	–

A pression partielle égale, la tension interfaciale est plus grande pour les chaînes fluorées que pour les chaînes hydrogénées. Le calcul des paramètres à partir du modèle de Frumkin (Chapitre I, paragraphe I.1.3.3) montre que le coefficient d'adsorption des fluorocarbures est plus faible que celui des hydrocarbures, ce qui est en accord avec les plus faibles interactions de van der Waals développées par les chaînes fluorées. La surface occupée par une molécule est plus faible pour les fluorocarbures que pour les hydrocarbures, alors que la section des chaînes est plus faible pour les hydrogénées que pour les fluorées. Comme la surface à prendre en compte est l'aire de la projection orthogonale de la molécule sur l'interface, nous pouvons supposer que les fluorocarbures sont moins parallèles à la surface. Ceci pouvant être expliqué par le fait que leurs interactions sont plus faibles. Cependant, la faible variation des pressions partielles et des tensions interfaciales dans le domaine exploré ne nous permet pas de quantifier cette différence d'orientation entre chaîne fluorée et chaîne hydrocarbonée. Cette étude qui montrait que nous pouvions mesurer l'influence des gaz sur la tension de l'interface air/eau de manière précise, nous a incités à mesurer la modification de la tension interfaciale de l'eau par des vapeurs de fluorocarbure dont certaines avaient montré un effet important sur des lapins atteints d'un syndrome respiratoire aigu.

Nous avons ajouté aux cinétiques du perfluoropentane et du perfluorohexane l'évolution temporelle de la tension du perfluorooctane (pour sa vapeur saturante à 25°C) (Figure 14a). La faible variation de la tension du perfluorooctane, ainsi que son faible point d'ébullition, nous a empêchés de faire une étude aussi complète que pour les deux autres fluorocarbures. On voit néanmoins que sa cinétique d'étalement à l'interface est rapide, mais qu'il abaisse moins la tension de l'eau.

Les fluorocarbures dont le point d'ébullition est $>100^{\circ}\text{C}$ et la pression partielle de l'ordre de quelques kPa à température ambiante (perfluorooctyléthane, bis-perfluorobutyléthène, bromure de perfluorooctyle et perfluorodécane), ont été reportés sur la Figure 14b. Nous observons que la tension interfaciale décroît rapidement pour remonter ensuite lentement en fonction du temps. Le perfluorooctyléthane fait rapidement chuter la tension jusqu'à une valeur de $60,8\text{ mN m}^{-1}$, qui se stabilise ensuite à $61,5\text{ mN m}^{-1}$. Les tensions diminuent jusqu'à $64,4\text{ mN m}^{-1}$ pour le bis-perfluorobutyléthène et à $67,9\text{ mN m}^{-1}$ pour le bromure de perfluorooctyle. Ces tensions remontent à $67,8$ et $69,7\text{ mN m}^{-1}$ pour le bis-perfluorobutyléthène et le bromure de perfluorooctyle, respectivement.

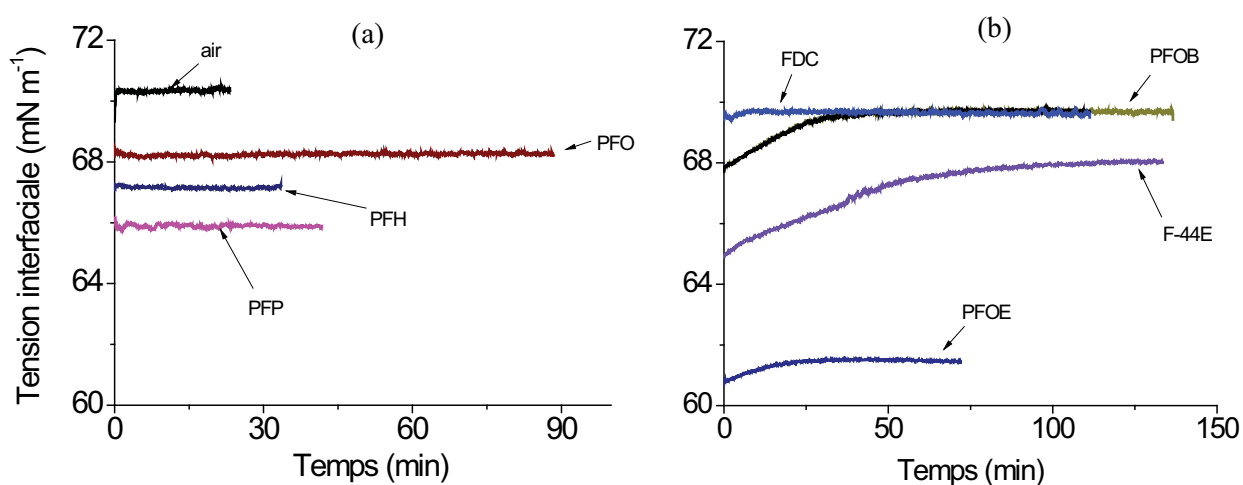


Figure 14 : Cinétiques d'adsorption de fluorocarbures à fortes (a) et faibles (b) pressions de vapeur à l'interface eau/gaz à 25°C .

On peut expliquer ces « remontées » des valeurs des tensions par le fait qu'en raison de leurs très faibles pressions de vapeur, les quantités de fluorocarbure effectivement contenues dans la seringue sont très faibles. Lors de la diffusion des fluorocarbures de la phase gaz dans la phase aqueuse, les concentrations en fluorocarbure ne suffisent pas à saturer l'eau contenue dans la cuve de mesure. Par contre, si l'eau contenue dans la cuve a été mise en contact avec le fluorocarbure suffisamment longtemps pour que l'eau soit saturée, la première décroissance rapide de la tension interfaciale est suivie cette fois d'une seconde phase de décroissance plus lente (Figure 15, Tableau 8).

Il est important de remarquer que les fluorocarbures dont le point d'ébullition est $>100^{\circ}\text{C}$ (perfluorooctyléthane, bis-perfluorobutyléthène, bromure de perfluorooctyle et perfluorodécane) abaissent la tension de manière beaucoup plus importante que les alcanes fluorés (perfluoropentane ou le perfluorohexane). Ces derniers sont pourtant présents en plus grande quantité dans la phase gazeuse.

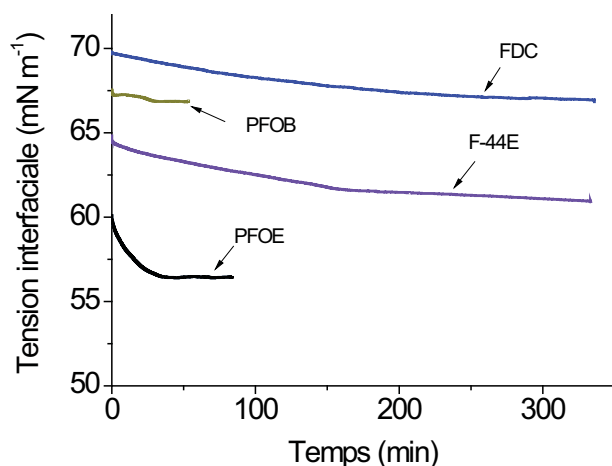


Figure 15 : Cinétique d'adsorption des fluorocarbures à l'interface eau/gaz à 25°C. La solution aqueuse a été saturée avec le fluorocarbure correspondant.

Tableau 8. Valeurs des tensions interfaciales des fluorocarbures gazeux à 25°C

Fluorocarbure	Tension interfaciale (mN m^{-1}) ± 0.2	Pression de vapeur (Pa)
Perfluoropentane	66,1	86793
Perfluorohexane	67,2	30397
Perfluorooctane	68,3	5173
Bromure de perfluorooctyle	66,8	867
Perfluorooctyléthane	56,4	347
Bis-perfluorobutyléthène	60,9	678
Perfluorodécane	69,6	920

En première analyse, nous ne pouvons pas attribuer ce phénomène à l'augmentation de la température d'évaporation. En effet, nous observons pour ces fluorocarbures une valeur de tension qui tend vers celle de l'eau quand la température d'évaporation augmente. Perfluorooctyléthane, bis-perfluorobutyléthène et bromure de perfluorooctyle possèdent un moment dipolaire plus important que celui des alcanes fluorés, ce qui pourrait favoriser leur mise en solution dans l'eau, ainsi qu'une présence plus importante à l'interface gaz/eau. Cependant, il apparaît que la chaîne semi-fluorée (Perfluorooctyléthane) abaisse le plus significativement la tension interfaciale pour arriver à des valeurs faibles (de l'ordre de 50 mN m^{-1}), comparables à celles obtenues avec de réels tensioactifs ayant une tête hydrophile et une chaîne hydrocarbonée.

III.1.4. Conclusion

L'ensemble de ces mesures montre que tous les composés étudiés s'adsorbent à la surface de l'eau, et que les fluorocarbures s'adsorbent moins bien que les hydrocarbures. La variation de tension interfaciale due à l'adsorption des alcanes hydrogéné ou fluoré est faible. Par contre, pour des fluorocarbures qui ont un moment dipolaire forte, comme les alcanes semi-fluorés, la diminution de la tension interfaciale est beaucoup plus importante.

Cette étude a aussi montré que des fluorocarbures dont le point d'ébullition est largement supérieur à 100°C pouvaient s'adsorber à la surface de l'eau, et ensuite se dissoudre dans l'eau. Ceci montre que la technique de mesure utilisée pourrait servir à caractériser le transfert d'une molécule très peu soluble dans l'eau sous forme gazeuse dans une solution aqueuse. Ces expériences devraient pouvoir être utilisées en pharmacologie pour caractériser en laboratoire le transfert d'une molécule sous forme gazeuse par les muqueuses ou les voies respiratoires. Elles pourraient aussi aider à la compréhension de la toxicologie des molécules organiques via la voie aérienne.

III.2. Adsorption des phospholipides en présence de fluorocarbures

III.2.1. Effet du perfluorohexane

L'adsorption dynamique d'une série de phospholipides à une interface entre une solution, ou une dispersion, aqueuse de ces phospholipides et une phase gaz contenant du perfluorohexane, un fluorocarbure non-polaire et non amphiphile, a été étudiée par tensiométrie par analyse de profil de bulle. Les phospholipides étudiés sont la dioctanoylphosphatidylcholine, la dilaurylphosphatidylcholine, la dimyristoylphosphatidylcholine et la dipalmitoylphosphatidylcholine. La phase gaz se compose d'air, ou d'air saturé en perfluorohexane.

De manière inattendue, le gaz fluoré exerce un effet important à la fois sur la vitesse d'adsorption des phospholipides et sur leur tension interfaciale à l'équilibre. Tout d'abord, les valeurs de tension sont significativement réduites (de l'ordre de 10 mN m^{-1}) quand le perfluorohexane est présent dans la phase gaz. L'efficacité du fluorocarbure à diminuer la tension dépend de la capacité du phospholipide à former des micelles ou des vésicules dans l'eau. Cette efficacité dépend aussi de l'état, gel ou fluide, des membranes des vésicules. Ensuite, les vitesses d'adsorption des phospholipides à l'interface (évaluées par le temps nécessaire pour que la valeur initiale de la tension interfaciale soit réduite de 30%) sont significativement accélérées (de cinq fois, environ) par la présence du perfluorohexane, pour les faibles concentrations en phospholipides.

Le fait que le perfluorohexane accélère l'adsorption des phospholipides et abaisse leur tension interfaciale à l'équilibre démontrent que le fluorocarbure a une forte interaction avec la monocouche de phospholipide, et agit comme un co-tensioactif vis-à-vis de ce dernier à l'interface air/eau, et ceci, en l'absence de tout caractère amphiphile.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication intitulée «A non-polar, non-amphiphilic molecule can accelerate adsorption of phospholipids and lower their surface tension at the air/water Interface» et parue dans *ChemPhysChem* en 2011.

A Nonpolar, Nonamphiphilic Molecule Can Accelerate Adsorption of Phospholipids and Lower Their Surface Tension at the Air/Water Interface

Phuc Nghia Nguyen,^[a] Thuan Thao Trinh Dang,^[a] Gilles Waton,^[a] Thierry Vandamme,^[b] and Marie Pierre Krafft*^[a]

The adsorption dynamics of a series of phospholipids (PLs) at the interface between an aqueous solution or dispersion of the PL and a gas phase containing the nonpolar, nonamphiphilic linear perfluorocarbon perfluorohexane (PFH) was studied by bubble profile analysis tensiometry. The PLs investigated were dioctanoylphosphatidylcholine (DiC₈-PC), dilaurylphosphatidylcholine, dimyristoylphosphatidylcholine, and dipalmitoylphosphatidylcholine. The gas phase consisted of air or air saturated with PFH. The perfluorocarbon gas was found to have an unexpected, strong effect on both the adsorption rate and the equilibrium interfacial tension (γ_{eq}) of the PLs. First, for all of the PLs, and at all concentrations investigated, the γ_{eq} values were significantly lower (by up to 10 mN m⁻¹) when PFH was present in the gas phase. The efficacy of PFH in de-

creasing γ_{eq} depends on the ability of PLs to form micelles or vesicles in water. For vesicles, it also depends on the gel or fluid state of the membranes. Second, the adsorption rates of all the PLs at the interface (as assessed by the time required for the initial interfacial tension to be reduced by 30%) are significantly accelerated (by up to fivefold) by the presence of PFH for the lower PL concentrations. Both the surface-tension reducing effect and the adsorption rate increasing effect establish that PFH has a strong interaction with the PL monolayer and acts as a cosurfactant at the interface, despite the absence of any amphiphilic character. Fitting the adsorption profiles of DiC₈-PC at the PFH-saturated air/aqueous solution interface with the modified Frumkin model indicated that the PFH molecule lay horizontally at the interface.

1. Introduction

Various circumstances exist in which films of phospholipids (PLs) are in contact with perfluorocarbons (FCs). These include use of injectable microbubble contrast agents^[1–3] and emulsions for oxygen delivery,^[4–6] drug delivery, and diagnostics.^[7,8] In particular, most of the commercially available injectable soft-shell bubbles contain a perfluoro compound in the gas phase.^[3,9–12] In these systems, monolayers of PLs generally constitute the bubble or emulsion droplet walls. Formulations containing FC or a combination of PLs and FCs have also been proposed to serve as new lung surfactant substitutes^[13] and for the treatment of lung diseases.^[14] The notion that FCs might be useful in lung surfactant replacement preparations rests on the observation that FC gases inhibit the formation of the liquid condensed phase in Langmuir monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine, which remains in the liquid expanded phase.^[15,16] In all of these situations, the potential influence of the FC on the adsorption of the PLs to the air/water interface, and on their dynamic surface-tension properties, is a key issue.

To the best of our knowledge, no data are available on the effects of FC gas on the dynamics of PL adsorption at the air/water interface and on its equilibrium surface tension. The dynamics of adsorption of saturated short-chain diacylphosphatidylcholines (DiC_n-PC, 4 ≤ n ≤ 8) at the air/water interface has been reported.^[17] On the other hand, the study of long-chain PLs with n ≥ 10, which are more relevant to biomedical applications, is complicated by the fact that these PLs form vesicles

in aqueous media at very low concentrations. Thus, adsorption at the air/water interface of the essentially insoluble long-chain PLs involves first a diffusion step of the vesicles to the interface, followed by a reorganization of the PLs of the vesicles to form the interfacial film.^[18–20] The nature of this film, whether a true monolayer^[21,22] or an inhomogeneous superficial mesophase (including bilayers or more complex structures playing the role of “surface-associated reservoirs”),^[18,23–25] is still being debated.

Previous measurements on monolayers of a series of DiC_n-PC (6 ≤ n ≤ 16) at the water/air interface by using the Wilhelmy plate method suggest that the equilibration time is longer than 1 day for PLs with n ≥ 12, which makes measurements at equilibrium difficult.^[26] The discrepancies found among litera-

[a] P. N. Nguyen, T. T. Trinh Dang, Dr. G. Waton, Dr. M. P. Krafft
Systèmes Organisés Fluorés à Finalités Thérapeutiques (SOFFT)
Institut Charles Sadron (CNRS, UPR 22)
Université de Strasbourg
23 rue du Loess, 67034 Strasbourg Cedex 2 (France)
Fax: (+33) 3-88-41-40-99
E-mail: krafft@ics.u-strasbg.fr

[b] Prof. T. Vandamme
Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives (CNRS UMR 7199)
Université de Strasbourg
74 route du Rhin, 67401 Illkirch Cedex (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201100425>.

ture values for “equilibrium surface tensions”, particularly for lipid monolayers formed at a temperature below their gel-to-liquid-crystalline phase-transition temperature (T_m), are thought to arise from the fact that true equilibrium was not attained because of the slowness of the adsorption process.^[22,26] Static measurements of the interfacial tensions of various PLs at a liquid FC/water interface also indicate very slow adsorption for longer PLs.^[26] The dynamics of PL monolayer formation and equilibrium tensions at the water/air interface were also studied by using a micropipette technique.^[27] Due to the small size of the interface, adsorption was then strongly accelerated (≈ 2 min) and the equilibrium tension of all three PLs tested was about 25 mN m^{-1} , that is, essentially the same as the interfacial tension between water and a hydrocarbon.

We report herein an investigation of the kinetics of adsorption of dioctanoylphosphatidylcholine (DiC₈-PC), dilaurylphosphatidylcholine (DLPC), dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) at the interface between a solution or dispersion of these PLs and air, saturated or not with perfluorohexane (C₆F₁₄, PFH). PFH was selected because it was one of the FCs used to stabilize microbubble contrast agents and as a component of synthetic lung surfactant compositions. Bubble profile analysis tensiometry was chosen because it allows measurements over a long timescale and relies on a simple theoretical treatment.^[28] The advantages of this technique over the commonly used captive bubble technique^[28] are that an almost complete bubble is investigated rather than only half a bubble and it eliminates all contact with a surface, in contrast to the captive bubble, which rests on a surface.

The FC was found to significantly accelerate the rate of adsorption of the PLs at the air/water interface and lower the interfacial tension. It is noteworthy that the FC investigated herein, PFH, is linear, devoid of amphiphilic character, and highly hydrophobic. More generally this study demonstrates that a nonpolar molecule can have cosurfactant activity for PLs at the air/water interface.

2. Results and Discussion

2.1 Adsorption of DiC₈-PC in the Presence or Absence of Perfluorohexane

DiC₈-PC is one of the best documented short-chain PLs. Its critical micelle concentration (cmc) is about $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.^[26,29] It forms linear, rod-shaped micelles in water.^[30] A phase separation between two micellar phases has been evidenced in solutions.^[29,31] A study of the dynamic surface tension of aqueous solutions of a series of DiC_{*n*}-PC ($n = 5, 6, 7, 8$) and of the structure of their micelles concluded that there was no effect of the length of the hydrophobic chain of the PL (and hence, of its cmc) on the air/water interfacial tension decay.^[17] No significant effect of the presence, shape, and kinetic stability of the micelles was seen.

In pure water, the time needed for long-chain PLs (DMPC and DPPC) to equilibrate (several days) is prohibitive. PLs adsorb much more rapidly at an air/*N*-2-hydroxyethylpiper-

zine-*N*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) buffer interface than at the air/pure water interface.^[32] For example, γ_{eq} is attained in about 60 min versus about 200 min for DLPC at $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ at 25 °C (Figure S1 in the Supporting Information). It should be noted that the equilibrium surface tension of the PL is essentially the same in the presence [$(25 \pm 1) \text{ mN m}^{-1}$] and absence [$(24 \pm 1) \text{ mN m}^{-1}$] of the buffer. The HEPES buffer system is extensively used for physicochemical and biological investigations;^[33] therefore, all of the experiments were run in this buffer.

Figure 1 shows the adsorption kinetics of DiC₈-PC dissolved in the HEPES buffer at the interfaces with air, and with air satu-

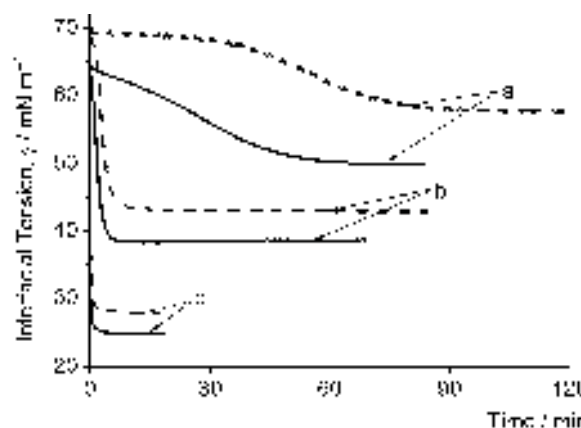


Figure 1. Adsorption kinetics at 25 °C of DiC₈-PC at the PFH-saturated air/HEPES buffer interface (—) compared with those at the air/HEPES buffer interface (----). PL concentrations were a) 5×10^{-7} , b) 1×10^{-6} , and c) $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; further adsorption kinetics curves can be found in Figure S2 in the Supporting Information.

rated with PFH, for three selected concentrations of DiC₈-PC. The whole set of nine concentrations investigated, which range from 7×10^{-7} to $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, are provided in the Supporting Information (Figure S2). For all concentrations, exposure to PFH significantly decreases the equilibrium interfacial tension, γ_{eq} of the PL and strongly accelerates its adsorption (Table 1).

The initial tension value (γ_0) at the air/buffer interface is about 70 mN m^{-1} for all the DiC₈-PC concentrations for which it can be measured (it is not measurable for the highest ones for which the adsorption of the PL is too rapid). In contrast, γ_0 is only about 65 mN m^{-1} at the PFH-saturated air/buffer interface. This difference originates from the fact that PFH alone, in the absence of PL, decreases the tension at the air/buffer interface by a small but significant amount of $(4 \pm 1) \text{ mN m}^{-1}$. The only pertinent parameter that rules the behavior of PFH is its saturated vapor pressure ($2.9 \times 10^4 \text{ Pa}$ at 25 °C). Although the partial pressure of PFH in the bubble modifies the density of the bubble's gas phase, it has no significant effect on its buoyancy. Moreover, taking into account that the dielectric constant of all gases is close to one, the influence of PFH on the polarizability of the gas phase of the bubble is negligible. As a consequence, although the isolated PFH molecule has no amphiphilic character, it nevertheless displays some surface activity.

Table 1. Interfacial tension of DiC₈-PC at the interface between air and HEPES buffer, $\gamma_{\text{eq}}(\text{air})$, or between PFH-saturated air and HEPES buffer, $\gamma_{\text{eq}}^-(\text{PFH})$, at various concentrations, at 25 °C. The final three entries concern concentrations above the cmc.

Concentration [mol L ⁻¹]	$\gamma_{\text{eq}}(\text{air}) \pm 0.5$ [mN m ⁻¹]	$\gamma_{\text{eq}}(\text{PFH}) \pm 0.5$ [mN m ⁻¹]	$\Delta\gamma_{\text{eq}}$ [mN m ⁻¹]
5.0×10^{-7}	57.6	49.8	7.8
1.0×10^{-6}	55.5	48.1	7.4
2.5×10^{-6}	51.2	44.9	6.3
5.0×10^{-6}	46.9	41.1	5.8
1.0×10^{-5}	43.1	38.5	4.6
2.5×10^{-5}	37.1	32.4	4.7
5.0×10^{-5}	31.9	28.7	3.2
1.0×10^{-4}	27.9	24.9	3.0
2.5×10^{-4}	23.9	21.4	2.5
5.0×10^{-4}	24.1	21.4	2.7
1.0×10^{-3}	23.9	21.5	2.4

The efficacy of PFH in terms of decreasing the γ_{eq} value of DiC₈-PC at the interface was quantified by using the difference, $\Delta\gamma_{\text{eq}} = \gamma_{\text{eq}}(\text{air}) - \gamma_{\text{eq}}(\text{PFH})$, between the equilibrium interfacial tensions measured at the air/DiC₈-PC solution interface [$\gamma_{\text{eq}}(\text{air})$] and at the PFH-saturated air/DiC₈-PC solution interface [$\gamma_{\text{eq}}(\text{PFH})$]. This difference was observed to decrease linearly with the logarithm of PL concentration and remained constant ($\Delta\gamma_{\text{eq}} \approx 2.5 \text{ mN m}^{-1}$) after the cmc ($2.5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) was reached (Figure 2). This indicates that, when the PL concentration increases, it eventually overwhelms the tension lowering effect of PFH.

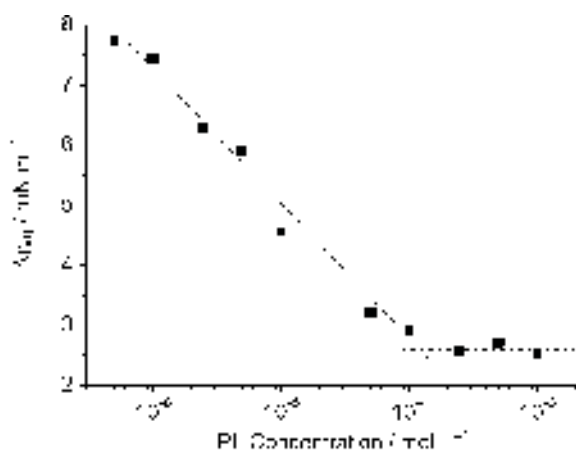


Figure 2. Variation of the difference, $\Delta\gamma_{\text{eq}}$, between the equilibrium interfacial tension values measured in the absence and presence of PFH at the interface between air and DiC₈-PC solution (below the cmc) or dispersion (above the cmc) interface.

The rates of adsorption of DiC₈-PC at the interface were quantified by measuring the time, $t_{30\%}$, after which the initial value γ_0 of the interfacial tension of the PL dispersion decreased by 30%. Figure 3 shows that this time value decreases very significantly for low PL concentrations when PFH is present. The effect levels off at PL concentrations larger than $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

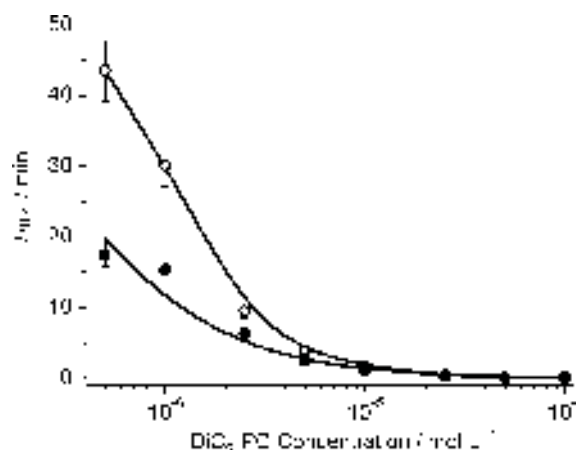


Figure 3. Time required for the interfacial tension, γ , to be reduced by 30%, $t_{30\%}$, at 25 °C as a function of DiC₈-PC concentration at the PFH-saturated air/buffer interface (●) compared with at the air/buffer interface (○).

The presence of PFH in the gas phase does not affect the cmc significantly [$(1.7 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ vs. $(1.6 \pm 0.2) \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ for pure air], as shown in Figure 4. The theoretical variation of

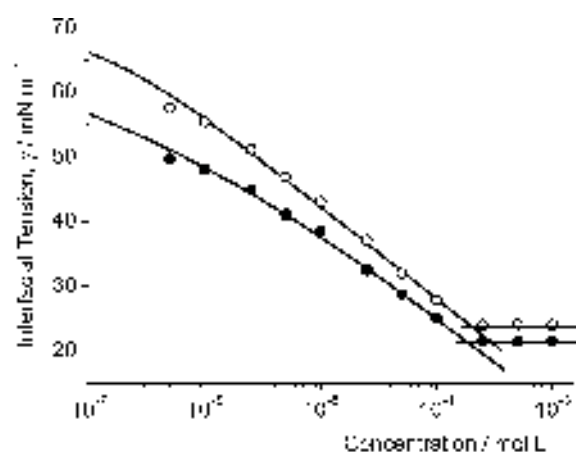


Figure 4. Variation of the interfacial tension, γ , of DiC₈-PC as a function of concentration a) at the air/HEPES interface (○) and b) at the PFH-saturated air/HEPES interface (●). The solid lines (—) represent the theoretical variations calculated by using the Frumkin equations.

the surface tension as a function of PL concentration has been calculated by using the Frumkin equations.^[34,35] The Frumkin model is better adapted than the Gibbs model for the description of the adsorption of DiC₈-PC because it takes into account interactions between molecules. As shown in Figure 4, an excellent fit is found between the theoretical curves and the experimental data.

This fit, in a first step, allowed the following parameters for DiC₈-PC alone to be calculated: the area occupied by one DiC₈-PC molecule at the air/buffer interface, ω_1 (0.6 nm^2), the adsorption equilibrium constant, b_1 ($3.85 \times 10^4 \text{ L mmol}^{-1}$), and the dimensionless interaction constant, a_1 (-4). The negative value of a_1 reflects repulsive interactions among DiC₈-PC molecules when alone at the interface.

In a second step, we considered DiC₈-PC and PFH as two separate molecules that decreased the interfacial tension synergistically. Therefore, we used the modified Frumkin theoretical framework, which took a second surfactant into consideration. This model allowed the determination of the area occupied by the second component at the interface, its adsorption constant, as well as the mutual interaction between the two surfactants, a_{12} . The model took into account the partial pressure of PFH, since the probability of having n PFH molecules at the interface was equal to the probability that one PFH molecule was adsorbed multiplied by the saturated vapor concentration of PFH. The experimental adsorption profiles of DiC₈-PC at the PFH-saturated air/buffer interface could be fitted satisfactorily with the modified Frumkin model, which allowed the parameters for PFH to be extracted. These parameters are the molecular area occupied by one PFH molecule, ω_2 (1 nm²), the equilibrium adsorption constant, b_2 (0.07×10^4 Lmmol⁻¹), and the interaction constant between PL and PFH, a_{12} (4.6). The positive value of a_{12} means that the surface area occupied by DiC₈-PC and PFH, when present at the interface, is smaller than the sum of the surfaces occupied by the two molecules taken separately. This explains why the equilibrium interfacial tensions, γ_{eq} , are significantly lower when PFH is present in the gas phase. Furthermore, it is seen that the PFH equilibrium adsorption constant, b_2 , is much smaller than that of the PL, meaning that the energy of adsorption for PFH is smaller than that for DiC₈-PC. Consequently, the increase in adsorption of DiC₈-PC with concentration results in a concomitant desorption/expulsion of PFH from the interface. Finally, the area occupied by one molecule of PFH is large relative to that of DiC₈-PC (≈ 1 vs. 0.6 nm², respectively). The coverage rate is low, about 20%, which reflects the hydrophobicity of PFH. The area, roughly equal to the longitudinal cross section of the PFH molecule, strongly suggests that the PFH molecules lie horizontally on the interface. The absence of any polar character, such as a dipole moment, prevents any privileged orientation for PFH at the air/water interface. However, the surface tension is dependant on the surface area occupied by one molecule; therefore, the horizontal position is more effective than the vertical one in terms of decreasing the surface tension, and appears to be favored.

2.2. Adsorption of DLPC, DMPC, and DPPC in the Presence or Absence of Perfluorohexane

Contrary to DiC₈-PC, DLPC, DMPC, and DPPC form bilayers and vesicles at very low concentrations. To obtain valid dynamic interfacial measurements, we ran the experiments at concentra-

tions higher than that of the estimated cmc and verified that the dispersions contained similarly sized vesicles. We also verified that there was no significant difference in size stability between vesicles in the gel and in the fluid state. DPPC was selected for an extended study because it allowed investigation over a temperature range that spanned the standard physical states encountered for PL membranes, namely, gel (including the ripple phase) and fluid phases.

2.2.1. Adsorption Kinetics of DPPC

The tensiometry measurements were first performed at 25 and 37 °C, that is, with DPPC in the gel L _{β '} phase (below $T_p = 34$ °C) and in the P _{β '} ripple phase (below $T_m = 41.5$ °C).^[36] Figure 5 and Table 2 show that, at 25 °C, PFH again strongly affects the adsorption profiles of the PL. Both an acceleration of the adsorption process and a decrease of γ_{eq} [$\Delta\gamma_{\text{eq}} = (6.0 \pm 0.5)$ mNm⁻¹]

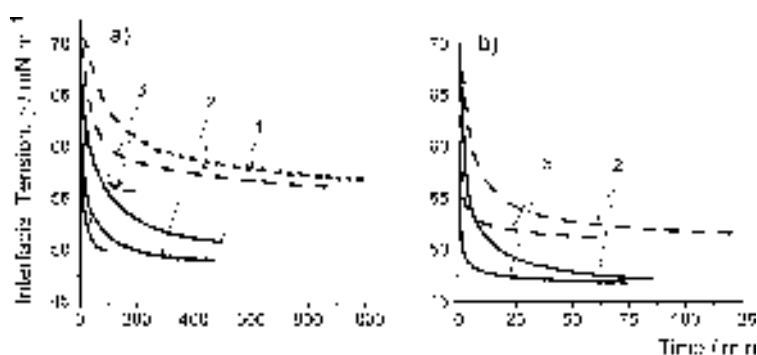


Figure 5. Typical adsorption kinetics at a) 25 °C (gel phase) and b) 37 °C (ripple phase) of DPPC at the air/buffer interface in the presence (—) and absence (----) of PFH. PL concentrations were: 1) 1×10^{-4} , 2) 1×10^{-3} , and 3) 1×10^{-2} mol L⁻¹; kinetics data at 47 °C are provided in Figure S3 in the Supporting Information.

Table 2. Interfacial tensions of DPPC at the interfaces between air and HEPES buffer, $\gamma_{\text{eq}}(\text{air})$, and PFH-saturated air and HEPES buffer, $\gamma_{\text{eq}}(\text{PFH})$, for various concentrations.

Concentration [mol L ⁻¹]	Gel phase (25 °C)			Ripple phase (37 °C)			Fluid phase (47 °C)		
	$\gamma_{\text{eq}}(\text{air})$	$\gamma_{\text{eq}}(\text{PFH})$	$\Delta\gamma_{\text{eq}}$	$\gamma_{\text{eq}}(\text{air})$	$\gamma_{\text{eq}}(\text{PFH})$	$\Delta\gamma_{\text{eq}}$	$\gamma_{\text{eq}}(\text{air})$	$\gamma_{\text{eq}}(\text{PFH})$	$\Delta\gamma_{\text{eq}}$
1×10^{-4}	56.7	50.9	5.8	51.5	46.5	5.0	24.0	20.5	3.5
5×10^{-4}	56.0	50.4	5.6	51.4	47.5	3.9	24.4	21.1	3.3
1×10^{-3}	55.9	49.1	6.8	51.6	47.3	4.3	23.6	21.0	2.6
1×10^{-2}	55.9	50.1	5.8	51.4	47.0	4.4	23.5	20.7	2.8

are observed. The data collected for other DPPC concentrations are given in Figure S5 in the Supporting Information. At 37 °C, in the presence of PFH, the adsorption was faster than that at 25 °C and the $\Delta\gamma_{\text{eq}}$ was reduced [(4.3 ± 0.5) mNm⁻¹]. The adsorption kinetics of DPPC were also measured at 47 °C, that is, when DPPC was in the fluid lamellar phase (Table 2 and Figure S3 in the Supporting Information). Here again the presence of the PFH resulted in an acceleration of the adsorption process and a decrease of γ_{eq} (Figure 5). The $\Delta\gamma_{\text{eq}}$ values [(2.7 ± 0.5) mNm⁻¹] were lower than those measured at 37 and 25 °C.

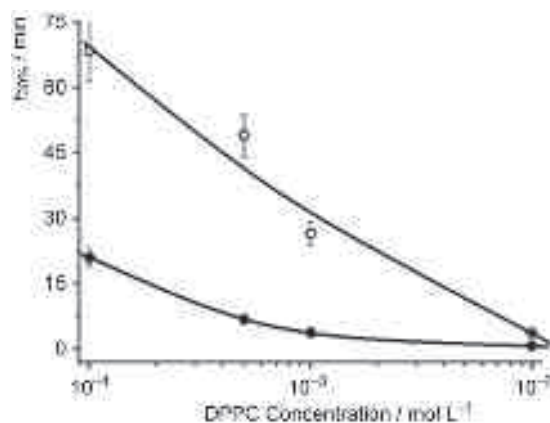


Figure 6. Time required for the interfacial tension, γ_{eq} , to be reduced by 30%, $t_{30\%}$, at 25 °C as a function of DPPC concentration at the air/buffer interface in the presence (●) and absence (○) of PFH. Error bars are not represented when smaller than the symbol.

As found for DiC8-PC, PFH strongly accelerated the adsorption of DPPC at the interface (Figure 6). The acceleration of the kinetics persists at much higher PL concentrations than with DiC8-PC. The effect levels off at about $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, as compared with about $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ with DiC8-PC.

2.2.2. Adsorption Kinetics of DLPC and DMPC

The largest effect of PFH, in terms of tension lowering, was obtained with DMPC at 20 °C in the P_{β}' ripple phase ($T_m = 23.5 \text{ °C}$; $T_p = 11 \text{ °C}$) with a $\Delta\gamma_{\text{eq}}$ value of $(10.0 \pm 0.5) \text{ mN m}^{-1}$, which was constant with concentration (Figure S4 in the Supporting Information). At this temperature, PFH also dramatically accelerated DMPC adsorption (up to fivefold quicker than in absence of PFH) up to $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (Figure S5 in the Supporting Information). At 30 °C (in the fluid phase) the $\Delta\gamma_{\text{eq}}$ values for DMPC were lower than those obtained in the gel phase, but still significant [$(2.5 \pm 0.5) \text{ mN m}^{-1}$; Figure S6 in the Supporting Information]. DLPC, which was investigated in the fluid state only ($T_m = -1.0 \text{ °C}$), led to comparable $\Delta\gamma_{\text{eq}}$ values [$(3.5 \pm 0.5) \text{ mN m}^{-1}$] to those for DMPC in the fluid phase (Figures S7 and S8 in the Supporting Information).

These results show that the capacity for PFH to lower the equilibrium interfacial tension of PLs and accelerate their adsorption is a general phenomenon. The extent of this phenomenon strongly depends on the chain length of the PLs, and hence, on temperature.

3. Discussion and Conclusions

The use of dynamic bubble profile analysis tensiometry in an appropriate buffer system allowed effective monitoring of the adsorption of long-chain PLs at an air/water interface and determination of the equilibrium interfacial tension. This technique allowed the effects of a nonpolar, nonamphiphilic, highly hydrophobic molecule, perfluorohexane, on PL adsorption and interfacial tension to be assessed. The series of DiC8-PC, DLPC, DMPC, and DPPC allowed the collection of data on

the effects of the FC on PLs in both gel and fluid phases. These effects are relevant to the engineering of emulsions and bubbles with FC components and to lung surfactant replacement compositions.^[1,2,15,16]

3.1. Interfacial Tension Lowering Effect

DiC8-PC, which is a relatively short-chain PL, could easily be investigated in water both above and below its cmc. Below the cmc, the equilibrium interfacial tension between the PL dispersion and the gas phase depends strongly on PL concentration, whereas for concentrations higher than the cmc γ_{eq} remains constant. When the gas phase is saturated with PFH, a decrease in γ_{eq} (up to 7.8 mN m^{-1}) is found both below and above the cmc. Below the cmc, the extent of the tension lowering effect, $\Delta\gamma_{\text{eq}}$, decreases linearly with the logarithm of PL concentration. For concentrations approaching or higher than the cmc, the effect is smaller ($\approx 2.5 \text{ mN m}^{-1}$), but still significant.

In the case of PLs with longer fatty chains, one has to consider whether the bilayer is in the fluid or in the gel state. The fluid-state situation was investigated with DLPC, DMPC, and DPPC. These three PLs form vesicles for all of the concentrations investigated and γ_{eq} remained constant, independent of the concentration. The tension lowering effect caused by PFH is small ($\approx 3 \text{ mN m}^{-1}$) and comparable to that obtained with DiC8-PC above the cmc. The case of PLs in the gel phase is illustrated by both DMPC and DPPC. Here, the aqueous PL dispersions are essentially made of vesicles. The $\Delta\gamma_{\text{eq}}$ values are substantially higher than those for the fluid state. It is in the gel state that the FC gas has the strongest tension lowering effect, which then reaches an average of $(10.0 \pm 0.5) \text{ mN m}^{-1}$ for DMPC and $(6.0 \pm 0.5) \text{ mN m}^{-1}$ for DPPC.

3.2. Phospholipid Adsorption Accelerating Effect

For all of the PLs investigated, in both their gel and fluid states, the FC gas causes a marked acceleration of the rate of adsorption of the PLs at the gas/water interface. This effect is highest at lower concentrations. At high concentrations, the adsorption of the PL becomes too rapid for experimental determination by bubble tensiometry. For both DMPC and DPPC, the $t_{30\%}$ values are lower, and hence, the rate of adsorption is faster, when the PLs are in the fluid rather than in the gel phase. This might reflect the fact that the PL molecules involved in vesicles in the gel state are less available for joining the interface than when the vesicles are in the fluid state.

In summary, we found that the nonpolar, highly hydrophobic FC gas PFH, when present in the air in contact with a solution or dispersion of a PL, induced a substantial acceleration of the rate of adsorption of this PL at the interface, as well as a significant decrease of the equilibrium interfacial tension between the gas phase and the PL dispersion. These effects were observed for all of the PLs investigated, including those that formed micelles or vesicles in water, and whether, in the case of vesicles, the PL bilayer was in a fluid or a gel state. The

effect was strongest at low concentrations and leveled off at high concentrations.

The observed effects indicated that the PFH molecule, despite the absence of polar head groups and amphiphilic character, exerted cosurfactant activity when in contact with PLs. Semi-fluorinated alkanes $C_nF_{2n+1}C_mH_{2m+1}$ (FnHm diblocks) have previously been shown to have a definite cosurfactant effect on PLs in vesicles^[37,38] and FC emulsions.^[5] However, the FnHm diblocks, although they are nonpolar in the sense that they have no hydrophilic function, nevertheless exhibit definite amphiphilic behavior due to the conflict between fluorocarbon and hydrocarbon blocks and the existence of a substantial dipole ($\approx 2\text{--}3$ D) at the junction between the two blocks.^[39]

The adsorption of PLs at an air/water interface involves several steps. Briefly, the PL vesicles must first reach the interface. Then, either individual molecules or vesicles acting as reservoirs have to anchor at the interface. For individual molecules, this step usually requires several attempts and is characterized by a probability of anchorage for each contact with the water surface. Finally, the PL molecule has to undergo reorientation so that its fatty chains point towards the air. The anchoring step requires that the PL finds a defect in the ordered water surface structure. It can be hypothesized that the presence of PFH molecules lying on the interface would promote formation of such defects and thus increase the probability of anchoring an incoming PL molecule. Because of weak van der Waals intermolecular interactions, the PFH molecule would subsequently be easily expelled from the interface by the incoming PL.

It should be noted that the surface tension lowering effect, $\Delta\gamma_{\text{eq}}$ is the most significant for DPPC, which is the main component of the native lung surfactant that allows animal breathing.^[40] The data collected herein are also relevant to the understanding of the factors that govern PL-coated gas-bubble characteristics and stability. The maximum $\Delta\gamma_{\text{eq}}$ lowering effect is found for DMPC; one of the PLs selected for the engineering of microbubbles used as contrast agents for ultrasound imaging.

Experimental Section

Materials: PFH (purity > 99%) was purchased from Sigma. The PLs (99% purity) were purchased from Sigma and used without further purification. A 20 mM solution of HEPES (from Sigma) in 150 mM NaCl was prepared and the pH was adjusted to 7.4 with 0.1 N NaOH. The equilibrium surface tension of the buffer was (69.7 ± 0.2) mN m⁻¹ at 25 °C. Water was obtained from a MilliQ (Millipore) system [surface tension: (71.7 ± 0.2) mN m⁻¹ at 20 °C; resistivity 18.2 M Ω cm]. The surface tension of the HEPES buffer was (70.0 ± 0.2) mN m⁻¹ at 25 °C.

Preparation of PL Dispersions: DiC₈-PC has a cmc value of about 2×10^{-4} mol L⁻¹.^[26,29] A dispersion of DiC₈-PC (10^{-2} mol L⁻¹, 50 mL) was prepared and diluted as needed. No experimental cmc values were available for DLPC, DMPC, and DPPC. They can, however, be approximated by knowing that the logarithm of the cmc decreases by about one unit per carbon atom added to the alkyl chains of the PLs.^[36] The cmcs of DLPC, DMPC, and DPPC were thus estimated to be about 1×10^{-7} , 1×10^{-11} , and 1×10^{-13} mol L⁻¹, respectively.

Dispersions of DLPC, DMPC, and DPPC (10^{-2} mol L⁻¹, 50 mL) required sonication (15 to 60 min, depending on PL) until they became transparent and contained vesicles with a mean diameter of about 80 nm. They were then diluted as needed.

Quasi-Elastic Light Scattering (QELS): A Malvern Zetasizer Nano ZS instrument was used at 25 °C for dynamic light scattering measurements at a scattering angle of 90°. The z-averaged hydrodynamic mean diameters of the DLPC, DMPC, and DPPC vesicles used for the tensiometry experiments were determined by using the Malvern software.

Bubble Profile Analysis Tensiometry: The shape of a gas bubble in a liquid depends on buoyancy and on surface tension. Axisymmetric bubble-shape analysis was applied to a rising bubble of the gas phase formed in the PL dispersion. Care was taken to only use vesicle dispersions with close mean diameters (≈ 80 nm) and narrow size distributions to avoid the presence of large vesicles or bilayer fragments susceptible to adsorb on the bubble wall and to perturb the extraction of the bubble contour, and/or modify the adsorption of the PL on the bubble. The time dependence of the interfacial tension was measured during adsorption of the PLs at the gas/liquid interface by using a Tracker tensiometer (Teclis, Longjumeau, France).^[41] The duration of the experiments ranged from 20 to 30 min for concentrated dispersions and up to 15 h for diluted dispersions. A lid fitted onto the measuring glass cell (10 mL) prevented evaporation of water during the long equilibration times, especially at higher temperatures. The bubble (5 μ L) was formed at a Teflon capillary with a tip diameter of 1 mm. It was carefully determined that the systems were at equilibrium at the end of the experiments.

Saturation of the Rising Bubble with the FC Gas: A 1 mL syringe was purged three times with PFH-saturated air surrounding liquid PFH (PFH-saturated vapor pressure and concentration at 25 °C are 2.9×10^4 Pa and 11.66 mol m⁻³, respectively; water solubility at 25 °C: 2.7×10^{-4} mol m⁻³^[42]). The syringe was mounted on the injection cell of the tensiometer and the rising bubble formed.

Determination of the PL Adsorption Rates: The adsorption rates of the PLs at the air/water interface were determined by assessing the time points at which the initial interfacial tension value had been reduced by 30%.

Modified Frumkin Adsorption Model: This model assumes that interactions exist between the two molecules that form the film at the interface. Neglecting the contribution of nonideality of entropy, the Frumkin equations are given by Equations (1)–(3).^[34,35]

$$\pi = \frac{-RT}{\omega} [\ln(1 - \theta_1 - \theta_2) + a_1\theta_1^2 + a_2\theta_2^2 + 2a_{12}\theta_1\theta_2] \quad (1)$$

$$b_1c_1 = \frac{\theta_1}{1 - \theta_1 - \theta_2} \exp(-2a_1\theta_1 - 2a_{12}\theta_2) \times \exp[(1 - n_1)(a_1\theta_1^2 + a_2\theta_2^2 + 2a_{12}\theta_1\theta_2)] \quad (2)$$

$$b_2c_2 = \frac{\theta_2}{(1 - \theta_1\theta_2)^{n_2}} \exp(-2a_2 - 2a_{12}\theta_1) \times \exp[(1 - n_2)(a_1\theta_1^2 + a_2\theta_2^2 + 2a_{12}\theta_1\theta_2)] \quad (3)$$

in which $\pi = \gamma_0 - \gamma$ is the surface pressure; γ_0 and γ are the surface tensions of pure water and of the solution, or dispersion, investigated, respectively; θ_1 and θ_2 are the surface coverages of molecules 1 and 2, respectively ($\theta_1 = \omega_1\Gamma_1$ and $\theta_2 = \omega_2\Gamma_2$, in which ω_1 and ω_2 are the molar areas, and Γ_1 and Γ_2 are the adsorption parameters); a_i , b_i are c_i ($i = 1, 2$) are the interaction constant be-

tween molecules 1 and 1 or 2 and 2, the adsorption equilibrium constant of molecule 1 or 2, and the concentration of molecule 1 or 2 in the bulk volume, respectively. a_{12} is the interaction constant between molecules 1 and 2. $n_1 = \omega_1/\omega$ and $n_2 = \omega_2/\omega$; ω is the mean molar area defined by $\omega = (\omega_1\Gamma_1 + \omega_2\Gamma_2)/(\Gamma_1 + \Gamma_2)$. R is the gas constant and T is the temperature.

Acknowledgements

We thank the European Commission (Nanomagdye, contract nos. 214032, FP7-NMP-2007-SMALL-1). T.T. T. D. thanks the French Embassy for an Undergraduate Fellowship, and P.N. N. the EC for a Doctorate Fellowship and the Réseau Français du Fluor for a travel grant.

Keywords: adsorption kinetics • fluorocarbons • lung surfactant • microbubbles • phospholipids

- [1] S. Rossi, G. Waton, M. P. Krafft, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 1982–1985.
- [2] S. Rossi, G. Waton, M. P. Krafft, *Langmuir* **2010**, *26*, 1649–1655.
- [3] E. S. Schutt, D. H. Klein, R. M. Mattrey, J. G. Riess, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3336–3355; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3218–3235.
- [4] J. G. Riess, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2797–2920.
- [5] S. M. Bertilla, J.-L. Thomas, P. Marie, M. P. Krafft, *Langmuir* **2004**, *20*, 3920–3924.
- [6] F. Haiss, R. Jolivet, M. T. Wyss, J. Reichold, N. B. Braham, F. Scheffold, M. P. Krafft, B. Weber, *J. Physiol.* **2009**, *587*, 3153–3158.
- [7] G. M. Lanza, P. M. Winter, S. D. Caruthers, M. S. Hughes, G. Hu, A. H. Schmieder, S. A. Wickline, *Angiogenesis* **2010**, *13*, 189–202.
- [8] R. Díaz-López, N. Tsapis, E. Fattal, *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 1.
- [9] J. R. Lindner, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 527–532.
- [10] S. B. Feinstein, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2004**, *287*, H450–H457.
- [11] S. Hernot, A. L. Klibanov, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1153–1166.
- [12] J. G. Riess, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, *14*, 294–304.
- [13] M. P. Krafft, T. F. Vandamme, F. Gerber, O. Shibata, *Lung Surfactant Supplements*, US 60/563,690, **2004**.
- [14] J. U. Bleyl, M. Ragaller, U. Tschöh., M. Regner, M. Hübner, M. Kanzow, O. Vincent, M. Albrecht, *Crit. Care Med.* **2002**, *30*, 1340–1347.
- [15] F. Gerber, M. P. Krafft, T. F. Vandamme, M. Goldmann, P. Fontaine, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2809–2812; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2749–2752.
- [16] F. Gerber, M. P. Krafft, T. F. Vandamme, M. Goldmann, P. Fontaine, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 3184–3192.
- [17] J. Eastoe, J. S. Dalton, R. K. Heenan, *Langmuir* **1998**, *14*, 5719–5723.
- [18] M. A. Launois-Surpas, T. Ivanova, I. Panaiotov, J. E. Proust, F. Puisieux, G. Georgiev, *Colloid Polym. Sci.* **1992**, *270*, 901–911.
- [19] C. S. Vassiliev, I. Panaiotov, E. D. Manev, J. E. Proust, T. Ivanova, *Biophys. Chem.* **1996**, *58*, 97–107.
- [20] R. W. Walters, R. R. Jenq, R. B. Hall, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 257–266.
- [21] C. Salesse, D. Ducharme, R. M. Leblanc, *Biophys. J.* **1987**, *52*, 351–352.
- [22] H. Schindler, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes* **1979**, *555*, 316–336.
- [23] T. Ivanova, I. Panaiotov, G. Georgiev, M. A. Surpas, J. E. Proust, F. Puisieux, *Colloids Surf.* **1991**, *60*, 263.
- [24] S. Schürch, H. Bachofen in *Surfactant Therapy for Lung Disease* (Eds.: B. Robertson, H. W. Taeusch), Marcel Dekker, New York, **1995**, p. 3.
- [25] X. Wen, E. I. Franses, *Langmuir* **2001**, *17*, 3194–3201.
- [26] A. Kabalnov, J. Weers, R. Arlauskas, T. Tarara, *Langmuir* **1995**, *11*, 2966–2974.
- [27] S. Lee, D. H. Kim, D. Needham, *Langmuir* **2001**, *17*, 5544–5550.
- [28] E. I. Franses, O. A. Basaran, C.-H. Chang, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, *1*, 296–303.
- [29] R. Tausk, C. Oudshoor, J. Overbeek, *Biophys. Chem.* **1974**, *2*, 53–63.
- [30] T.-L. Lin, S.-H. Chen, N. E. Gabriel, M. F. Roberts, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 406–413.
- [31] P. Lo Nostro, N. Stubicar, S. H. Chen, *Langmuir* **1994**, *10*, 1040–1043.
- [32] S. H. Kim, Y. Park, S. Matalon, E. I. Franses, *Colloids Surf. B* **2008**, *67*, 253–260.
- [33] S. Luo, D. Pal, S. J. Shah, D. Kwatra, K. D. Paturi, A. K. Mitra, *Mol. Pharmaceutics* **2010**, *7*, 412–420.
- [34] E. Lucassen-Reynders, V. Fainerman, R. Miller, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 9173–9176.
- [35] V. B. Fainerman, S. V. Lylyk, E. V. Aksenenko, A. V. Makievski, J. T. Petkov, J. Yorke, R. Miller, *Colloids Surf. A* **2009**, *334*, 1–7.
- [36] G. Cevc, *Phospholipids Handbook*, Marcel Dekker, New York, **1993**.
- [37] J. G. Riess, *J. Drug Targeting* **1994**, *2*, 455–468.
- [38] M. Schmutz, B. Michels, P. Marie, M. P. Krafft, *Langmuir* **2003**, *19*, 4889–4894.
- [39] A. N. Semenov, A. González-Pérez, M. P. Krafft, J.-F. Legrand, *Langmuir* **2006**, *22*, 8703–8717.
- [40] B. A. Hills, *The Biology of Surfactant*, Cambridge University Press, Cambridge, **1988**, pp. 28–72.
- [41] J. Benjamins, A. Cagna, E. H. Lucassen Reynders, *Colloids Surf. A* **1996**, *114*, 245–254.
- [42] A. Kabalnov, D. Klein, T. Pelura, E. Schutt, J. Weers, *Ultrasound Med. Biol.* **1998**, *24*, 739–749.

Received: June 2, 2011

Published online on August 1, 2011

CHEMPHYSICHEM

Supporting Information

© Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2011

A Nonpolar, Nonamphiphilic Molecule Can Accelerate Adsorption of Phospholipids and Lower Their Surface Tension at the Air/Water Interface

Phuc Nghia Nguyen,^[a] Thuan Thao Trinh Dang,^[a] Gilles Waton,^[a] Thierry Vandamme,^[b] and Marie Pierre Krafft*^[a]

cphc_201100425_sm_miscellaneous_information.pdf

Supporting Information

Table S1. Interfacial tensions of DMPC at the interfaces between air and HEPES buffer, $\gamma_{\text{eq}}(\text{air})$ and PFH-saturated air and HEPES buffer $\gamma_{\text{eq}}(\text{PFH})$ for various concentrations.

DMPC concentration (mol L ⁻¹)	Ripple phase (20°C)			Fluid phase (30°C)		
	$\gamma_{\text{eq}}(\text{air})$	$\gamma_{\text{eq}}(\text{PFH})$ (mN m ⁻¹ ± 0.5)	$\Delta\gamma_{\text{eq}}$	$\gamma_{\text{eq}}(\text{air})$	$\gamma_{\text{eq}}(\text{PFH})$ (mN m ⁻¹ ± 0.5)	$\Delta\gamma_{\text{eq}}$
5 10 ⁻⁴	43.5	34.7	8.8	-	-	-
10 ⁻³	44.3	32.6	11.7	22.9	20.6	2.3
5 10 ⁻³	43.6	34.2	9.4	23.3	20.9	2.4
10 ⁻²	43.5	33.3	10.2	23.2	20.4	2.8

Table S2. Interfacial tensions of DLPC at the interfaces between air and HEPES buffer, $\gamma_{\text{eq}}(\text{air})$, and between PFH-saturated air and HEPES buffer, $\gamma_{\text{eq}}(\text{PFH})$, for various concentrations.

DLPC concentration (mol L ⁻¹)	Fluid phase (25°C)		
	$\gamma_{\text{eq}}(\text{air})$	$\gamma_{\text{eq}}(\text{PFH})$ (mN m ⁻¹ ± 0.5)	$\Delta\gamma_{\text{eq}}$
5 10 ⁻⁵	26.8	23.8	3.0
10 ⁻⁴	26.1	22.9	3.2
2.5 10 ⁻⁴	26.8	23.2	3.6
5 10 ⁻⁴	26.1	23.6	2.5
10 ⁻³	26.2	22.1	4.1
10 ⁻²	26.3	22.3	4.0

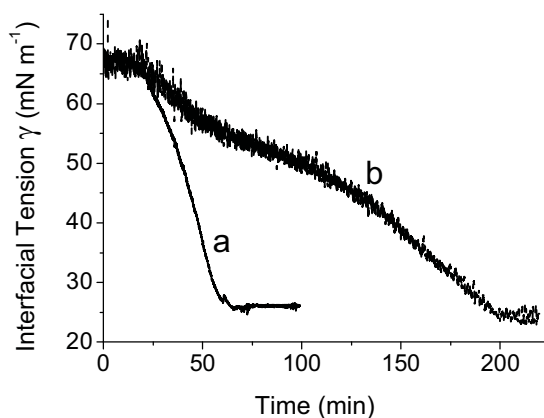


Figure S1. Variation of the interfacial tension of DLPC (1 10⁻⁴ mol L⁻¹) at the air/HEPES buffer interface at 25°C (a), as compared to the air/pure water interface (b).

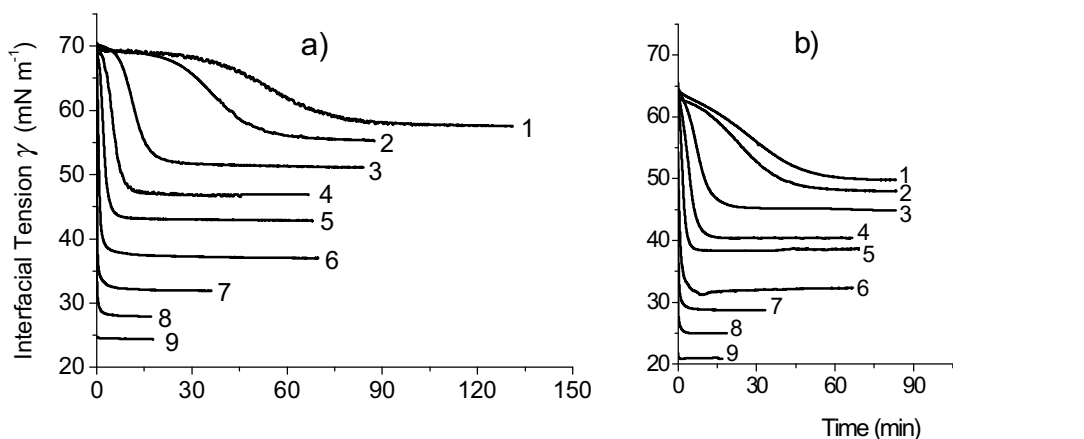


Figure S2. Interfacial tension γ at 25°C of DiC₈-PC at a) the air/HEPES buffer interface, and b) at the PFH-saturated air/HEPES buffer interface, as a function of time. Concentrations of the PL solution (mol L⁻¹) were: 1: $5 \cdot 10^{-7}$; 2: 10^{-6} ; 3: $2.5 \cdot 10^{-6}$; 4: $5 \cdot 10^{-6}$; 5: 10^{-5} ; 6: $2.5 \cdot 10^{-5}$; 7: $5 \cdot 10^{-5}$; 8: 10^{-4} ; 9: $2.5 \cdot 10^{-4}$.

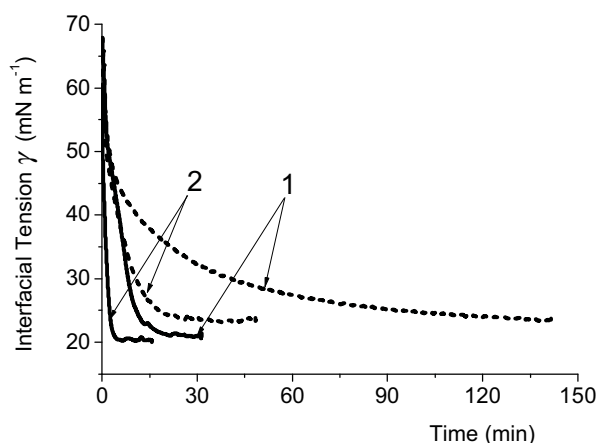


Figure S3. Adsorption kinetics at 47°C of DPPC at the PFH-saturated air/buffer interface (solid line), as compared to the air/buffer interface (dashed line). PL concentrations (mol L⁻¹) were: 1: 10^{-3} ; 2: $5 \cdot 10^{-3}$.

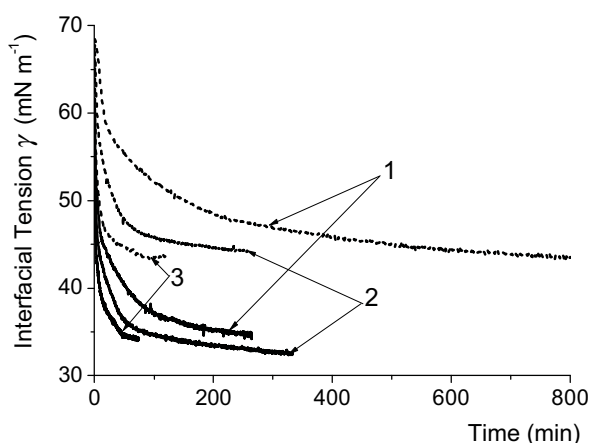


Figure S4. Typical adsorption kinetics of DMPC at 20°C in the ripple phase at the PFH-saturated air/buffer interface (solid line), as compared with that at the air/buffer interface (dashed line). PL concentrations (mol L⁻¹) were: 1: $5 \cdot 10^{-4}$; 2: 10^{-3} ; 3: $5 \cdot 10^{-3}$.

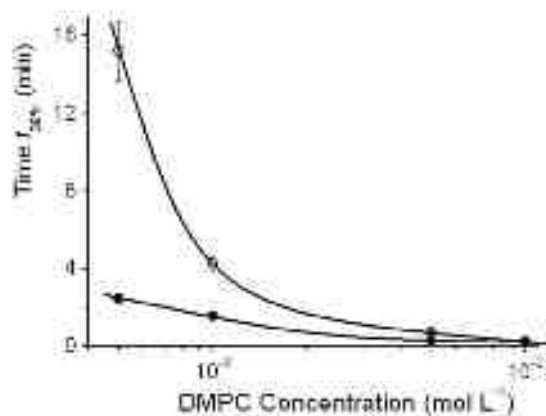


Figure S5. Time $t_{30\%}$ required for the interfacial tension to be reduced by 30% at 20°C, as a function of DMPC concentration at the PFH-saturated air/buffer interface (filled circles), as compared to that at the air/buffer interface (empty circles).

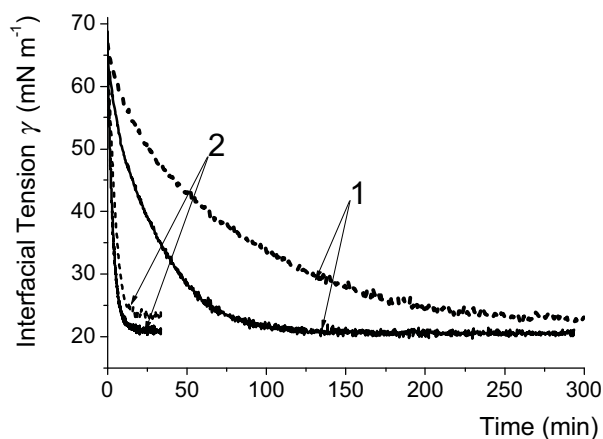


Figure S6. Kinetics of adsorption of DMPC at 30°C in the fluid phase at the PFH-saturated air/buffer interface (solid line), and at the air/buffer interface (dashed line). PL concentrations (mol L^{-1}) were: 1: 10^{-3} ; 2: $5 \cdot 10^{-3}$.

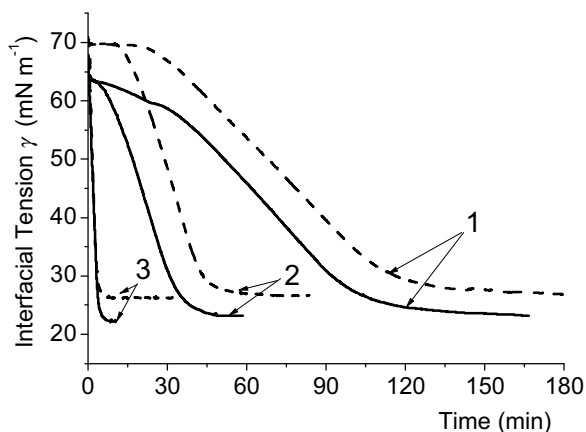


Figure S7. Typical adsorption curves of DLPC at the PFH-saturated air/buffer interface (solid line), as compared with the air/buffer interface (dashed line) at 25°C. PL concentrations (mol L^{-1}) were: 1: $5 \cdot 10^{-5}$; 2: $5 \cdot 10^{-4}$; 3: 10^{-2} .

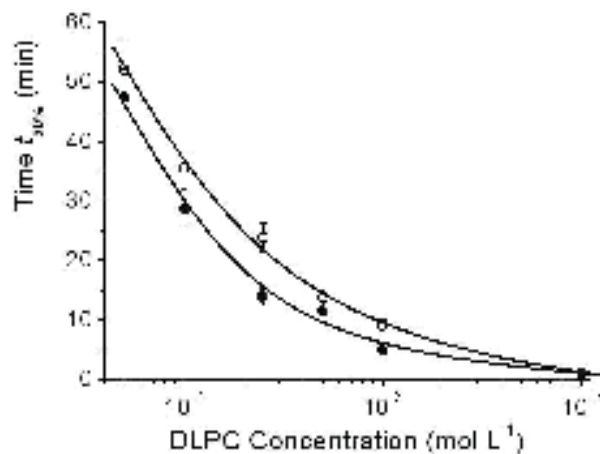


Figure S8. Time $t_{30\%}$ required for the interfacial tension to be reduced by 30% at 25°C, as a function of DLPC concentration (log scale) at the PFH-saturated air/buffer interface (filled circles), as compared to at the air/buffer interface (empty circles).

III.2.2. Effet d'autres fluorocarbures

En complément de l'étude précédente, nous avons étudié l'adsorption du DPPC en présence d'autres FCs comme le bromure de perfluorooctyle (PFOB) et le perfluorooctyl-éthane (PFOE). Le PFOB a été choisi parce qu'il a déjà été analysé et utilisé dans le domaine biomédical [75]. Le PFOE a des caractéristiques très similaires au PFOB [55, 75].

Les cinétiques d'adsorption de la DPPC en présence du PFOB ou PFOE sont reportées dans la figure 16. Ces résultats confirment encore une fois l'effet des fluorocarbures gazeux sur l'adsorption de phospholipide à l'interface air/eau. Les FCs diminuent significativement la tension interfaciale d'équilibre du DPPC et accélèrent aussi sa vitesse d'adsorption (figure 17). Le PFOB possède un effet similaire à celui du PFH ; alors que l'effet du PFOE est beaucoup plus important. Ce composé réduit la tension interfaciale d'équilibre à environ 13mN m^{-1} .

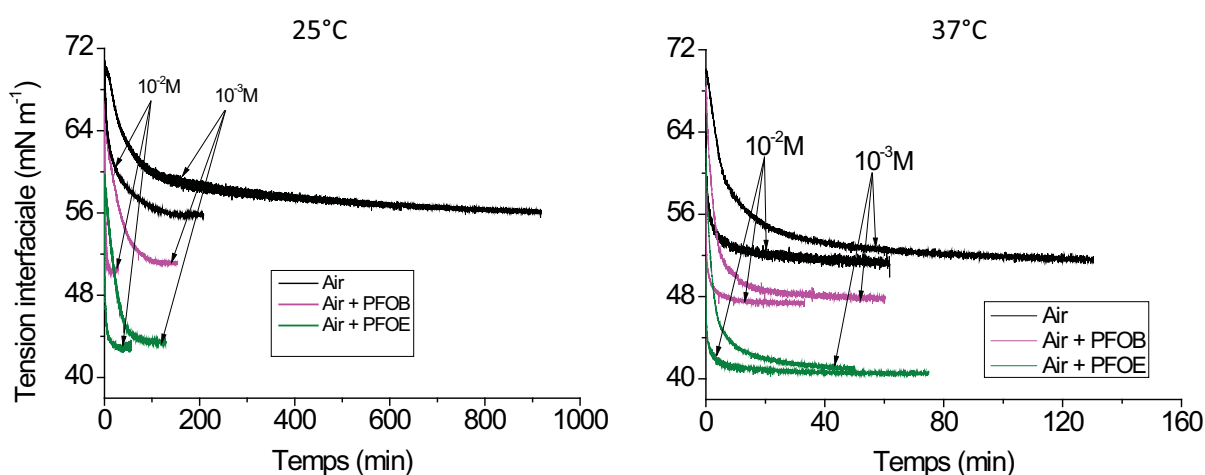


Figure 16. Cinétiques d'adsorption de la DPPC à l'interface air/HEPES (noir) comparée à l'interface air saturé en PFOB/HEPES (rose) ou l'interface air saturé en PFOE/HEPES (vert), à 25°C ou 37°C

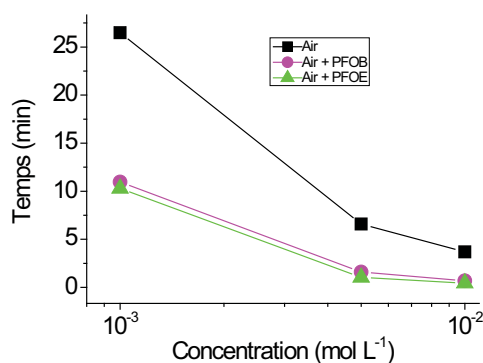


Figure 17. Temps nécessaire pour que la tension interfaciale initiale diminue de 30% à l'interface air/HEPES (noir) en comparaison avec l'interface d'air saturé par PFOB/HEPES (rose) ou PFOE/Hepes (vert), à 25°C

III.3. Adsorption des phospholipides sous oscillations périodiques

Nous avons observé que des oscillations sinusoïdales appliquées de façon prolongée à un film de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) adsorbé à la surface d'une bulle millimétrique (à partir d'une dispersion de vésicules) induit une transition du film (inflexion sur le profil d'adsorption du phospholipide) du type liquide expansé (LE)/liquide condensé (LC). Cette transition induit une adsorption accélérée du phospholipide et un abaissement permanent de la tension interfaciale. Le phénomène dépend fortement de la fréquence et de l'amplitude de l'oscillation.

Ces observations ont été rationalisées sur la base d'un mécanisme dans lequel l'abaissement permanent de la tension serait basé sur un couplage entre l'adsorption des molécules de DPPC de la phase aqueuse et la relaxation du film interfacial de DPPC. Pour des périodes T allant de 10 s à 50 s et des amplitudes ΔA de 15 ou 20%, le recrutement des molécules de DPPC à l'interface est facilité par la transition LE/LC ; la formation des domaines LC constituant la force motrice de l'adsorption des molécules à l'interface, où la concentration en phospholipide est localement diminuée dans la phase LE durant la phase d'expansion.

Ce phénomène constitue, à notre connaissance, la première mise en évidence d'une transition LE/LC dans un film adsorbé conduisant à un abaissement permanent de la tension et une augmentation de l'élasticité du film interfacial. La configuration expérimentale utilisée permet d'étudier le film à l'équilibre avec les vésicules dispersées dans la phase aqueuse continue. Le mécanisme proposé, implique un couplage entre l'adsorption de molécules de la phase continue et l'augmentation de l'ordre dans le film interfacial. Ces observations peuvent améliorer notre compréhension du rôle des surfactants pulmonaires natif et de remplacement.

D'un point de vue méthodologique, ces résultats ouvrent de nouvelles possibilités pour l'étude de la dynamique et des phénomènes de transport dans les films de phospholipides dans lesquels l'équilibre est difficilement atteint en l'absence d'oscillations.

Ce travail a fait l'objet d'une publication, intitulée « Behavior of an adsorbed phospholipid monolayer submitted to prolonged periodical surface density variations » parue dans *Angewandte Chemie* en 2013.

Behavior of an Adsorbed Phospholipid Monolayer Submitted to Prolonged Periodical Surface Density Variations**

Phuc Nghia Nguyen, Gilles Waton, Thierry Vandamme, and Marie Pierre Krafft*

The adsorption of phospholipids at interfaces determines many biological phenomena, from cell life to lung-surfactant dynamics. The lung surfactant reduces the surface tension in the alveoli and ensures normal breathing. Although the dynamic adsorption and interfacial rheology of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), the main component of the native lung surfactant, has been extensively investigated to understand the mechanism of respiration,^[1–8] this quest has met some serious difficulties.

Many studies have focused on DPPC monolayers spread as insoluble films on water.^[9–12] One serious limitation of these studies is that the DPPC monolayer was not in contact with DPPC vesicles and/or aggregates in the aqueous phase. These studies thus overlook the role that the vesicles present in the mucus that lines the alveoli do play in the relaxation processes. It was shown indeed that phospholipid aggregates released from the alveolar type II cells diffuse to, come in contact with, and spread on the interface, thereby resulting in surface-associated phospholipid reservoirs.^[13]

The attempts made so far to investigate DPPC films adsorbed at the air/water interface while in coexistence with dispersions of vesicles, by using the Langmuir balance,^[14] Wilhelmy plate,^[15] or static captive bubble methods,^[16,17] met another severe shortcoming: the equilibrium interfacial tension γ_{eq} could not be attained owing to exceedingly slow phospholipid adsorption. Further studies, using a pulsating bubble surfactometer, submitted DPPC bubbles to large surface variations (typically 50%), and hence to very strong constraint,^[16,18,19] preventing linear responses. The lowest interfacial tension values were only collected when the surface of the bubble was minimum, and hence when constraint was the largest. These tensions increased again

during the expansion of the oscillation, thus showing that the system was out of equilibrium. Moreover, no studies investigated the system once the constraint was removed.

We have now removed these roadblocks by studying a DPPC monolayer adsorbed at the interface with an aqueous dispersion of DPPC vesicles when submitted to prolonged periodical perturbations of low amplitude. We found that under these conditions the adsorption rate of the phospholipid at the interface is strongly accelerated, and the interfacial tension γ is strongly lowered (by up to 20 mN m⁻¹). We show that an equilibrium state is reached. We also show that the tension remains at this low value after the constraint applied on the bubble surface is removed. A sudden increase in adsorption rate was observed for a γ value that corresponds to the value at which the liquid expanded (LE)/liquid condensed (LC) phase transition occurs in a Langmuir DPPC monolayer.

The adsorption dynamics of DPPC at the interface between air and an aqueous dispersion of phospholipid vesicles was studied by using bubble profile analysis tensiometry. The DPPC concentration was set to 1 × 10⁻³ mol L⁻¹, a value that allows convenient and precise measurement of the adsorption kinetics, as shown in a previous static-bubble study.^[17] The bubble was submitted to a series of oscillations with a period T varying from 3 to 100 s (0.01 to 0.2 Hz). This range is close to that of human respiration, which is from 0.2 Hz on. To establish the general character of the reported phenomena, we investigated a broad range of frequencies. The amplitude ΔA of the surface area of the bubble was varied from 5 to 20%, which is close to the respiration conditions. The chosen constraint ($\Delta A = 15\%$) allowed a linear response and equilibrium to be reached. The bubble was submitted to the oscillatory regime for long times (12–22 h), in contrast with earlier reports in which the oscillations were applied for seconds only.^[16,18] All experiments were conducted at 37°C and repeated three to five times.

When DPPC is adsorbed from vesicles at the surface of a resting bubble, the interfacial tension γ starts decreasing monotonously from approximately 70 mN m⁻¹ (Figure 1). Adsorption is very slow,^[17] because DPPC is in the P_β' ripple phase at 37°C ($T_m = 41.5^\circ\text{C}$).^[20] After 22 h, the interfacial tension γ is still approximately 50 mN m⁻¹ and far from equilibrium.

We found that when a bubble is submitted to prolonged controlled sinusoidal oscillations, four phenomena occur: First, the adsorption of DPPC becomes considerably faster than when the bubble is static. Second, the minimum reachable surface tension is greatly lowered. Third, a transition is consistently seen in the tension-versus-time curve at approximately 52 mN m⁻¹ (ca. 1 h in Figure 1). Fourth, the γ value

[*] P. N. Nguyen, Dr. G. Waton, Dr. M. P. Krafft
Université de Strasbourg, SOFFT Team, Institut Charles Sadron
(UPR CNRS 22)
23 rue du Loess, 67034 Strasbourg Cedex (France)
E-mail: krafft@unistra.fr
Prof. T. Vandamme
Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives
(CNRS UMR 7199), Université de Strasbourg
74 Route du Rhin, 67401 Illkirch Cedex (France)

[**] This work was supported by the European Community's 7th Framework Program (grant n° NMP3-SL-2008-214032). We thank the French Research Agency (ANR, grant n° 2010-BLAN-0816-01) and the University of Strasbourg for financial support, and Teclis (Longessaigne, France) for technical help. P.N.N acknowledges the European Commission for a research fellowship and the GIS-Fluor for a travel grant.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201301974>.

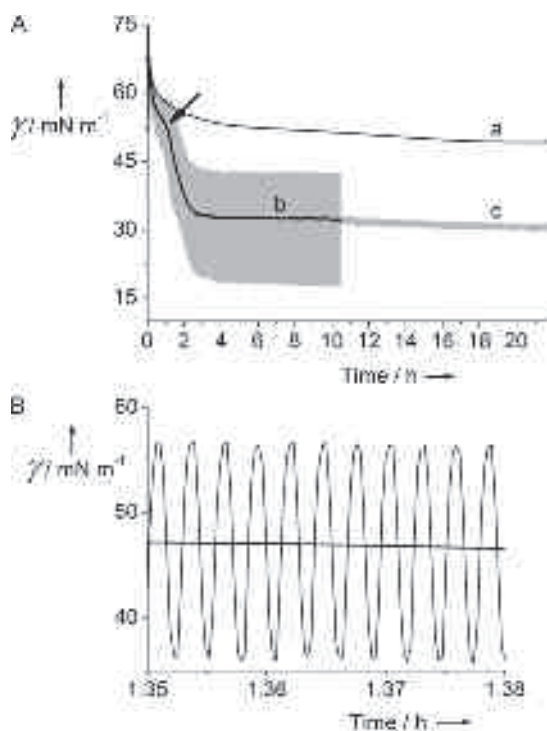


Figure 1. A) Kinetics of adsorption of DPPC ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, provided in the form of a dispersion of vesicles) at the surface of an air bubble at 37°C . The bubble was a) static; b) submitted to oscillations ($T=10 \text{ s}$, $\Delta A=15\%$). The oscillations were applied for ca. 10 h and then stopped, while γ was subsequently monitored for another 12 h (c). The arrow points to an increase in the adsorption rate. The gray area represents the fluctuations in interfacial tension associated with the oscillations. B) Magnification of a part of (A.b) that shows the oscillations. The line corresponds to mean values obtained by treating the data with a low-pass digital filter.

remains at its minimum value after the oscillations have been removed.^[21]

Although DPPC is one of the most abundant natural phospholipids and has been extensively investigated, there appears to be no previous report of these phenomena.

Concerning the γ -lowering effect, γ is, for example, lowered from 70 mN m^{-1} to approximately 33 mN m^{-1} after 3 h when the bubble is submitted to oscillations ($T=10 \text{ s}$ and $\Delta A=15\%$, Figure 1). This γ value is in good agreement with that determined by Needham and co-workers at 37°C ^[22] in a study where the interfacial tension was measured by using a micropipette technique that allows equilibrium measurements. This confirms that our experimental conditions allow studying a DPPC film at equilibrium with the aqueous phase.

Concerning the transition (arrow on Figure 1A), it depends directly on the oscillation period (Figure 2). For $T \leq 3 \text{ s}$ and $T \geq 100 \text{ s}$, the adsorption profiles feature monotonous decays during the observation period (22 h). By contrast, for $4 \text{ s} \leq T < 90 \text{ s}$, a second regime sets in at approximately 50 mN m^{-1} , in which the phospholipid adsorption accelerates and the γ value drops more rapidly. This happening reflects a transition in the DPPC film between a low-density phase and a higher-density phase. When the period T increases, the coexistence plateau between the two

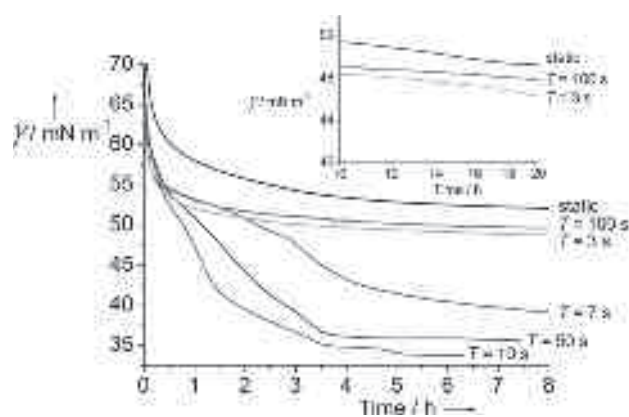


Figure 2. Effect of the oscillation period (T) on the kinetics of adsorption of DPPC ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, as a dispersion of vesicles) at the surface of an oscillating air bubble (37°C , $\Delta A=15\%$). The case of the static bubble has been added for comparison. Inset: Representation in log scale showing the kinetics over 20 h.

phases becomes shorter and the interfacial tension γ decreases faster until the period T reaches approximately 50 s, after which the adsorption rate slows down again.

These observations suggest that this transition, observed here in an adsorbed (Gibbs-like) film, is an LE/LC first-order phase transition similar to that observed for DPPC Langmuir monolayers. The value of the LE/LC coexistence γ (52 mN m^{-1}) is comparable to that found for a DPPC Langmuir monolayer ($\gamma=45\text{--}55 \text{ mN m}^{-1}$, 40°C).^[10] Visual observation of condensed domains on phospholipid microbubbles has been reported;^[23] but the variation of the interfacial tension γ was not measured.

The rates of adsorption of DPPC were quantified by determining the characteristic times t_1 and t_2 of the two regimes found in the adsorption profiles (see the Experimental Section). The time t_1 corresponds to the adsorption of the DPPC molecules at the interface and the time t_2 to the transfer of DPPC molecules from the LE phase to the LC phase.

First, it is seen that the oscillatory regime has a strong impact on t_1 (Table S1 in the Supporting Information). Second, the oscillation period has little or no effect on t_1 (Table S1). Moreover, we checked that the rate of stirring of the test sample has no effect on the rate of adsorption of the phospholipid. This means that convection has no significant effect and that the overall phenomenon is not controlled by diffusion through the bulk phase or time-limited by formation of the LE phase. This led us to hypothesize that the phenomenon is directed by mechanisms occurring during the LE/LC transition.

To verify this hypothesis, the effect of the oscillatory regime on t_2 , the final relaxation time of the system, was investigated. We found indeed that t_2 is largely impacted by both the period and amplitude of the deformation applied to the bubble. The effect of the oscillation period on t_2 , at 37°C and for $\Delta A=15\%$, is reported in Figure 3. It is found that t_2 first decreases sharply with the period T , attains a minimum for $10 \text{ s} < T < 30 \text{ s}$, and subsequently increases again.

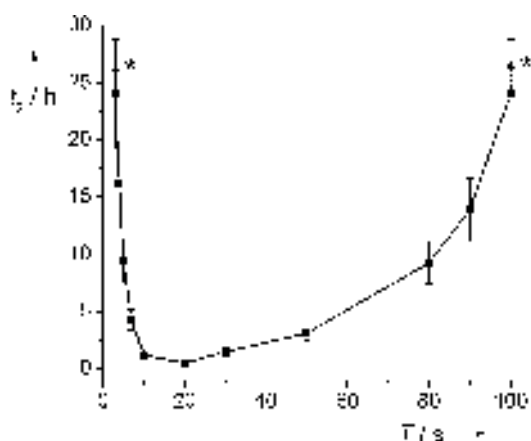


Figure 3. Characteristic time t_2 of the second regime of the DPPC adsorption at 37 °C, as a function of the bubble's oscillation period T for $\Delta A = 15\%$. * These t_2 values are higher than 24 h and could therefore not be determined precisely.

This means that for periods comprised between 7 and 50 s the characteristic time of the monolayer t_2 matches that of the oscillation, thereby allowing an increase of DPPC adsorption. In this situation, the oscillatory regime facilitates the recruitment of DPPC molecules at the interface during the expansion phase and their organization in LC domains during the compression phase.

For smaller periods ($T \leq 3$ s), the characteristic time of the DPPC film transition is longer than the oscillation period. Consequently, the oscillatory regime has no effect on DPPC adsorption during expansion or on the building up and growth of LC domains during compression. The bubbles oscillating at such low periods behave essentially like static bubbles, and t_2 values remain high. The same result is seen for periods larger than 50 s, for which the characteristic time of the transition is small relative to that of the deformation. The DPPC monolayer can relax more freely and hence respreads easily, leading again to high t_2 values.

The effect, for a given period ($T = 10$ s), of the amplitude of the oscillation-driven bubble deformation on the γ -lowering kinetics is shown in Figure 4 (the γ variation versus time

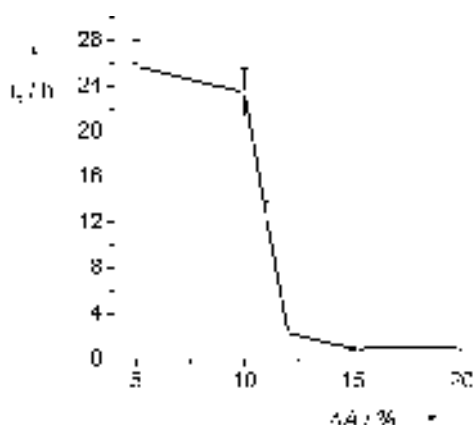


Figure 4. Characteristic time t_2 of the adsorption of DPPC in the second regime as a function of the variation of the surface area of the bubble, ΔA . The oscillation period T was 10 s. Temperature was 37 °C.

is given in Figure S2; see also Table S2 in Supporting Information). The 10 s period is the lowest T value that leads to accelerated DPPC adsorption (Figure 3).

Figure 4 shows that t_2 is high, that is, the adsorption rate is slow, until the amplitude ΔA of the variation of the surface of the bubble reaches approximately 10%, after which t_2 decreases sharply and levels off when ΔA attains approximately 15%.

The Gibbs viscoelastic moduli E of the DPPC shell were determined for both the static and oscillating bubbles. In the former case, it was important to minimize the perturbation of the phospholipid film during the measurement. Therefore, the bubble was only submitted to a short series of five oscillations with a deformation amplitude ($\Delta A = 1$ and 2%) well below the amplitude that causes the drop seen on Figure 4, and for T values ranging from 3 to 20 s. Under these conditions, after 12 h ($\gamma = 51 \text{ mN m}^{-1}$), E was $(28 \pm 1.5) \text{ mN m}^{-1}$. By contrast, the E value was much higher (70 mN m^{-1}) when the bubble was submitted to the above oscillatory regime, that is, the bubble is perturbed immediately after formation ($T = 10$ s, $\Delta A = 15\%$). The fact that, after the same time span (12 h), the E value increased to such a large extent confirms the reorganization of the DPPC film toward a more organized state. The E value increases with time up to a point at which it levels off (Figure S3 in the Supporting Information). This point corresponds to the limit of compressibility of the LE phase, which occurs when the LC domains are percolated and somewhat before the LE/LC transition is completed.

To examine whether or not the γ value that is obtained under oscillations is an equilibrium value, the bubble was monitored for 12 h after the oscillations had been stopped. Figure 1 shows that the interfacial tension γ stays at its minimum value, thus indicating that equilibrium is attained. Likewise, the E value remained constant at 70 mN m^{-1} .

The exchange of phospholipids between vesicles and an adsorbed monolayer occurs predominantly between the outer lipid layer of the vesicles and the monolayer.^[14,24] This exchange proceeds through diffusion collisions that involve individual molecules with regained mobility of their hydrophobic tails owing to transient abolishment of hydrophobic interactions. The fact that the kinetics of equilibration of vesicle-forming phospholipids at the air/water interface is highly sensitive to the chain length of the phospholipid (a decrease of ca. one order of magnitude per two CH_2 groups) also supports that diffusion of individual molecules (rather than fusion of large assemblies such as bilayer fragments) is at work in the process.^[15]

When oscillations are applied, our observations are consistent with a mechanism in which the unexpected permanent lowering of the γ value is due to a coupling between the adsorption of DPPC molecules present in vesicles at the interface and the relaxation of the interfacial Gibbs-like DPPC film. During the expansion phase, the relative surface occupied by the LE phase increases, thus providing a driving force for recruitment of additional DPPC molecules from the phospholipid reservoir (Figure 5 a, b). The concentration of DPPC molecules forming the LE phase is increased, which in turn shifts the equilibrium of the phases toward formation of the LC phase (Figure 5 c). The compres-

- [9] R. Wüstneck, N. Wüstneck, D. O. Grigoriev, U. Pison, R. Miller, *Colloids Surf. B* **1999**, *15*, 275.
- [10] J. B. Li, G. Kretzschmar, R. Miller, H. Möhwald, *Colloids Surf. A* **1999**, *149*, 491.
- [11] R. Wüstneck, N. Wüstneck, B. Moser, V. Karageorgieva, U. Pison, *Langmuir* **2002**, *18*, 1119.
- [12] N. Wüstneck, R. Wüstneck, U. Pison, *Langmuir* **2003**, *19*, 7521.
- [13] H. Bachofen, U. Gerber, P. Gehr, M. Amrein, S. Schürch, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2005**, *1720*, 59.
- [14] H. Schindler, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1979**, 555, 316.
- [15] A. Kabalnov, J. Weers, R. Arlauskas, T. Tarara, *Langmuir* **1995**, *11*, 2966.
- [16] X. Wen, E. I. Franses, *Langmuir* **2001**, *17*, 3194.
- [17] P. N. Nguyen, T. T. Trinh Dang, G. Waton, T. Vandamme, M. P. Krafft, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 2646.
- [18] Z. Wang, O. Gurel, J. E. Baatz, R. H. Notter, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19104.
- [19] Z. Wang, A. L. Schwan, L. L. Lairson, J. S. O'Donnell, G. F. Byrne, A. Foye, B. A. Holm, R. H. Notter, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2003**, 285, L550.
- [20] G. Cevc, *Phospholipids Handbook*, M. Dekker, New York, **1993**.
- [21] The slight drift seen in part c might be due to the fact that, when the oscillations are stopped, the bubble volume is slightly different from the mean bubble volume.
- [22] S. Lee, D. H. Kim, D. Needham, *Langmuir* **2001**, *17*, 5544.
- [23] G. Pu, M. L. Longo, M. A. Borden, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6524.
- [24] F. Jähning, *Biophys. J.* **1984**, *46*, 687.
- [25] J. J. Kwan, M. A. Borden, *Langmuir* **2010**, *26*, 6542.
- [26] S. H. Kim, Y. Park, S. Matalon, E. I. Franses, *Colloids Surf. B* **2008**, *67*, 253.
- [27] J. Benjamins, A. Cagna, E. H. Lucassen Reynders, *Colloids Surf. A* **1996**, *114*, 245.



Supporting Information

© Wiley-VCH 2013

69451 Weinheim, Germany

Behavior of an Adsorbed Phospholipid Monolayer Submitted to Prolonged Periodical Surface Density Variations**

*Phuc Nghia Nguyen, Gilles Waton, Thierry Vandamme, and Marie Pierre Krafft**

anie_201301974_sm_miscellaneous_information.pdf

Supporting Information

Table S1. Characteristic times for the first (t_1) and second (t_2) regimes of the DPC adsorption kinetics at the surface of an oscillating air bubble (37°C, $\Delta A = 15\%$), as a function of the oscillation period T .

T (s)	Static	3	4	5	7	10	20	30	50	80	90	100
t_1 (h)	1.4	0.10	0.2	0.40	0.12	0.20	0.17	0.10	0.15	0.44	0.50	0.095
t_2 (h)	> 24	> 24	16	9.5	4.1	1.4	0.5	1.4	3.1	9.2	14	> 24

Table S2. Characteristic times for the first (t_1) and second (t_2) regimes of the DPC adsorption kinetics at the surface of an oscillating air bubble (37°C, $T = 10$ s), as a function of the amplitude ΔA of the bubble's deformation.

ΔA (%)	5	10	11	12	15	20
t_1 (h)	0.14	0.31	0.18	0.34	0.20	0.19
t_2 (h)	25	23	13	2.3	1.4	1.0

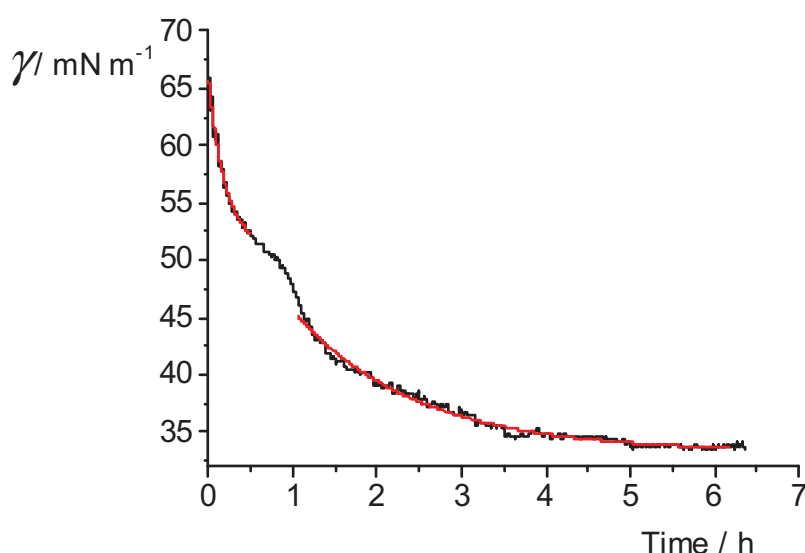


Figure S1. Kinetics of adsorption of DPPC (10^{-3} mol L $^{-1}$, as a dispersion of vesicles) at the surface of an oscillating air bubble ($T = 10$ s, $\Delta A = 15\%$, 37°C). The characteristic times of the first and second regimes (0.20 h and 1.4 h) were obtained by fitting the corresponding portions (in red) of the curve with a decay exponential function $y = y_0 + Ae^{-xt}$.

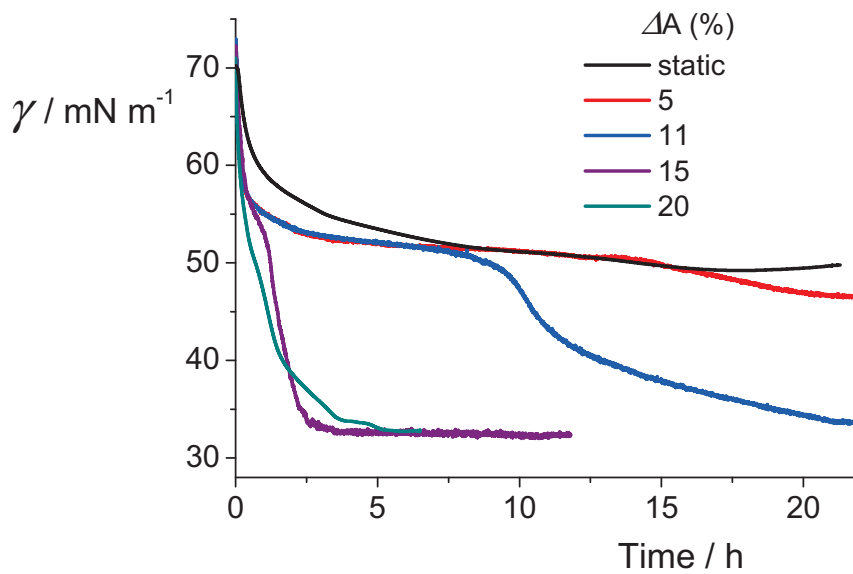


Figure S2. Effect of the amplitude ΔA of the bubble's deformation on the kinetics of adsorption of DPPC ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, as a dispersion of vesicles) at the surface of an oscillating air bubble ($T = 10 \text{ s}$, 37°C). The case of the static bubble has been added for comparison.

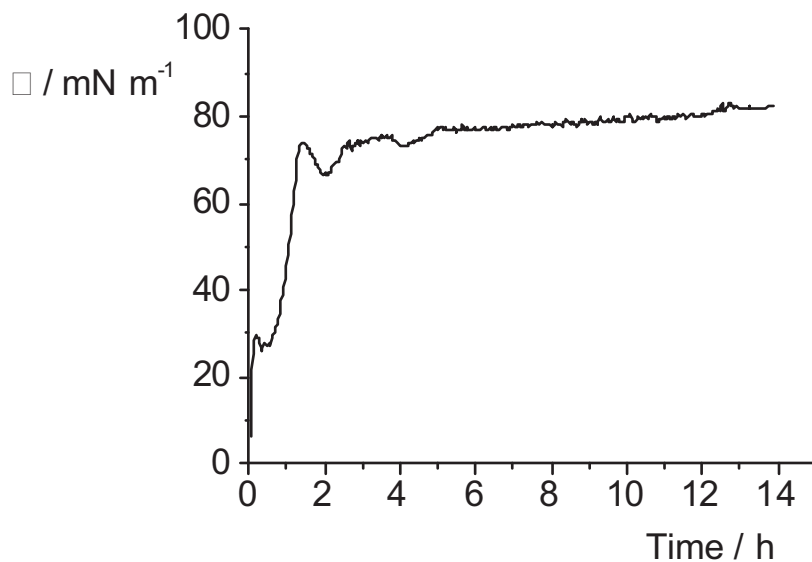


Figure S3. Variation of the Gibbs viscoelastic modulus G of the DPPC shell at the surface of an oscillating bubble ($T = 10 \text{ s}$, $\Delta A = 15\%$) as a function of time.

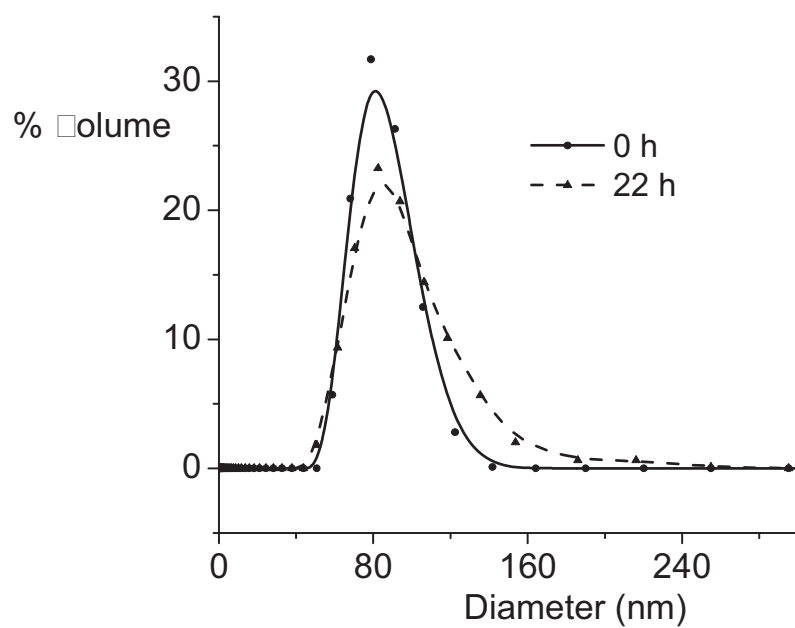


Figure S4. Size distribution of DPPC vesicles immediately after preparation (straight line), and after 22 h (dashed line) at 37°C as determined by dynamic light scattering.

III.4. Adsorption des phospholipides en présence d'albumine

Nous avons étudié l'effet de l'albumine sérique bovine sur l'adsorption de la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). En effet, la présence de cette protéine est souvent liée aux troubles pulmonaires dus au mauvais fonctionnement du surfactant pulmonaire. L'adsorption compétitive de la DPPC et de l'albumine à l'interface air/eau a été étudiée par tensiométrie par analyse de profil de bulle. Nous avons observé que des oscillations sinusoïdales, lorsqu'elles sont appliquées suffisamment longtemps (pendant plusieurs heures), provoquaient l'éviction de la protéine de l'interface, qu'elle colonise très rapidement, et à son remplacement par le phospholipide. Ce phénomène est fortement accéléré lorsque l'interface air/eau est remplacée par l'interface fluorocarbure gazeux/eau. A la fin de l'expérience, la valeur de la tension interfaciale est celle caractéristique des films de DPPC placés sous un régime oscillatoire. En l'absence d'oscillation, par contre, l'albumine reste adsorbée à l'interface, prohibant l'accès de cette dernière à la DPPC.

Dans une autre série d'expériences, nous avons montré que lorsque le film de phospholipide est placé sous oscillations, et a atteint son degré d'organisation maximal, l'adsorption de l'albumine est rendue impossible.

Ces résultats ont été rassemblés dans le manuscrit intitulé « Prolonged sinusoidal oscillations can reverse the course of the competitive adsorption of phospholipids and proteins at an air/water interface; a fluorocarbon gas accelerates the phenomenon » soumis à *Chemical Science*.

Cite this: DOI: 10.1039/c0xx00000x

www.rsc.org/xxxxxx

EDGE ARTICLE

Prolonged sinusoidal oscillations can reverse the course of the competitive adsorption of phospholipids and proteins at an air/water interface; a fluorocarbon gas accelerates the phenomenon†

Phuc Nghia Nguyen,^a Gilles Waton,^a Thierry Vandamme^b and Marie Pierre Krafft^{*a}⁵ Received (in XXX, XXX) XthXXXXXXXXXX 20XX, Accepted Xth XXXXXXXXXXXX 20XX

DOI: 10.1039/b000000x

This paper describes the competitive adsorption of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and bovine serum albumin (BSA) at the surface of a gas bubble submitted to sustained sinusoidal oscillations at frequencies close to those encountered in respiration. We found that, in these conditions, DPPC can totally displace BSA from the interface. The periodical surface variations dramatically accelerate the phospholipid's adsorption kinetics, induce a dilute-to-condensed phase transition in the interfacial film, and permanently decrease the interfacial tension. In the absence of such oscillations, BSA is rapidly adsorbed at the interface, hindering the access of DPPC. Remarkably, when BSA is added after the DPPC film has attained its oscillation-driven condensed state, the penetration of the protein does no longer occur. Prolonged periodical variations in the 7 to 50 s period range thus provide a convenient tool for investigating, and counteracting, the inhibitory effect of BSA towards phospholipid adsorption at an interface. More generally, use of oscillations of appropriate frequency can provide a potent new tool for studying interfacial adsorption phenomena that are too slow for investigation in practical time frames. We further show that the kinetics of expulsion of BSA by DPPC can be increased by an order of magnitude by introducing a fluorocarbon in the bubble's gas phase. Our results may provide means for counteracting the potent lung surfactant inactivating effect of BSA.

Introduction

Extensive efforts are being devoted to understanding the interactions between phospholipids and proteins at interfaces as these membrane components are ubiquitous in biology and in many biotechnological and medical applications. Controlling phospholipid/protein interaction in thin films is the basis for the development of novel biomaterials-based devices in the areas of micro-electronics, information processing and storage, nano/microfluidic devices, and biodetection.¹⁻³ An example of biointerface in which the interplay between phospholipids and proteins is crucial is provided by the lining of the pulmonary alveoli with lung surfactant. The native lung surfactant is a complex mixture of phospholipids, mainly dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), and specific proteins.⁴⁻⁷ The "insoluble" DPPC is generally considered as being responsible for generating the near-zero surface tension needed to minimize the work of breathing.^{8, 9} The specific surfactant proteins facilitate re-spreading of DPPC on the alveolar surface during inspiration. On the other hand, serum proteins (e.g. albumins, globulins, cytokines) are involved in the development of the acute respiratory distress syndrome (ARDS, a high mortality condition).^{7, 10-14} Hence, the many studies that have

been conducted on insoluble phospholipids, mainly on DPPC and albumin using spread Langmuir films.¹⁵⁻¹⁸ In the lung, however, the interfacial film is a Gibbs-type adsorbed film. Moreover, the Langmuir film studies overlook the essential role of lipid reservoirs that the vesicles present in the mucus of the alveoli play in the interfacial film relaxation process.

One roadblock in the treatment of ARDS is that the protein (e.g. albumin) quickly colonizes the interface and hinders the access of DPPC brought by a surfactant substitute to this interface. We wanted to determine whether, and in which conditions, albumin can be displaced by DPPC at a gas/water interface. We also investigated whether it was possible to accelerate phospholipid adsorption in order to maximize albumin displacement efficacy. Here, we report that DPPC adsorbed as interfacial Gibbs films from DPPC vesicles can displace bovine serum albumin (BSA) from this interface when submitted to prolonged oscillations at frequencies close to those encountered in human respiration. These results contravene the generally accepted notion that adsorption of DPPC at an air/water interface is inhibited by BSA.¹⁹⁻²² When oscillations were applied previously, it was only for very short periods of time, preventing determination of the DPPC/BSA mixture adsorption kinetics. We have recently established that prolonged periodical surface

variations applied to a film of DPPC adsorbed on a bubble's surface and in contact with a dispersion of phospholipid vesicles provoke accelerated, oscillation frequency-dependent phospholipid adsorption and permanent lowering of the interfacial tension.²³ We now show that these findings provide an effective tool for investigating the competitive adsorption of a phospholipid against a protein at an air/water interface. More generally, these principles should apply to phenomena that exhibit a transition phase and very slow "natural" kinetics.

Further control of insoluble phospholipid adsorption was desirable. We and others have established that fluorocarbons and fluorocarbon emulsions can greatly facilitate DPPC re-spreading²⁴⁻²⁹ and prevent the deleterious effect of BSA penetration in DPPC monolayers.³⁰ We have also reported that fluorocarbons, when part of the bubble's gas phase, dramatically lower the equilibrium interfacial tension of phospholipids, hence playing the unexpected role of a co-surfactant.^{31,32} We show here that, when oscillations are applied, perfluorohexane gas accelerates by an order of magnitude the rate of expulsion of BSA by DPPC.

Results and Discussion

Bubble profile analysis tensiometry was used to study the competitive adsorption of DPPC and BSA at the interface of an air bubble submitted to sinusoidal oscillations at 37°C. DPPC was provided in the form of vesicles dispersed in the Hepes buffer. The bubble was static or submitted to series of sinusoidal oscillations with periods T of 3, 4, 10, 50, 90 and 100 s (i.e. frequencies f of 0.33, 0.25, 0.1, 0.02 and 0.01 Hz, respectively) and an amplitude ΔA of 15% of the bubble's surface area. Completion of the adsorption was sought. Therefore, the oscillatory regime was applied to the bubbles for long time frames (typically 12-24 h).

A. Adsorption kinetics of the individual interfacial components, the protein and phospholipid

We first investigated the behavior of BSA and DPPC separately under both static and oscillatory regimes.

BSA is readily soluble in water and conformationally stable over a wide range of salt and protein concentrations.³³ The isoelectric point of BSA varies from 4.6 to 5.1 depending on salt and buffer conditions,³⁴ which thus impacts on its adsorption at the air/water interface.³⁵⁻³⁸ The kinetics of BSA adsorption at the air/Hepes interface at 37°C are reported on Figure 1 for BSA concentrations c_{BSA} ranging from $1.5 \cdot 10^{-8}$ to $1.5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹. In the Hepes buffer, the negatively charged BSA adsorbs weakly at the interface, leading to only moderate lowering of the interfacial tension γ , at ~ 53 mN m⁻¹, even at high concentrations. The variation of γ as a function of c_{BSA} at 37°C is plotted on Figure 1 (Inset). It shows that γ decreases consistently until a concentration of $\sim 6 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹ is reached, after which γ is seen to plateau.

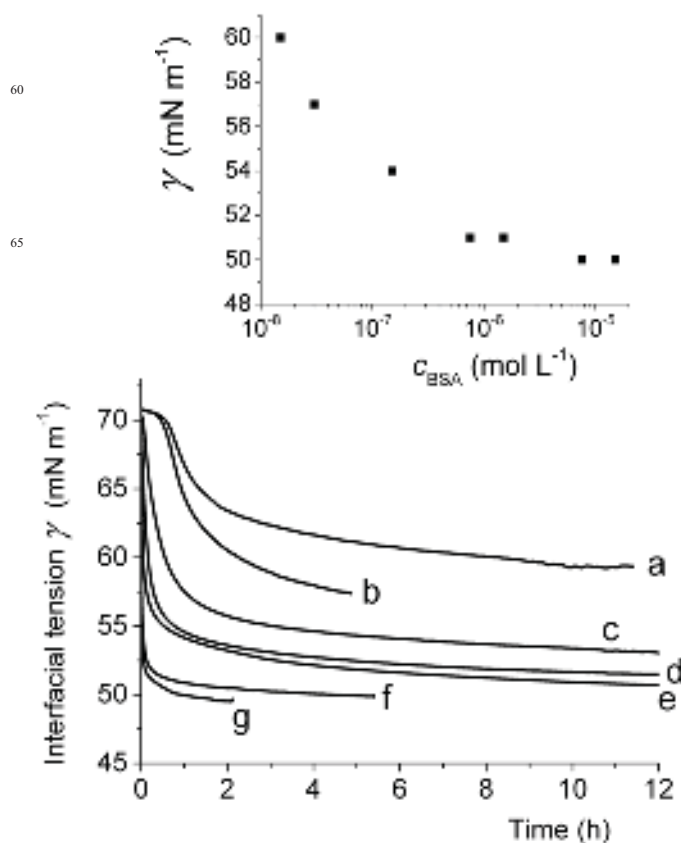


Figure 1. Kinetics of adsorption of BSA on the surface of an air bubble at 37°C (static bubbles). BSA concentrations in Hepes buffer were a) $1.5 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹; b) $3.0 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹; c) $7.5 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹; d) $1.5 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹; e) $7.5 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹; f) $1.5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; and g) $1.5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ (arrow). The inset shows the variation of the interfacial tension γ of an aqueous BSA solution as a function of BSA concentration c_{BSA} at 37°C.

At low concentrations the protein adsorption at the interface is controlled by its diffusion in the aqueous phase.³⁵ When surface coverage increases, an energy barrier starts opposing adsorption, the rate of which is determined by the ability of the protein molecules to penetrate and rearrange in the interfacial film. We described the adsorption kinetics by the characteristic time t_1 for the transfer of the BSA molecules from the buffer solution to the interface. Arbitrarily, this time was measured by fitting the $\gamma = f(t)$ experimental curves using an exponential decay function.³⁹

It was important to determine whether the oscillatory regime that was going to be applied in order to facilitate DPPC adsorption had any influence on BSA adsorption. The oscillations were found to have a detectable but limited effect on the adsorption kinetics ($t_1 = 1.1$ h and 1.5 h for the static and oscillating bubble, respectively; ESI Figure S1), owing to the fact that the oscillations increase convection, thus diffusion to the interface. On the other hand, oscillations have no effect on the minimal reachable γ value, which remains unchanged at ~ 50 mN m⁻¹. This shows that oscillations do not influence the rearrangement of the BSA molecules once adsorbed at the interface.

The behavior of DPPC is substantially different from that of BSA on every account. Indeed, when a film of DPPC adsorbed at

a bubble's surface is submitted to sinusoidal oscillations, the adsorption rate of the phospholipid ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, provided as a dispersion of vesicles in the HEPES buffer) at the interface is considerably accelerated and the interfacial tension is strongly lowered (by up to 20 mN m^{-1} ; Fig. 2, curve b), as compared to the static bubble (Fig. 2, curve a).²³ Moreover, the system reaches an equilibrium state after a few hours. The increase in adsorption rate is accompanied by a dilute-to-condensed phase transition (red arrow) that is analogous to the liquid expanded-to-liquid condensed phase transition found in Langmuir monolayers.⁴⁰ The adsorption of DPPC was found to be coupled with the oscillation-induced stretching and compression of the adsorbed film.²³ This coupling only occurs when the period of the oscillations applied to the bubble matches the characteristic time of the dilute-to-condensed phase transition. DPPC adsorption is then favored in the dilute phase while the film is stretched; whereas condensed domain build-up occurs when the film is compressed.

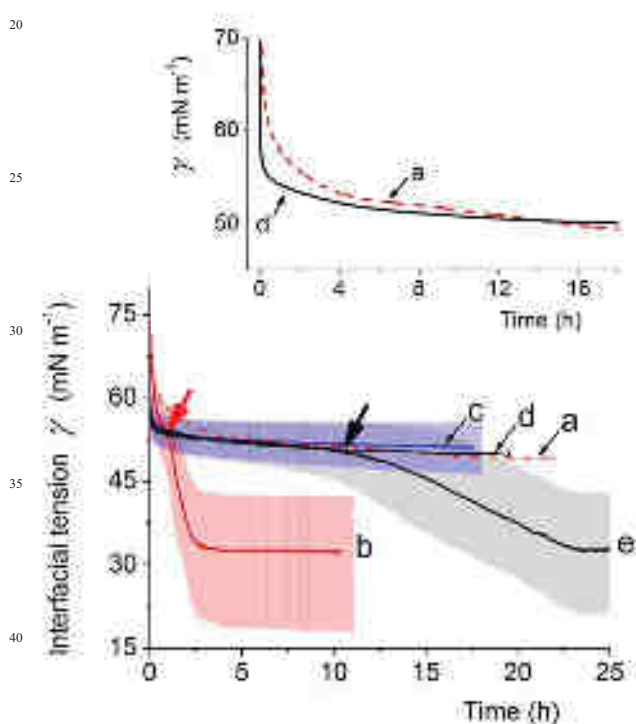


Figure 2. Kinetics of adsorption (37°C) at the surface of an air bubble of a) and b) DPPC alone ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$); c) BSA alone ($7.5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$); d) and e) DPPC/BSA ($1 \cdot 10^{-3} : 7.5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) combination. DPPC was provided as an aqueous dispersion of vesicles. In a) and d) the bubble was static (a magnification is shown in the inset for clarity); in b), c) and e) the bubble was submitted to oscillations (T 10 s, ΔA 15%) for 10 to 25 h throughout the experiment. The lightly colored areas represent the fluctuations in interfacial tension associated with the oscillations. The solid lines correspond to mean values obtained by treating the data through a low-pass digital filter. The thick arrows indicate the dilute-to-condensed phase transition point in the DPPC monolayer (red) and in the DPPC/BSA mixture (black).

B. Competitive adsorption of DPPC and BSA at an air/water interface

Figure 2 displays the adsorption profile of a DPPC/BSA mixture as a film adsorbed on a bubble's surface when submitted to an oscillatory regime (curve e) along with those of pure DPPC and pure BSA (curves b and c, respectively). The concentration of DPPC was $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ and that of BSA was $7.5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. These concentrations correspond to the $\sim 1:10$ (w/w) DPPC/BSA weight ratio that reflects the natural occurrence of the two components in the lung surfactant. The period of 10 s was chosen because it corresponds to the minimum of the $\gamma = f(T)$ curve.²³

The adsorption profile of the DPPC/BSA mixture (Figure 2, curve e) is first similar to that of BSA when adsorbed alone ($t_1 = 0.4 \text{ h}$ in both cases, Table 1). After $\sim 10 \text{ h}$, a second regime sets in that is accompanied by a sharper decrease of γ that indicates progressive adsorption of DPPC at the interface. The dilute-to-condensed phase transition seen on the DPPC adsorption isotherm is also observed in the mixed DPPC/BSA system at essentially the same γ value, that is, $\sim 50\text{--}55 \text{ mN m}^{-1}$ (arrows). After $\sim 23 \text{ h}$, γ reaches its lowest value of $\sim 33 \text{ mN m}^{-1}$, similar to that measured for pure DPPC. This means that the BSA molecules have been displaced from the interface and replaced by DPPC molecules. This behavior is highly reproducible, provided the DPPC vesicles have a constant small size (here $\sim 80 \text{ nm}$).

In order to investigate the influence of various parameters (T , c_{BSA}) on DPPC/BSA adsorption, the kinetics were described by the characteristic times t_1 and t_2 , associated with the two above identified regimes. t_2 is the time characteristic for the transfer of DPPC molecules from the dilute to the condensed phase. We determined t_1 and t_2 by fitting the corresponding sections of the experimental curves with exponential decay functions.

The effect of the period of the oscillations on the characteristic time t_2 is shown on Figure 3. It is found that t_2 first decreases sharply with T , attains a minimum for $7 \text{ s} < T < 90 \text{ s}$, and subsequently increases again. The fastest DPPC adsorption, and fastest concomitant BSA displacement, occurs within a period range of 7 s to 90 s.

This means that in the 7-90 s range the characteristic time of the DPPC/BSA monolayer relaxation matches with the characteristic time of the perturbation applied to the bubble, allowing an increase of DPPC adsorption. In this situation, the oscillatory regime *i*) facilitates the recruitment of DPPC molecules at the interface during the expansion phase to form the dilute (liquid expanded-like) phase at the interface and *ii*) promotes their organization in liquid condensed domains during the compression phase. For smaller periods ($T \leq 3 \text{ s}$) the characteristic time of the DPPC film transition is longer than the oscillation's period. Consequently, the oscillatory regime has little or no effect on DPPC adsorption during expansion or on the building up and growth of LC domains during compression. The bubbles oscillating at such low periods behave essentially like static bubbles, and t_2 remain high. The same result is seen for periods larger than 90 s, for which the transition's characteristic time is small relative to that of the deformation.

Interestingly, the range of periods for which the coupling between the oscillation period and the relaxation of the DPPC/BSA system occurs is augmented toward the large T values, as compared to that determined in the absence of BSA.

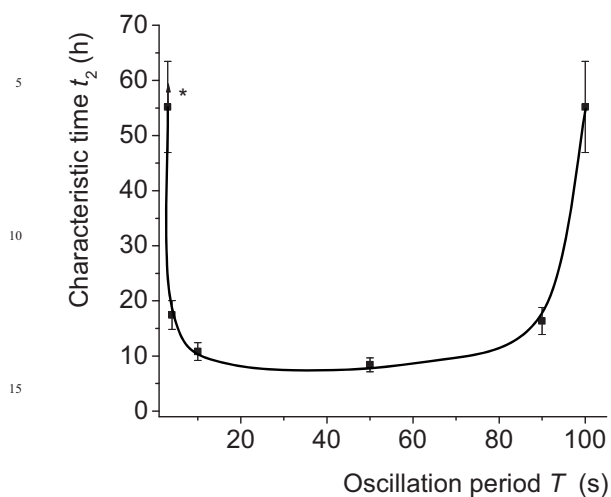


Figure 3. Characteristic time t_2 of the second regime of the DPPC/BSA adsorption at 37°C, as a function of the bubble's oscillation period T for $\Delta A = 15\%$. *This t_2 value is larger than ~ 60 h.

This can be explained by the fact that the initially adsorbed BSA molecules that remain at the interface hinder the diffusion of the DPPC molecules from the dilute LE phase to the condensed LC phase.

For comparison, we have also studied the competitive adsorption of DPPC and BSA at the surface of a static bubble. It is seen (Figure 2, curve d) that in this case the minimal reachable γ value is exactly the same as that measured for BSA adsorption when alone (Figure S1). This experiment confirms that, in the absence of oscillations, DPPC cannot displace BSA and is prevented from adsorbing at the interface.

The influence of the concentration of albumin on the competitive adsorption of DPPC and BSA was also investigated. When c_{BSA} is doubled the BSA adsorption rate is increased but the same γ is eventually reached (see the ESI, Figure S2).

C. Can BSA penetrate into a preformed condensed adsorbed DPPC film?

An important question was whether BSA can penetrate a DPPC film once it has been reorganized in the bubble wall under the effects of oscillations. Therefore, in a further series of experiments, DPPC was first allowed to adsorb at the bubble's air/water interface while submitted to the oscillatory regime. After the equilibrium γ_{eq} value had been attained ($\sim 33 \text{ mN m}^{-1}$), BSA was introduced in the aqueous phase. As seen on Figure 4, the addition of BSA (arrow) did not result in any significant change in γ , which remained at $\sim 33 \text{ mN m}^{-1}$. This shows that once DPPC has formed a condensed LC-type adsorbed film, the protein can no longer penetrate this film and displace the phospholipid.

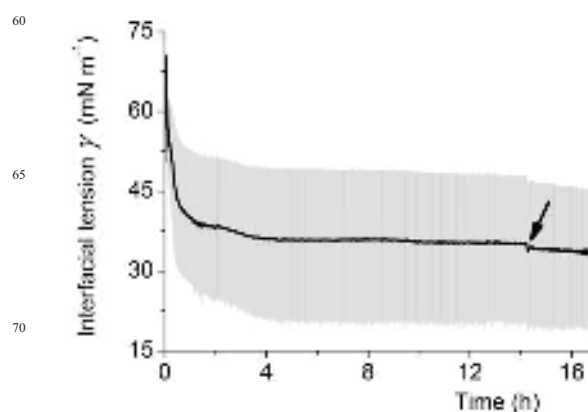


Figure 4. Variation at 37°C of the interfacial tension γ over time in the case when DPPC ($1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) is first allowed to adsorb at the air/water interface while oscillations are applied (T 10 s, ΔA 20%), followed by (arrow) the introduction of BSA ($7.5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) in the aqueous phase. The solid line corresponds to mean values obtained by treating the data through a low-pass digital filter.

D. Acceleration of the competitive DPPC/BSA adsorption kinetics by a fluorocarbon gas

We undertook to investigate whether a fluorocarbon gas would influence the phospholipid/protein adsorption at the gas/water interface for several reasons. First, we have recently shown that, in a static regime, perfluorohexane (*F*-hexane), accelerates adsorption of a series of phospholipids and decreases γ_{eq} , thus acting as a co-surfactant in spite of the fact that this compound is totally apolar.³¹ Second, fluorocarbons are used as effective stabilizing agents for microbubbles used as contrast agents in diagnostics.^{32, 41, 42} Third, the fluidizing effect induced by fluorocarbon gases on DPPC Langmuir monolayers,^{25, 26} was also found to counteract the deleterious effect of albumin on DPPC respreading.³⁰ Albumin adsorbs indeed at the interface during alveoli expansion and develops a surface pressure that maintains the DPPC monolayer in a liquid condensed state, that hinders respiration.¹²

The influence of *F*-hexane on the competitive adsorption of DPPC and BSA was studied using the oscillating bubble conditions (Figure 5).

All the kinetic data are compared in Table 1 that displays the characteristic times t_1 and t_2 of the adsorption profiles. They show that the presence of the fluorocarbon significantly increases the rates of adsorption of DPPC and of the concomitant desorption of BSA, but for when DPPC is alone.

Table 1. Characteristic times t_1 and t_2 for the adsorption of DPPC, BSA, and DPPC/BSA combination on the surface of a bubble filled with air, or with *F*-hexane-saturated air.

	DPPC	BSA	DPPC/BSA	DPPC/FC	DPPC/BSA/FC
t_1 (h)	0.20	0.40	0.40	0.07	0.07
t_2 (h)	0.65	-	11.1	1.9	1.2

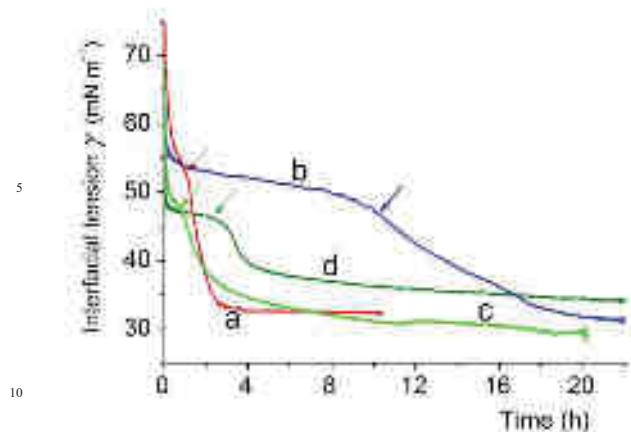


Figure 5. Kinetics of adsorption (37°C) at the surface of an air bubble of a) and c) DPPC alone (10^{-3} mol L $^{-1}$, provided as a dispersion of vesicles); b) and d) DPPC/BSA ($1 \cdot 10^{-3}$: $7.5 \cdot 10^{-7}$ mol L $^{-1}$) combination; the DPPC, or DPPC/BSA combination, is adsorbed at the surface of a bubble of air (a) and b)) or at the surface of a bubble of air saturated with *F*-hexane (c) and d)). All the bubbles were submitted to oscillations (T 10 s, ΔA 15%) throughout the experiments. The solid lines correspond to mean values obtained by treating the data through a low-pass digital filter.

In the absence of BSA *F*-hexane decreases t_1 for DPPC. As a consequence, the LE/LC transition intervenes faster and at a lower γ , likely due to the fact that fluorocarbon molecules quickly adsorb at the interface, where they contribute to break the crystalline structure of water, thus facilitating the anchoring of DPPC molecules at the interface. On the other hand, t_2 is increased by a factor of ~ 3 . This means that *F*-hexane hinders the ordering of the DPPC molecules at the interface. However, γ_{eq} reaches eventually the same value (~ 33 mN m $^{-1}$). In the presence of BSA, *F*-hexane also decreases t_1 to a comparable extent. But the remarkable observation is that the fluorocarbon decreases t_2 by approximately one order of magnitude, from 11.1 h to 1.2 h. The fluorocarbon thus strongly accelerates the ordering of the phospholipid film into a higher condensed state, thus acting as an efficient promoter for protein displacement. This novel property of the biologically inert fluorocarbons can be added to the toolbox of biomolecular sciences.^{43, 44}

Conclusions

We establish that the quasi-insoluble phospholipid DPPC, which, according to studies done in static conditions, does not adsorb significantly at an air/water interface and cannot exercise its interfacial tension lowering effect when BSA is present, does displace BSA and lower the interfacial tension when the interfacial Gibbs-type adsorbed film is submitted to prolonged sinusoidal oscillations. The chosen oscillation period (10 s) and amplitude of the surface variation (15%) are close to those of human respiration in normal conditions. A dilute-to-condensed phase transition is observed for the DPPC/BSA mixture. We also show that BSA does not penetrate an adsorbed DPPC film when the protein is admitted after the phospholipid film has attained its oscillation-driven equilibrium condensed state. We believe that these results are relevant to lung surfactant film dynamics, not considering the key role of the specific lung surfactant proteins. They are also relevant to phospholipid-coated bubble engineering

and control for theranostic purposes. Furthermore, we show that introducing a fluorocarbon in the bubble's gas accelerates the adsorption kinetics by an order of magnitude. Finally, we demonstrate that application of oscillations to interfacial films can open new possibilities for the investigation of dynamic and transport properties in systems for which reaching equilibrium is quasi-forbidden due to the extremely slow adsorption kinetics in standard experimental conditions and practical time-frames.

Materials and experimental methods

Materials. L- α -1,2-dipalmitoyl-*sn*-3-glycero-phosphatidylcholine (DPPC, 99% purity), bovine serum albumin (BSA, 66.43 kD) and perfluorohexane (>99%) were purchased from Sigma and used without further purification. A solution of HEPES buffer (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, from Sigma) (20 mM) in 150 mM NaCl was prepared and its pH adjusted to 7.4 with 0.1 N NaOH. The buffer's equilibrium surface tension was 70 ± 0.2 mN m $^{-1}$ at 37°C. Water was obtained from a MilliQ (Millipore) system (surface tension: 71.7 ± 0.2 mN m $^{-1}$ at 20°C; resistivity 18.2 M Ω cm). All measurements were made at 37°C and repeated three to five times.

Preparation of phospholipid dispersions. Dispersions of DPPC (10^{-3} mol L $^{-1}$, 50 mL) were sonicated (30 min) until they became transparent.

Dynamic light scattering (DLS). A Malvern Zetasizer Nano ZS was used at 25°C for DLS measurements at a scattering angle of 90°. The *z*-averaged hydrodynamic mean diameters of the DPPC vesicles used for the tensiometry experiments were determined using the Malvern software to be 80 nm and the polydispersity was 20%.

Profile analysis tensiometry. Axisymmetric bubble shape analysis was applied to a rising bubble of air formed in the DPPC dispersion. Care was taken to only use vesicle dispersions having close mean diameters (~ 80 nm) and narrow size distributions. The time dependence of the interfacial tensions during adsorption of the phospholipid and protein at the gas/liquid interface was measured using a Tracker® tensiometer (Teclis, Longessaigne, France).⁴⁵ The bubble (5 μ L) was formed at the end of a steel capillary with a tip diameter of 1 mm. Since the experiments lasted for up to 25 h, a lid was fitted on the measuring glass cell (10 mL) to prevent evaporation of water during the long equilibration times. It was carefully determined that the systems had reached equilibrium at the end of each experiment.

Oscillating bubble measurements. Oscillations were produced by a position-encoded motor and transmitted to the bubble through a piston coupled to the syringe carrying the capillary. The oscillatory regime was applied from the beginning of the experiment on, once the intended volume of the bubble had been attained. The bubble was set under sinusoidal oscillations with periods of 4 s to 100 s and a surface variation amplitude of 15%. Temperature was regulated at 37°C. These conditions were kept constant throughout the experiments.

Saturation of the rising bubble with *F*-hexane. A 1 mL syringe was purged three times with the *F*-hexane-saturated air that surmounted liquid *F*-hexane (saturated vapor pressure and concentration at 25°C were $2.9 \cdot 10^4$ Pa and 11.66 mol m $^{-3}$,

respectively; water solubility at 25°C:⁴⁶ 2.7 10⁻⁴ mol m⁻³). The syringe was mounted on the injection cell of the tensiometer to form the rising bubble.

Acknowledgements: The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Program (FP7 2007-2013) under grant agreement n° NMP3-SL-2008-214032. The authors also thank the French Research Agency (ANR, Contract n° 2010-BLAN-0816-01) and the University of Strasbourg (UdS) for financial support. P.N.N acknowledges the EC for a research fellowship and the Réseau Français du Fluor for a travel grant.

Notes and references

^a *Systèmes Organisés Fluorés à Finalités Thérapeutiques (SOFFT) Institut Charles Sadron (CNRS ICS UPR 22). Université de Strasbourg. 23 rue du Loess, BP 84047. 67034 Strasbourg Cedex 2. France. E-mail : krafft@unistra.fr*
^b *Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives (CNRS UMR 7199). Université de Strasbourg, 74 Route du Rhin, 67401 Illkirch Cedex (France)*

† Electronic Supplementary Information (ESI) available: [Supporting data on BSA and DPPC/BSA adsorption] See DOI: 10.1039/b000000x/

‡ Footnotes should appear here. These might include comments relevant to but not central to the matter under discussion, limited experimental and spectral data, and crystallographic data.

1. P. Moraille and A. Badia, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 4303–4306.
2. N. L. Rosi and C. A. Mirkin, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 1547-1562.
3. X. Chen, S. Lenhart, S. Hirtz, N. Lu, H. Fuchs and L. Chi, *Acc. Chem. Res.*, 2007, **40**, 393-401.
4. R. H. Notter, *Lung surfactants: Basic science and clinical applications*, Marcel Dekker, New York, 2000.
5. M. Longo, A. Bisagno, J. Zasadzinski, R. Bruni and A. Waring, *Science*, 1993, **261**, 453-456.
6. J. A. Zasadzinski, J. Ding, H. E. Warriner, F. Bringezu and A. J. Waring, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2001, **6**, 506-513.
7. Y. Y. Zuo, R. A. W. Veldhuizen, A. W. Neumann, N. O. Petersen and F. Possmayer, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1778**, 1947-1977.
8. S. Schürch, *Respir. Physiol.*, 1982, **48**, 339-355.
9. J. Goerke and J. Gonzales, *J. Appl. Physiol.*, 1981, **51**, 1108-1114.
10. W. Seeger, C. Grube, A. Günther and R. Schmidt, *Eur. Respir. J.*, 1993, **6**, 971-977.
11. B. A. Holm, R. H. Notter and J. N. Finkelstein, *Chem. Phys. Lipids*, 1985, **38**, 287-298.
12. H. E. Warriner, J. Ding, A. J. Waring and J. A. Zasadzinski, *Biophys. J.*, 2002, **82**, 835-842.
13. J. U. Balis, S. A. Shelley, M. J. McCue and M. S. Rappaport, *Exp. Mol. Pathol.*, 1971, **14**, 243-262.
14. T. Fuchimukai, T. Fuchiwara, A. Takahashi and G. Enhorning, *J. Appl. Physiol.*, 1987, **62**, 429-437.

15. D. Cho, G. Narsimhan and E. I. Franses, *Langmuir*, 1997, **13**, 4710-4715.
16. X. Wang, H. Zhang, G. Cui and J. Li, *J. Mol. Liq.*, 2001, **90**, 149-156.
17. X. Wang, Y. Zhang, J. Wu, M. Wang, G. Cui, J. Li and G. Brezesinski, *Colloids Surf. B*, 2002, **23**, 339-347.
18. X. Wang, Q. He, S. Zheng, G. Brezesinski, H. Möhwald and J. Li, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 14171-14177.
19. X. Wen and E. I. Franses, *Colloids Surf. A*, 2001, **190**, 319-332.
20. X. Wen and E. I. Franses, *Langmuir*, 2001, **17**, 3194-3201.
21. C.-C. Cheng and C.-H. Chang, *Langmuir*, 2000, **16**, 437-441.
22. S. H. Kim and E. I. Franses, *Colloids Surf. B*, 2005, **43**, 256-266.
23. P. N. Nguyen, G. Waton, T. Vandamme and M. P. Krafft, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, DOI: 10.1002/anie.201301974.
24. D. J. L. McIver, F. Possmayer and S. Schurch, *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, **751**, 74-80.
25. F. Gerber, M. P. Krafft, T. F. Vandamme, M. Goldmann and P. Fontaine, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 2749-2752.
26. F. Gerber, M. P. Krafft, T. F. Vandamme, M. Goldmann and P. Fontaine, *Biophys. J.*, 2006, **90**, 3184-3192.
27. H.-J. Lehmler, *Exp. Opin. Drug Deliv.*, 2007, **4**, 247-262.
28. F. Gerber, T. F. Vandamme and M. P. Krafft, *C. R. Acad. Sci. (Chimie)*, 2009, **12**, 180-187.
29. M. P. Krafft, *Biochimie*, 2012, **94**, 11-25.
30. F. Gerber, M. P. Krafft and T. F. Vandamme, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, 2007, **1768**, 490-494.
31. P. N. Nguyen, T. T. Trinh Dang, G. Waton, T. Vandamme and M. P. Krafft, *ChemPhysChem*, 2011, **12**, 2646-2652.
32. C. Szijjarto, S. Rossi, G. Waton and M. P. Krafft, *Langmuir*, 2012, **28**, 1182-1189.
33. F. Zhang, M. W. A. Skoda, R. M. J. Jacobs, R. A. Martin, C. M. Martin and F. Schreiber, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 251-259.
34. B. Jachimska, M. Wasilewska and Z. Adamczyk, *Langmuir*, 2008, **24**, 6867-6872.
35. D. E. Graham and M. C. Phillips, *J. Colloid Interface Sci.*, 1979, **70**, 403-414.
36. P. Suttiprasit, V. Krisdhasima and J. McGuire, *J. Colloid Interface Sci.*, 1992, **154**, 316-326.
37. A. Berthold, H. Schubert, N. Brandes, L. Kroh and R. Miller, *Colloids Surf. A*, 2007, **301**, 16-22.
38. B. A. Noskov, A. A. Mikhailovskaya, S.-Y. Lin, G. Loglio and R. Miller, *Langmuir*, 2010, **26**, 17225-17231.
39. No analytical function is available that can fit diffusive kinetics for rising bubbles.
40. D. Vollhardt, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1999, **79**, 19-57
41. E. S. Schutt, D. H. Klein, R. M. Mattrey and J. G. Riess, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, **42**, 3218-3235.
42. E. Stride and M. J. Edirisinghe, *Med. Biol. Eng. Comput.*, 2009, **47**, 809-811.
43. M. Cametti, B. Crousse, P. Metrangolo, R. Milani and G. Resnati, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 31-42.
44. J. G. Riess, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 2797-2920.
45. J. Benjamins, A. Cagna and E. H. Lucassen Reynders, *Colloids Surf. A*, 1996, **114**, 245-254.
46. A. Kabalnov, D. Klein, T. Pelura, E. Schutt and J. Weers, *Ultrasound Med. Biol.*, 1998, **24**, 739-749.

110

Supporting information

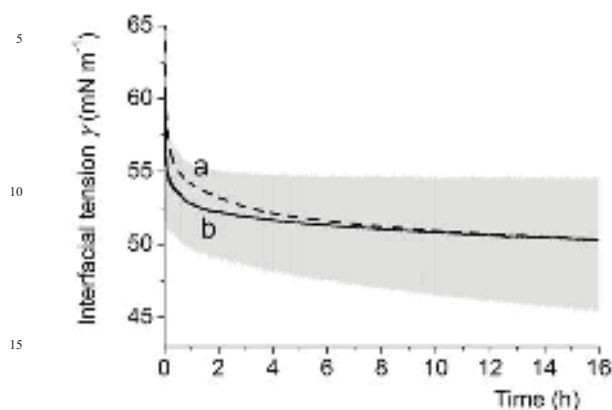
Prolonged sinusoidal oscillations can reverse the course of the competitive adsorption of phospholipids and proteins at an air/water interface; a fluorocarbon gas accelerates the phenomenon

Phuc Nghia Nguyen, Gilles Waton, Thierry Vandamme and Marie Pierre Krafft

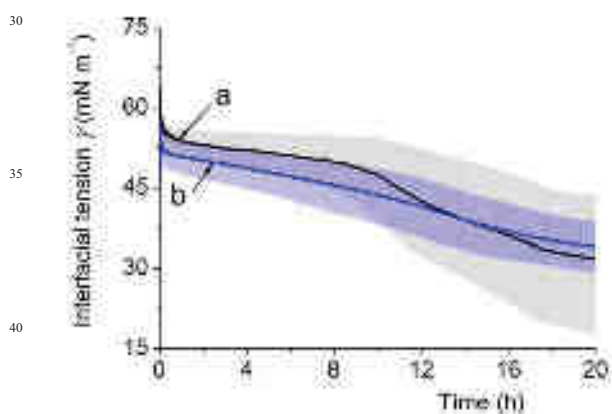
Cite this: DOI: 10.1039/c0xx00000x

www.rsc.org/xxxxxx

Electronic Supplementing Information



20 **Figure S1.** Kinetics of adsorption of BSA ($7.5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) at the surface of an air bubble at 37°C . The bubble was a) static (dotted line); b) submitted to oscillations (solid line; $T = 10 \text{ s}$, $\Delta A = 15\%$). The oscillatory regime was applied for $\sim 16 \text{ h}$. The grey area represents the fluctuations in interfacial tension associated with the oscillations. The solid line corresponds to mean values obtained by treating the data through a low-pass digital filter.



45 **Figure S2.** Kinetics of adsorption of DPPC/BSA mixture at the surface of an air bubble at 37°C . The DPPC/BSA concentrations were: a) $1 \cdot 10^{-3} : 7.5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ and b) $1 \cdot 10^{-3} : 1.5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. The bubble was submitted to oscillations ($T = 10 \text{ s}$, $\Delta A = 15\%$) for 20 h . The lightly colored area represents the fluctuations in interfacial tension associated with the oscillations. The solid lines correspond to mean values obtained by treating the data through a low-pass digital filter.

Chapitre IV : Résultats

Microbulles

Plusieurs agents de contraste pour l'échographie (le mode d'imagerie médicale le plus répandu et le plus fréquemment utilisé) sont commercialement disponibles. Il s'agit de microbulles gazeuses de quelques microns de diamètre, qui réfléchissent efficacement les ultrasons. Cependant, de simples microbulles d'air se dissolvent dans le sang en quelques secondes sous l'action combinée de la pression artérielle et de la pression de Laplace. Malgré l'emploi de fluorocarbures volatiles, dont la solubilité dans l'eau est beaucoup plus faible que celle de l'azote et de l'oxygène, la persistance intravasculaire des microbulles actuelles reste souvent insuffisante. Les microbulles injectables permettent aussi de délivrer des agents thérapeutiques, anticancéreux en particulier, qui peuvent être libérés par un pulse ultrasonique. Là encore, la persistance intravasculaire des microbulles et leur stabilité sous ultrasons restent trop faibles pour atteindre les tumeurs profondes.

Nous avons donc entrepris, dans le cadre d'un Contrat Européen FP7 (NanoMagDye, (NMP3-SL-2008-214032 ; Coordinateur G. Pourroy, IPCMS Strasbourg), d'élaborer et de caractériser des microbulles gazeuses possédant une paroi composée de phosphates perfluoroalkylés. Les chaînes fluorées sont destinées à augmenter la stabilité de l'interface air/eau. L'objectif du projet étant de développer des agents de contraste bimodaux pour l'échographie et l'imagerie par résonance magnétique, les têtes phosphates portées par les tensioactifs devaient permettre le greffage des nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3O_4).

Ce Chapitre est composé de deux sections : la préparation et la caractérisation des microbulles (IV.1) et le greffage des nanoparticules (IV.2).

IV.1. Stabilisation des microbulles par des phosphates perfluoroalkylés

Des microbulles possédant des durées de vie exceptionnellement longues, de l'ordre de plusieurs semaines, ont été préparées et caractérisées. Elles sont stabilisées par C_6F_{14} et leur paroi est formée par le phosphate perfluoroalkylé $C_8F_{17}(CH_2)_{11}OP(O)(OH)_2$. Leurs distributions de tailles sont mesurées par la mesure de l'atténuation acoustique, la diffusion statique de la lumière et la microscopie optique. La microscopie optique montre que le rayon des microbulles, qui est initialement de $\sim 4.5 \mu m$, diminue et atteint une valeur critique d' $\sim 1.25 \mu m$ après une dizaine d'heures. L'observation la plus surprenante est que, contrairement à ce que rapporte la littérature, les microbulles ne collapsent pas après avoir atteint ce rayon critique, mais continuent d'exister. Le mouvement brownien accru indique un changement de structure de la paroi. La microscopie optique ne permet de suivre les échantillons que pendant ~ 6 h, mais la méthode d'atténuation acoustique et la diffusion de la lumière montrent que ces microbulles persistent pendant plusieurs semaines, et que leur rayon moyen et leur distribution de taille restent quasi-inchangés. Ces résultats, pourraient s'expliquer par la tension interfaciale extrêmement basse atteinte par le tensioactif utilisé ($\sim 4 \text{ mN m}^{-1}$) lors d'une transition vers une phase du type liquide condensé (voir Chap. III.3) et sa pression de collapse très élevée. De telles microbulles, plus stables et de tailles prédéfinies, devraient présenter de nombreux avantages. En particulier, les amphiphiles fluorés devraient permettre de contrôler la microviscosité de la paroi, et donc de modifier les interactions microbulles / ultrasons et, par conséquent, la production des harmoniques.

Ces résultats ont été rassemblés dans un manuscrit intitulé «Self-assembled microbubbles that do not collapse» par G. Nikolova, P. N. Nguyen, P. Polavarapu, G. Waton et M.P. Krafft, actuellement en préparation.

Self-Assembled Microbubbles That Do Not Collapse

Gergana Nikolova, Phuc Nghia Nguyen, Prasad Polavarapu, Gilles Waton, Marie Pierre Krafft*

SOFFT Team

Institut Charles Sadron (UPR CNRS 22)

23 rue du Loess. 67034 Strasbourg Cedex (France)

Fax: (+33) 3 41 40 99

E-mail: krafft@unistra.fr

Homepage: <http://www-ics.u-strasbg.fr>

The potential of gas microbubbles in medicine has considerably broadened with their development as delivery and/or contrast agent platforms for gene therapy and multimodal imaging modalities (echosonography, magnetic resonance, fluorescence, etc.).^[1-5] Despite the extensive experimental and theoretical studies that have been performed in the recent years and, in particular, those aiming at better understanding the relative role and importance of the bubble's shell components and structure, and the nature of the internal gases, the mechanisms of growth - or deflation - and collapse of microbubbles are still poorly understood. In principle, very small bubbles with a supple flexible surfactant shell can be produced and be highly stable, provided their interfacial tension is close to zero.^[6,7] In reality, all the fluid-shell bubbles reported so far were observed to collapse irreversibly after a certain time and disappear.^[1,6,8] To our knowledge, there is no example in the literature of self-assembled bubbles that do not eventually collapse.

We report here that the single chain (perfluorooctyl)undecyl phosphate $C_8F_{17}(CH_2)_{11}OP(O)(OH)_2$ (*F8H11Phos*) allows formation of unprecedentedly durable small bubbles. This results from hitherto unexpected film behavior. The size of these bubbles, initially $\sim 4 \mu\text{m}$ in radius, was found to slowly decrease over time until they reach $\sim 1.5 \mu\text{m}$. At this point, contrary to all currently known micron-size bubbles, their radius levels off. These microbubbles do not collapse, but continue to exist without detectable variation of their size for hours, days and even weeks. The bubbles were characterized and monitored over time using three independent methods: optical microscopy (OM), static light scattering (SLS), and a dedicated acoustical attenuation method (AAM) that led to concurring results.

Under the action of Laplace pressure, which increases as the reverse of their radius, bubbles normally dissolve in the surrounding aqueous media all the more rapidly that they are smaller. Naked gas bubbles smaller than $10 \mu\text{m}$ persist only for a few seconds in an aqueous environment.^[9] Enclosing gas bubbles within a phospholipid shell increases bubble persistence by at least one order of magnitude, provided the aqueous phase is saturated with the internal gas.^[7] Micron-size phospholipid-coated bubbles with half-lives sufficiently long for practical diagnostic ultrasound examination can be obtained when a perfluorocarbon (*FC*) is used as filling gas.^[1,6,10-13] *FCs* retard indeed bubble dissolution very effectively due to their very low water solubility.^[14] The half-life of the commercially available, *FC*-stabilized soft-shell bubbles is nevertheless limited to a few minutes.

The collapse of microbubbles requires further investigation. When phospholipids are used as bubble shell components, they are usually expelled from the bubble's surface via shedding

mechanisms,^[8] and a critical collapse radius is attained within minutes. Recently, we have shown that narrow-size populations of small bubbles stabilized with dimyristoylphosphatidylcholine can last much longer (~1.7 h), owing to a stabilizing co-surfactant effect of perfluorocarbons with regards to the phospholipids.^[11,12,14] Other attempts have been made in order to obtain stable bubbles using carboxylic acids^[15] and Span/Tween mixtures.^[16] However, the bubbles were large (tens of μm), and insufficiently stable, still lasting only a few min.

Microbubbles stabilized by perfluorohexane have now been prepared from *F8H11Phos* and, for comparison, from (perfluorooctyl)ethyl phosphate *F8H2Phos*. For optical microscopy monitoring, the bubbles were adsorbed at the surface of a glass cover slip. Immediately after preparation, *F8H11Phos*-based microbubbles consist of a monomodal population of bubbles with an average radius of ~3.6 μm (Fig. 1).

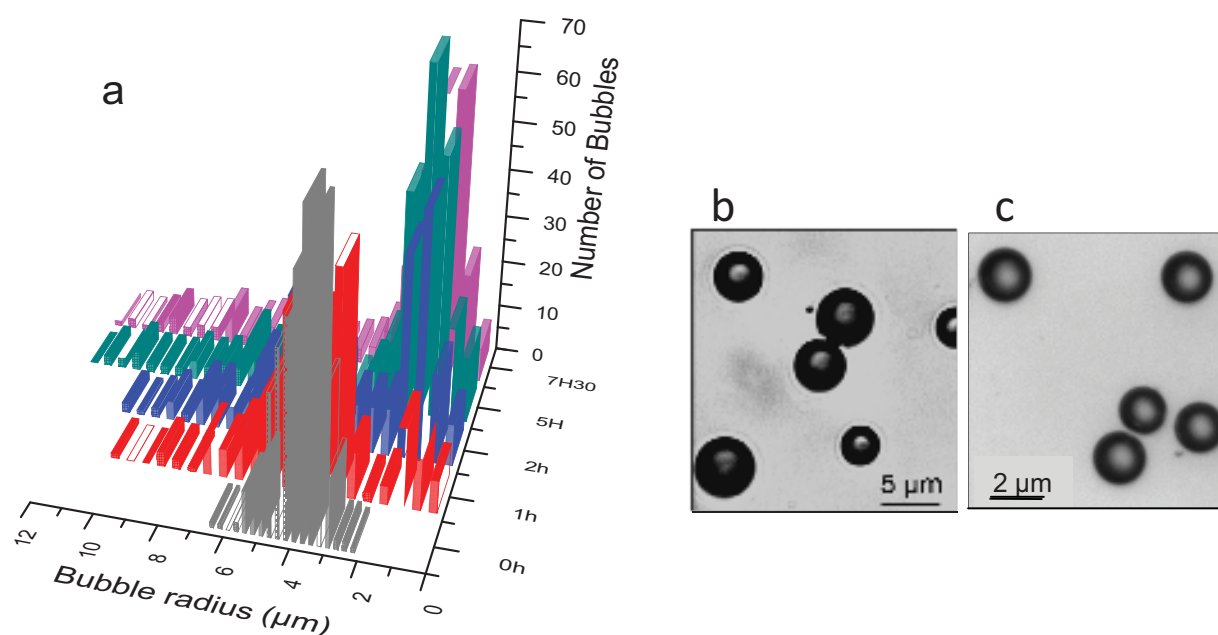


Figure 1. a) Size distribution of *F8H11Phos*-based bubbles at several time points, as determined by optical microscopy. Optical micrographs of the microbubbles b) immediately after preparation, and c) after 5 h.

Monitoring of these bubbles (Fig. 1) shows that their mean radius actually *decreases* over time. This decrease does not occur in a monotonous way. After ~1h, the bubble population becomes bimodal, with a new population peak of smaller bubbles emerging at ~1.5 μm . The larger bubble population progressively decreases to the advantage of the smaller bubbles. After 5 h, only the small-size bubble population remains detectable. Subsequent monitoring for up to two weeks detected no change in radius of these smaller bubbles.

The radius of the bubble decreases progressively over time, until it reaches $\sim 1.25 \mu\text{m}$ (Fig. 2). At this point it levels off and remains—essentially unchanged. Another remarkable observation is that these bubbles, which had been essentially immobile until this critical radius was reached, start moving around very fast (Supporting Information, see video). No evidence for collapse was seen with this method for these small, fast moving microbubbles, even after an observation period of two weeks.

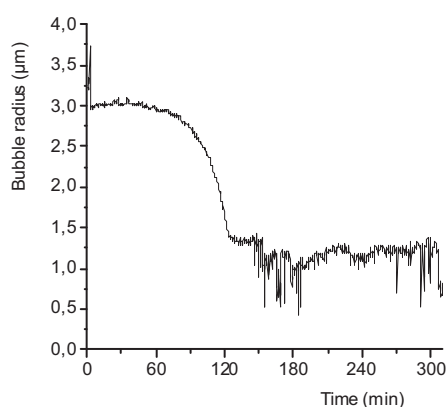


Figure 2. Variation of the radius of F8H11Phos-coated bubbles as a function of time, as determined from optical microscopy. After reaching the critical value of $\sim 1.25 \mu\text{m}$, the bubbles remain stable with unchanged radius for hours. No evidence for collapse was found (20 bubbles monitored over 5 h). The strong fluctuations that appear after the bubble radius has stabilized at $\sim 1.25 \mu\text{m}$ are due to the fact that the bubbles start moving much faster once they have reached this critical radius.

The stability of microbubbles adsorbed on a surface (here on a glass slide) is generally higher than that of bubbles dispersed in an aqueous medium, in particular because the diffusion of the internal gases is hindered. We have also studied the F8H11Phos bubbles in aqueous dispersions using static light scattering (Fig. 3a).

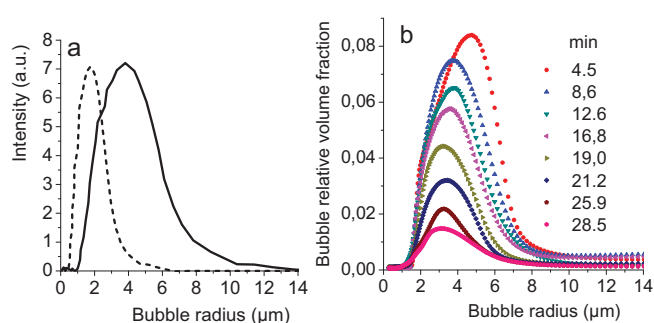


Figure 3. a) Static light scattering analysis of microbubbles stabilized by F8H11Phos immediately after preparation (solid line), and after 6 h (dashed line); b) size and stability characteristics of microbubbles stabilized by F8H11Phos, as determined by the acoustical attenuation method.

Aliquots of bubbles for SLS analysis were sampled from a stem dispersion that was maintained under stirring at room temperature. The population of F8H11Phos bubbles, when

measured immediately after preparation, is centred at $\sim 3.8 \mu\text{m}$. After 6 h at room temperature it is shifted down to $\sim 1.7 \mu\text{m}$, in good agreement with the results obtained by OM. It is also noteworthy that the bubble size distribution gets narrower over time.

This unexpected decrease in size is supported by the acoustical sizing method (Fig. 3b).^[11] The initial microbubble radii ($\sim 4.6 \mu\text{m}$) is in close agreement with those measured by both SLS and OM. The time-dependant deflation, was also consistent with the SLS and OM observations.

These results were compared with those obtained with *F8H2Phos*, a shorter perfluoroalkylated phosphate, for which the bubbles display a more usual behavior. Depending on their initial size and history, bubbles tend to grow, while others tend to shrink and eventually collapse. When observed by OM, the *F8H2Phos*-based bubbles have approximately the same initial mean radius characteristics ($\sim 4.7 \mu\text{m}$) than those obtained with *F8H11Phos*. Figure 4 shows that most of the *F8H2Phos* bubbles progressively increase in size, reaching a mean radius of $\sim 16 \mu\text{m}$ after 8 h, and their polydispersity increases as well.

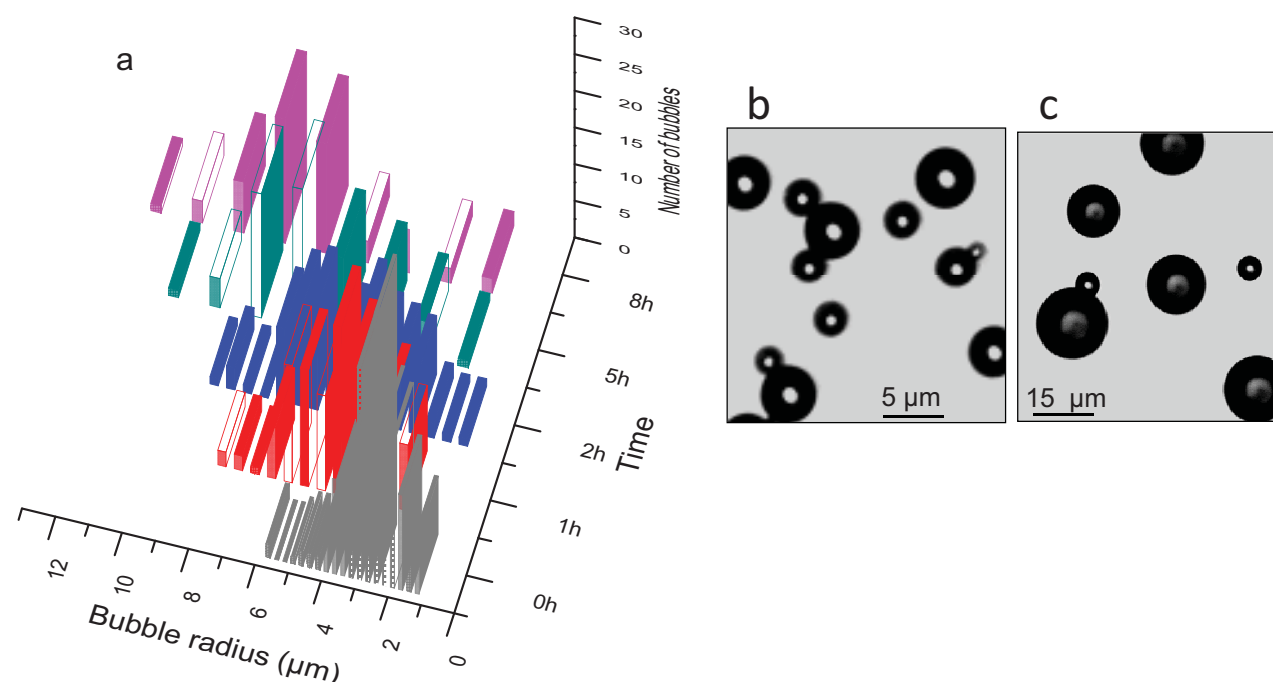


Figure 4. a) Size distribution of *F8H2Phos*-based bubbles, as determined at several time points by optical microscopy. Optical micrographs b) immediately after preparation, and c) after 5 h.

The smaller bubbles ($< 3\text{-}4 \mu\text{m}$) are not seen on Figure 1 because they deflate and collapse within ~ 30 min. The *F8H2Phos* bubbles display the usual behavior with a collapse that was

determined to occur at $\sim 1.6 \mu\text{m}$ in ~ 30 min. The same critical radius value has been reported for bubbles made from various phospholipids.^[8] Figure 5 shows that all of the 35 bubbles selected for analysis collapse at a critical radius of $\sim 1.25 \mu\text{m}$. This critical value is notably independent of the initial bubble size (from ~ 3 to $5 \mu\text{m}$).

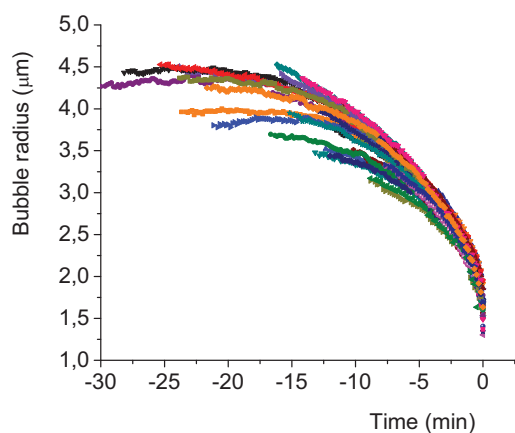


Figure 5. Collapse of bubbles made from F8H2Phos. Variation of bubble radius as a function of time (35 bubbles). t_0 is taken when the collapse event occurs.

The stability over time of F8H2Phos-based microbubbles dispersed in water was also studied using AAM and SLS (Fig. 6). The initial microbubble radii ($\sim 4.1 \mu\text{m}$ for AAM and $4.0 \mu\text{m}$ for SLS) are in agreement with those measured by OM. The growth of the bubble size, which attains $\sim 16 \mu\text{m}$ in ~ 30 min, as measured by AAM after 30 min, and $\sim 18 \mu\text{m}$, as measured by DLS after 2 h, is more rapid than when the bubbles are on a substrate, as during the OM observations. The smaller bubbles are not seen by AAM and SLS because both methods are more sensitive to large than to small particles.

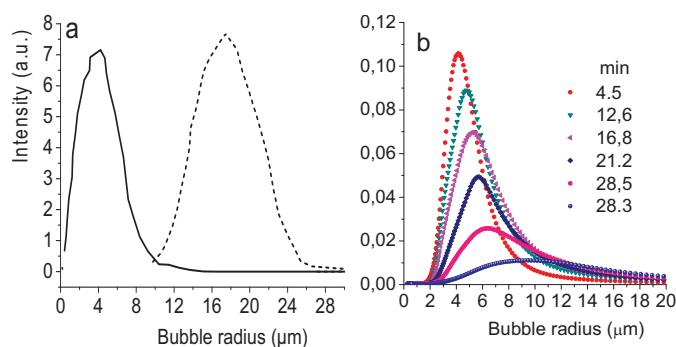


Figure 6. Size and stability characteristics of microbubbles stabilized by F8H2Phos, as determined by a) SLS (solid: immediately after preparation, dash: after 2 h) and b) AAM at several time points.

We have found that the two perfluoroalkylated phosphates investigated display drastically different behavior. While the *F8H2Phos*-coated microbubbles display the usual degradation processes, those based on *F8H11Phos* present a hitherto unknown behavior: they do not collapse.

The question is what happens in the *F8H11Phos* film that prevents microbubble growth and provides such exceptional stability. To get further insight on this point we have investigated the Langmuir monolayer behavior of *F8H11Phos* and compared it to that of *F8H2Phos*. The former forms a highly stable condensed monolayer ($A_{\text{ext}} \sim 35 \text{ \AA}$, $\pi_{\text{coll}} \sim 63 \text{ mN m}^{-1}$, $C_s^{-1} \sim 130 \text{ mN m}^{-1}$) (Fig. S1 Supporting Information). The monolayer's high collapse pressure, which results in a low interfacial tension, certainly contributes to bubble stability. Moreover, the hysteresis seen upon compression/expansion cycles is small, reflecting high viscoelasticity. By comparison, compression of *F8H2Phos* yields multilayers ($A_{\text{ext}} \sim 20 \text{ \AA}^2$) with a significantly lower collapse pressure (by $\sim 10 \text{ mN m}^{-1}$), and the film is not stable when submitted to compression/expansion cycles. We also measured the dynamic adsorption profile of *F8H11Phos* at the air/water interface using bubble profile analysis tensiometry. The study revealed that this profile is not monotonous but consistently presents a sudden drop in interfacial tension after a concentration-dependant time period.

It appears that the film of *F8H11Phos* reaches a state of higher molecular ordering at the bubble's surface that allows the interfacial tension to be sufficiently lowered to counterbalance the Laplace pressure. In support to this hypothesis is the fact that the interfacial tension is reduced to a twice lower value for *F8H11Phos*, as compared to *F8H2Phos*. In addition, the dynamic adsorption profile of *F8H11Phos* at the air/water interface (Fig. S2 Supporting Information) features a salient event, after which the interfacial tension diminishes more abruptly, likely reflecting a transition towards a much higher, liquid condensed-type organization of the film. Finally, the fact that the long-lasting small bubbles made with *F8H11Phos* display accelerated Brownian motion indicates lesser resilience, as expected when the bubble shell is more rigid.

- [1] E. S. Schutt, D. H. Klein, R. M. Mattrey, J. G. Riess, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3218.
- [2] J. G. Riess, *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* **2003**, *8*, 259.
- [3] S. Hernot, A. L. Klibanov, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1153.
- [4] K. W. Ferrara, M. A. Borden, H. Zhang, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 881.
- [5] J. I. Park, D. Jagadeesan, R. Williams, W. Oakden, S. Chung, G. J. Stanisz, E. Kumacheva, *ACS Nano* **2010**, *4*, 6579.
- [6] A. Kabalnov, J. Bradley, S. Flaim, D. Klein, T. Pelura, B. Peters, S. Otto, J. Reynolds, E. Schutt, J. Weers, *Ultrasound Med. Biol.* **1998**, *24*, 751.
- [7] P. B. Duncan, D. Needham, *Langmuir* **2004**, *20*, 2567.
- [8] G. Pu, M. A. Borden, M. L. Longo, *Langmuir* **2006**, *22*, 2993.
- [9] T. G. Leighton, *The Acoustic Bubble*, Academic Press, San Diego, **1994**.
- [10] F. Gerber, M. P. Krafft, G. Waton, T. F. Vandamme, *New J. Chem.* **2006**, *30*, 524.
- [11] S. Rossi, G. Waton, M. P. Krafft, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 1982.
- [12] S. Rossi, G. Waton, M. P. Krafft, *Langmuir* **2010**, *26*, 1649.
- [13] S. Rossi, C. Szijjártó, F. Gerber, G. Waton, M. P. Krafft, *J. Fluorine Chem.* **2011**, *132*, 1102.
- [14] C. Szijjarto, S. Rossi, G. Waton, M. P. Krafft, *Langmuir* **2012**, *28*, 1182.
- [15] K. Soetanto, M. Chan, *Ultrasonics* **2000**, *38*, 969.
- [16] M. A. Wheatley, F. Forsberg, N. Dube, M. Patel, B. E. Oeffinger, *Ultrasound Med. Biol.* **2006**, *32*, 83.
- [17] N. O. Brace, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 3033.
- [18] W. S. Rasband, *National Institute of Health, Bethesda, MD, U.S.*
<http://rsb.info.nih.gov/ij/>. **1997-2005**.
-

Supporting information

Self-Assembled Microbubbles That Do Not Collapse

Gergana Nikolova, Phuc Nghia Nguyen, Prasad Polavarapu, Gilles Waton, Marie Pierre Krafft*

SOFFT Team

Institut Charles Sadron (UPR CNRS 22)

23 rue du Loess. 67034 Strasbourg Cedex (France)

Fax: (+33) 3 41 40 99

E-mail: krafft@unistra.fr

Homepage: <http://www-ics.u-strasbg.fr>

Supporting information

Experimental Section

Materials

Perfluorooctyl iodide ($C_8F_{17}I$) and (perfluorooctyl)ethanol ($C_8F_{17}C_2H_4OH$) were provided by Atochem. $C_8F_{17}C_{11}H_{22}OH$ was prepared according to the literature.^[17] perfluorohexane (purity >99%) and Pluronic F68 (a polyoxyethylene-polyoxypropylene triblock copolymer, $MW \sim 8300$, purity >99%) were from Sigma-Aldrich (Lyon, France). A HEPES buffer solution (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, from Sigma) (20 mmol L^{-1}) in a $150 \text{ mmol L}^{-1}NaCl$ solution was prepared, and its pH was adjusted to 7.0 with 1 N NaOH. Water was purified using a Millipore system (surface tension: 72.1 mN m^{-1} at 20°C , resistivity: $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). The surface tension of the HEPES buffer was $70.0 \pm 0.2 \text{ mN m}^{-1}$ at 25°C .

Synthesis of (Perfluoroalkyl)alkyl Phosphates

General experimental details: All the reactions were performed in a dry argon atmosphere. 1H , ^{13}C and ^{31}P NMR (H_3PO_4 as external standard) spectra were recorded on a Bruker AM 400 MHz spectrometer. Chemical shifts are reported as δ values relative to internal CD_3OD ($\delta 3.31$ for 1H NMR and 49.0 for ^{13}C NMR). ^{19}F NMR spectra were recorded on a Bruker AM 300 MHz spectrometer ($CFCl_3$ as internal reference). Mass spectra were obtained with a Bruker AutoflexMALDI-TOF mass spectrometer.

F8H11Phos: A stirred solution of 130 mg (78 μL , 0.85 mmol, 2.5 eq) of phosphoryl chloride in 1 mL dry diethyl ether was cooled to 0°C in an ice bath under argon. To this, 200 mg (0.34 mmol) of *F8H11OH* in 4 mL diethyl ether were added dropwise over one hour at 0°C and stirring was continued at room temperature for 1 day, after which 0.5 mL of water was added and stirred over 16 h to hydrolyze the phosphorus dichloride. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (3 times) and the combined ether phases were extracted with a 5% $NaHCO_3$ solution (3 times). The pH of the aqueous phase was adjusted to around 1 with diluted HCl and extracted with ethyl acetate (3 times). The combined organic phase was washed with water, dried over $MgSO_4$ and the solvent evaporated to yield 190 mg (84%) of *F8H11Phos* as a white solid. 1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 1.33-1.43 (m, 14H), 1.55-1.75 (m, 4H), 2.15 (m, 2H), 3.96 (dt, $J=6.8, 6.6 \text{ Hz}$, 2H). ^{13}C NMR (CD_3OD , 100

MHz) δ (ppm): 21.3 (t, $J=3.7$ Hz), 26.7, 30.1, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.7, 31.5 (d, $J=7.5$ Hz), 31.7 (t, $J=22$ Hz), 67.8 (d, $J=5.7$ Hz), 107-125 (m). ^{19}F NMR (CD_3OD , 282 MHz) δ (ppm): -82.4 (t, $J=10.1$ Hz, 3F), -115.4 (m, 2F), -122.9 (m, 6F), -123.7 (m, 2F), -124.5 (m, 2F), -127.3 (m, 2F). ^{31}P NMR (CD_3OD , 162 MHz) δ : 0.9 ppm. MS (MALDI-TOF): $m/z=693.1$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Anal. Calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{F}_{17}\text{O}_4\text{P}$: C, 34.04; H, 3.61. Found C, 34.4; H, 3.82.

F8H2Phos: Synthesized according to the above procedure using 2 g (4.31 mmol) of *F8H2OH*, 1.652 g (986 μL , 10.77 mmol, 2.5 eq) of phosphoryl chloride and 5 mL of water. Phosphorylation needs over 2 days for maximum conversion of *F8H2OH*. For the extraction with base, a 3% NaOH solution was used instead of the 5% NaHCO_3 solution. 1.91 g (81%) of *F8H2Phos* were obtained as a white solid. ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 2.62 (m, 2H), 4.27 (dt, $J=7.6, 6.6$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ (ppm): 33.1 (m), 59.6 (m), 107-125 (m). ^{19}F NMR (CD_3OD , 282 MHz) δ (ppm): -82.4 (t, $J=10.2$ Hz, 3F), -114.7 (m, 2F), -122.7 (m, 2F), -122.9 (m, 4F), -123.7 (m, 2F), -124.7 (m, 2F), -127.3 (m, 2F). ^{31}P NMR (CD_3OD , 162 MHz) δ : 0.4 ppm. MS (MALDI-TOF): $m/z=566.9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Anal. Calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{F}_{17}\text{O}_4\text{P}$: C, 22.07; H, 1.11. Found C, 22.09; H, 1.25.

Preparation of Bubble Dispersions

F_nH_mPhos (5 or 10 mmol L⁻¹) was dispersed by magnetic stirring in the HEPES/NaCl buffer solution for one night at room temperature. Pluronic F68 was added in order to facilitate dispersion (*F_nH_mPhos*:F68 molar ratio 10:1). A 1 mL aliquot of the *F_nH_mPhos*/F68 dispersion was transferred to a glass tube (inner diameter 18 mm, length 63 mm) and pre-sonicated under air at low power (setting 2) for 15 s at 25°C. The sonicator (Vibracell, Bioblock Scientific, Illkirch, France) was equipped with a 3 mm titanium probe and operated at 20 kHz with an output power of ~600 W (duty cycle 40%). The *F_nH_mPhos*/F68 dispersion was then sonicated for 30 s (setting 2, ~200 W) at 25°C under a N₂ atmosphere saturated with perfluorohexane. N₂ was allowed to bubble through three successive vials containing perfluorohexane prior to being flushed into the *F8H11Phos*-containing glass tube. The sonicator probe was consistently placed 5 mm below the surface of the dispersion. The resulting aggregated microbubble suspension (foam) was immediately diluted with 14 mL of buffer. Size fractionation was achieved by floatation under gravity (30 min). Aliquots (1 or 2 mL, in order to keep the initial values of the attenuation coefficient comparable) were consistently sampled at a depth

of 55 mm from the edge of the glass vial. They were injected into the buffer-filled ultrasonic measuring cell (cell volume: 140 mL) and thermoregulated at 25°C.

Optical Microscopy

The samples were observed by optical microscopy (Olympus BH2, Tokyo, Japan). Three to four droplets of bubble dispersion were placed into a concave slide and covered with a glass slide. Rapid image acquisition was achieved using a Lumenera Infinity 2 CCD camera (Lumenera, Ottawa, Canada). Bubble radii were measured using the ImageJ software on 5 to 10 slides.^[18]

Static Light Scattering

Static light scattering measurements were performed with a Coulter LS100 instrument (Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL) operating at 25°C. The Fraunhofer's theory was used to analyze the diffraction pattern. In order to obtain acceptable obscuration values, 150 μL of the bubble dispersions prepared from the 10 mM-concentrated *F_nH_mPhos* dispersions were injected in a 10 mL cell containing HEPES buffer. The samples were kept under mechanical agitation during the measurements (5 repeats).

Acoustical Determination of Microbubble Size Distribution

This sizing method is based on the attenuation of an acoustical pulse that propagates through the aqueous bubble dispersion. Standard simple-harmonic resonator curves are fitted to measured attenuations in order to infer the size of the bubbles.^[9] A low-power emitter was used that avoids altering bubble characteristics and stability. For experimental details see ref^[12].

Langmuir Monolayers

The surface tension (π) versus molecular area (A) isotherms were recorded on a Langmuir minitrough (KSV Nima, Espoo, Finland) equipped with two movable barriers (initial area: 204 x 60 mm, speed: 7.3 mm² s⁻¹, which corresponds to a reduction of the total area of ~4% min⁻¹). The surface pressure was measured using the Wilhelmy plate (paper) method. 50 to 150 μL of solutions of *F8H11Phos*, or *F8H2Phos*, in THF (0.8 mg mL⁻¹) were spread on the surface of the HEPES/NaCl buffer solution (pH 7.0) at 20°C. Compression rates varied from 5 to 15 cm² min⁻¹.

Bubble Profile Analysis Tensiometry

The shape of a gas bubble in a liquid depends on buoyancy and on surface tension. Axisymmetric bubble shape analysis was applied to a rising bubble of the gas phase formed in the *F8H11Phos* dispersion. Time dependence of the interfacial tension was measured during adsorption of the perfluoroalkylated phosphate at the gas/liquid interface using a Tracker® tensiometer (Teclis, Longessaigne, France). A lid fitted on the measuring glass cell (10 mL) prevented evaporation of water during the long equilibration times. The bubble (5 μL) was formed at a stainless steel capillary with a tip diameter of 1 mm. It was carefully determined that the systems were at equilibrium at the end of the experiments.

Figures S1 and S2

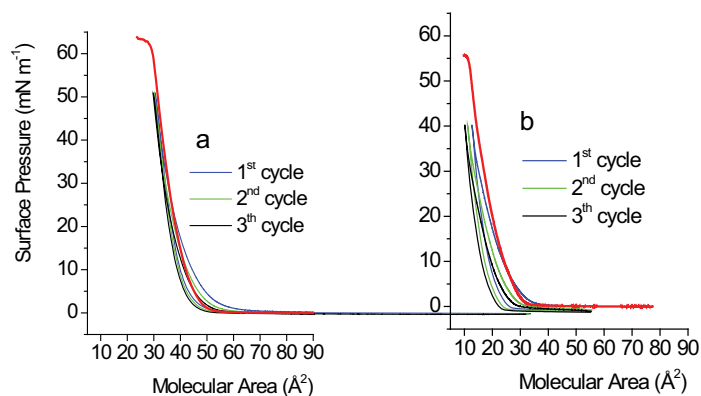


Figure S1. Compression isotherm at 25°C of a) *F8H11Phos* and b) *F8H2Phos* spread at the air/water interface as Langmuir monolayers. Three compression/expansion cycles were performed for each compound.

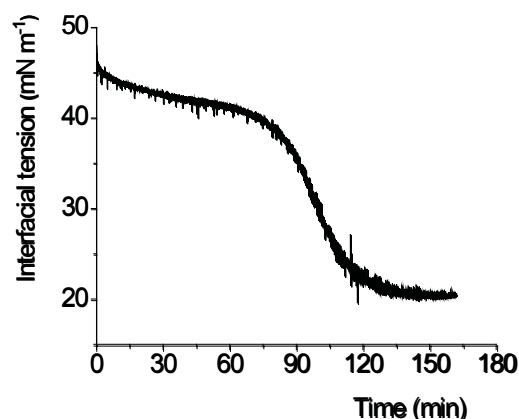


Figure S2. Kinetics of adsorption at 25°C of *F8H11Phos* (5 mol L^{-1}) at the air/water interface, as measured by bubble profile analysis tensiometry.

IV.2. Microbulles stabilisées par des nanoparticules magnétiques

Un vif intérêt est actuellement apporté aux microcapsules incorporant des nanoparticules dans leur paroi en raison de leur potentiel d'applications émergentes en biologie, en médecine et en science des matériaux. De telles microcapsules ont un fort potentiel comme agents de contraste bimodaux pour l'échographie et la résonance magnétique, ainsi que pour des applications de délivrance de médicaments et de matériels génétiques. Les parois des microcapsules actuellement développées sont généralement composées de polymères. Des liposphères ont aussi été développées pour leur potentiel médical. Il s'agit de sphères de gaz entourées d'une couche d'huile contenant les nanoparticules, et stabilisées par une monocouche de phospholipides. Les microcapsules et les liposphères présentent beaucoup d'avantages, cependant elles sont moins « échogènes » que de simples microbulles gazeuses, la réflexion de l'onde ultrasonore étant amortie dans un cas par le matériau polymère et dans l'autre cas par la couche d'huile. Nous avons utilisé notre capacité à préparer des microbulles extrêmement stables grâce aux phosphates perfluoroalkylés (Chap. IV.1) pour décorer leur surface externe par des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer. Nous avons élaboré et caractérisé des microbulles de tailles contrôlées ($r \sim 6 \mu\text{m}$ et $0.8 \mu\text{m}$) à l'aide du phosphate perfluoroalkylé $\text{C}_8\text{F}_{17}(\text{CH}_2)_{11}\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$. Les bulles magnétiques submicroniques perdurent plusieurs heures sans modification significative de leur taille, comme le confirment la mesure acoustique, la diffusion statique de la lumière et la microscopie optique. Les microbulles magnétiques conservent une échogénéicité comparable à celles des bulles dépourvues de particules et caractéristique des bulles à paroi souple de tensioactifs. Enfin, les bulles magnétiques s'alignent dans la direction d'un champ magnétique. Les alignements s'orientent rapidement en fonction de la direction du champ.

Ces résultats sont rassemblés dans la publication intitulée « Compressible multi-scale magnetic constructs : Decorating the outer surface of self-assembled microbubbles with iron oxide nanoparticles », parue dans *RSC Advances* en 2013.

COMMUNICATION

Compressible multi-scale magnetic constructs: decorating the outer surface of self-assembled microbubbles with iron oxide nanoparticles†

Cite this: *RSC Advances*, 2013, 3, 7743

Received 21st February 2013,

Accepted 2nd April 2013

DOI: 10.1039/c3ra40908b

www.rsc.org/advances

Phuc Nghia Nguyen,^a Gergana Nikolova,^a Prasad Polavarapu,^a Gilles Waton,^a Lai Truong Phuoc,^b Geneviève Pourroy^b and Marie Pierre Krafft^{*a}

This paper reports the elaboration of size-controlled resilient echogenic micron-size bubbles that have a soft shell made from self-assembled perfluoroalkylated phosphates and iron oxide nanoparticles grafted on their external surface. The high echogenicity, characteristic of compressible gas bubbles, is retained. These hybrid constructs have potential as bimodal contrast agents for ultrasound and magnetic resonance imaging.

Attention has recently been focused on functionalized microcapsules embedding nanoparticles or quantum dots in their shells for emerging applications in the biological, medical and materials sciences. When magnetic nanoparticles are present, such microcapsules have potential as bimodal contrast agents for echosonography and magnetic resonance imaging, and for targeted drug delivery.^{1–6} The shells of the presently available microcapsules are generally made of rigid polymeric materials. The magnetic nanoparticles are embedded in these shells (Scheme 1a). Softer vehicles, called lipospheres,⁷ have been developed for gene and drug delivery enhancement.^{8–11} The common representation of lipospheres is that of gas-filled spheres surrounded by a layer of viscous, hydrophobic liquid oil (up to 30% v/v) that contains the nanoparticle cargo and is enclosed within a self-assembled phospholipid film (Scheme 1b).¹²

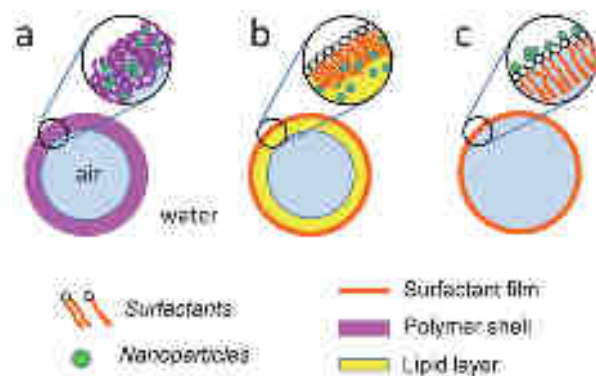
Both microcapsules and gaseous–liquid lipospheres have advantages and limitations. In both cases, their shells can be adapted so as to enhance stability, circulation persistence, drug loading and release, targeting of and fusion with cell membranes. The former constructs are generally more stable, but less echogenic than the latter. Lipospheres were reported to be less stable to acoustical pressure and less echogenic than “true” gas microbubbles, due to the dampening effect of the constitutive oil

phase.⁷ Other limitations of lipospheres include sphere-to-sphere gas content inhomogeneities, and the simultaneous presence of external magnetic micelles.¹³

We now report that the single-chain (perfluoroalkyl)alkyl phosphate $C_8F_{17}(CH_2)_{11}OP(O)(OH)_2$ (*F8H11Phos*) allows formation of micron and sub-micron size bubbles enclosed within a highly flexible self-assembled film on which iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4 NPs) can be grafted (Scheme 1c). Control of the bubble size (e.g. radius $r \sim 6 \mu m$ or $\sim 0.8 \mu m$) was achieved. The smaller nanoparticle-decorated microbubbles (NP-decoMBs) display high stability, persisting for several hours in an aqueous suspension without size modification.

For many of the targeted applications, “true” gaseous microbubbles (MBs) enclosed within a thin, highly flexible fluid film are preferable as they allow generation of a stronger ultrasound response. Such a flexible film can be obtained using self-assembled small surfactant molecules. To our knowledge, only one example of lipid-shelled MBs decorated with latex nanobeads has been reported, but the nanobeads were not magnetic.^{14,15}

In order to maximize the resonance under the ultrasound wave fields commonly used by medical echographs (1–10 MHz), while



Scheme 1 Schematic representation of (a) microcapsules with nanoparticles embedded in a polymer shell; (b) lipospheres with nanoparticles dispersed in an internal lipid layer; and (c) microbubbles with nanoparticles grafted on their surface. Not to scale.

^aSystèmes Organisés Fluorés à Finalités Thérapeutiques (SOFFT) Institut Charles Sadron (ICS) CNRS-Université de Strasbourg (UPR 22), 23 rue du Loess, BP 84047, 67034 Strasbourg Cedex 2, France. E-mail: krafft@unistra.fr

^bInstitut de Physique et de Chimie des Matériaux de Strasbourg (IPCMS) CNRS-Université de Strasbourg (UMR 7504), 23 rue du Loess, BP 43, 67034 Strasbourg Cedex 2, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Preparation and characterization of nanoparticle-decorated microbubbles. See DOI: 10.1039/c3ra40908b

preserving their ability to cross capillary beds, the MBs should have a preferred diameter of 1–7 μm and a narrow size distribution.¹⁶ Ensuring the MBs' stability is another major goal. The MBs were characterized by static light scattering (SLS), optical microscopy (OM), and a dedicated acoustical attenuation measurement method (AAM)^{17,18} that led to concurring results.

Fe_3O_4 NPs were synthesized by co-precipitation of Fe(II) and Fe(III) ions in alkaline solution.¹⁹ The average diameter of the magnetite core is 10 ± 2 nm (transmission electron microscopy (TEM), Supporting Information Fig. S1, ESI†). When Fe_3O_4 NPs are dispersed in the HEPES–NaCl buffer (pH 7), irreversible NP aggregation occurs owing to magnetic attraction and to the absence of NP protection. Dynamic light scattering (DLS) demonstrated that the clusters have a mean diameter of 170 ± 20 nm (Supporting Information, Fig. S2, ESI†). The aggregates' size distribution is narrow and the dispersions remain stable for several hours at room temperature.

NP-decoMBs were prepared in one step by submitting a co-dispersion of *F8H11Phos* and Fe_3O_4 NPs in a HEPES–NaCl buffer to sonication under an atmosphere of perfluorohexane, C_6F_{14} . As part of our wall component selection efforts, we had found that (perfluoroalkyl)alkyl phosphates, $\text{C}_n\text{F}_{2n+1}(\text{CH}_2)_m\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$, can form differently sized, stable MBs. The phosphate head group was chosen because phosphate ions readily bind to magnetite nanoparticles *via* the formation of a binuclear Fe^{3+} complex that involves two of the oxygen atoms of the phosphate ion.²⁰ Dendrons have also been grafted on Fe_3O_4 NPs *via* phosphate groups.²¹ The perfluoroalkyl chain was expected to enhance the stability of the surfactant membrane.^{22,23} When used as filling gases, perfluorocarbons retard the bubble dissolution very effectively, due to their very low water solubility.^{16–18,24,25} Perfluorohexane was selected as the most suitable candidate based on previous investigations.²⁶

Both large ($r \sim 6$ μm) and small ($r \sim 0.8$ μm) NP-decoMB populations were prepared. A series of the larger ones was obtained using a short sonication time (15 s). Just after preparation, their mean radius, as determined by AAM from the attenuation spectra, was ~ 5.7 μm (Fig. 1a). The bubbles' size grew

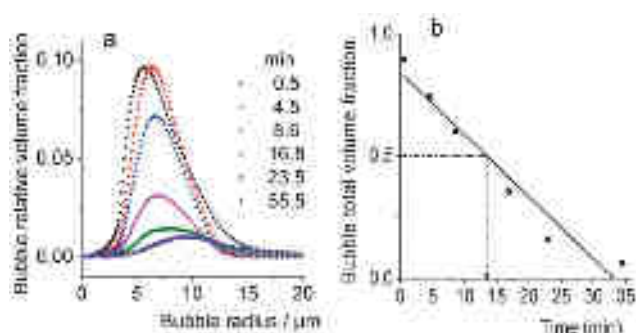


Fig. 1 (a) Size distributions at various time points of *F8H11Phos*-stabilized microbubbles decorated with Fe_3O_4 nanoparticles, as determined by the acoustical attenuation method. The bubbles (average radius 5.7 μm) were obtained from *F8H11Phos* dispersions in HEPES buffer (pH 7), sonicated for 15 s; (b) time evolution of the volume fraction of the nanoparticle-decorated bubbles, indicating a half-life of ~ 14 min.

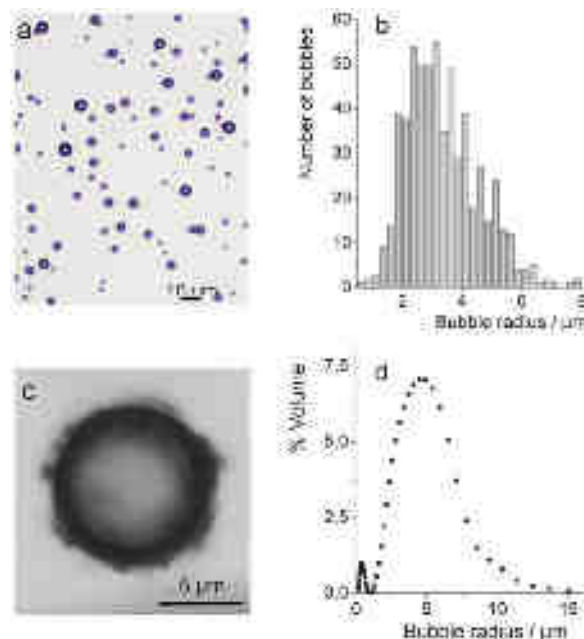


Fig. 2 (a) Optical micrograph of bubbles decorated with Fe_3O_4 nanoparticles immediately after preparation; (b) corresponding bubble size histogram; (c) magnification providing direct evidence of nanoparticles on the bubble's surface; (d) size distribution of the decorated bubbles immediately after preparation, as measured by SLS.

slightly with time to reach ~ 6.8 μm after 1 h, after which the attenuation coefficient was essentially null. The variation of the acoustically determined bubble volume fraction as a function of time (Fig. 1b) indicated a half-life ($\sigma_{1/2}$) of ~ 14 min.

The NP-decoMBs' size was corroborated by optical microscopy (Fig. 2a,b, $r \sim 4$ μm). The bright core of the objects establishes that they are MBs, and not NP aggregates. These large MBs provide a convenient scale for direct visualization of NP aggregates at their periphery by optical microscopy (Fig. 2c). SLS further confirmed the presence of a largely dominant population of MBs with a mean radius of ~ 4.8 μm (Fig. 2d), but detected also a small amount of smaller MBs (~ 0.5 μm) that cannot be detected by OM. The slightly higher mean radius value measured by SLS is likely due to the fact that the particles are counted in volume, while in the OM analysis they are counted in number.

For comparison, bare MBs were prepared under the same conditions, but without NPs. Their initial size and half-life were comparable to those of the NP-decoMBs (~ 4.7 μm ; $\sigma_{1/2} \sim 18$ min; Supporting Information, Fig. S3, ESI†), as assessed by AAM. This indicates that the NPs did not perturb the self-assembly of the surfactant. It also demonstrates that the MBs remain as echogenic, and hence, as flexible as in the absence of NPs.

The fact that the NPs do not influence the MBs' size, size distribution and stability indicates that bubbles with a thin self-assembled film of *F8H11Phos* form first, and that the NPs are grafted subsequently onto the MBs.

In order to control and, in particular, to reduce the size of the MBs, which is mandatory for certain applications, we investigated the effects of sonication time on the MBs' size. Increasing the

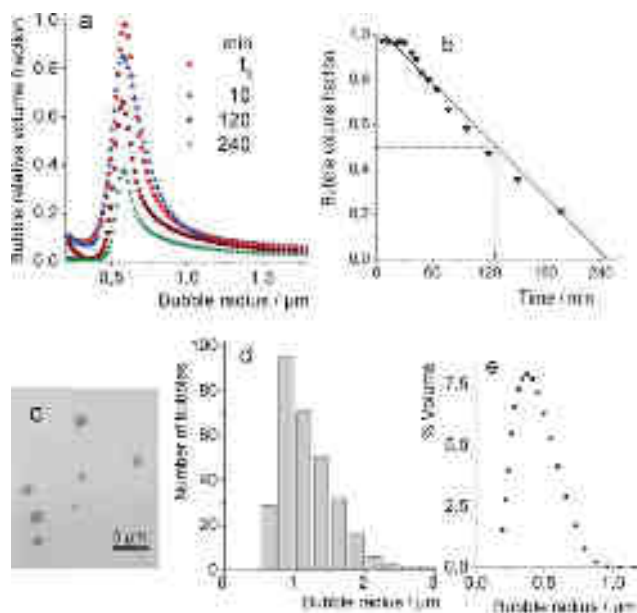


Fig. 3 (a) Size distributions at various time points of small Fe_3O_4 NP-decorated microbubbles, as determined by the acoustical attenuation method. The bubbles were obtained from *F8H11Phos* and Fe_3O_4 NP dispersions in HEPES buffer, sonicated for 2 min; (b) time evolution of the volume fraction of these decorated bubbles, indicating a half-life of ~ 130 min; (c) optical micrograph of the smaller Fe_3O_4 NP-decorated MBs. Size distribution histograms as assessed immediately after preparation by (d) optical microscopy (in number), and (e) SLS (in volume).

sonication time from 15 s to 2 min allowed the preparation of much smaller MBs ($r \leq 1 \mu\text{m}$) with narrower MB size distributions (Fig. 3a,c).

The submicron-size of the new NP-decoMBs was confirmed by both OM and SLS (Fig. 3d,e). Here again, the typical optical pattern shows the bright central core of the MBs, and not the opaque black dots that would originate from NP aggregates. These small NP-decoMBs are much more stable than the above-described larger MBs, as shown by AAM monitoring (Fig. 3a), with a half-life of ~ 130 min, as compared to ~ 14 min for the larger ones. Stability was corroborated by OM, which showed no significant change in radius after 2 h.

We previously reported that small phospholipid-coated MBs could be more stable than larger ones, in spite of increased Laplace pressure, due to the fact that the fluorocarbon gas not only stabilizes microbubbles through an osmotic or internal gas solubility reducing effect,^{16,24} but also exercises a co-surfactant effect with regards to the phospholipid.^{17,26,27} In the present case, the unexpectedly higher stability of the smaller MBs is likely also due, at least in part, to a co-surfactant contribution of perfluorohexane with *F8H11Phos*. The presence of fluorinated chains in both shell and internal phase components likely enhances this contribution.²⁵

Bubbles of less than 1–2 μm in diameter are too small to allow proper OM visualization of the NP aggregates on their surface. Instead, we have submitted them to a magnetic field, which caused them to align as strings in the direction of the field (Supporting Information, Fig. S4b, ESIf). When the magnet is

rotated by 90° , the MB strings also change direction (Fig. S4c, ESIf). This behaviour implies that the MBs bear magnetic particles. It is noteworthy that when the magnetic field is shut down, it takes a long time (tens of min) for the magnetic MBs to recover to random positions.

In summary, the fluorocarbon/hydrocarbon amphiphile *F8H11Phos* self-assembles into perfluorohexane-stabilized microbubbles and, in the presence of Fe_3O_4 nanoparticles, forms Fe_3O_4 NP-covered MBs. Both large (6 μm) and much smaller (0.8 μm) NP-decorated, narrowly-distributed microbubble populations were isolated. The latter and smaller NP-decoMBs are stable and highly echogenic. The high echogenicity, characteristic of MBs coated with a thin self-assembled film of small molecules, is not reduced by the grafting of magnetic nanoparticles, indicating that the desired shell flexibility is preserved. The new magnetic microbubbles spontaneously align in the direction of a magnetic field. To our knowledge, this is the first report of true gas bubbles with a flexible self-assembled shell decorated with magnetic nanoparticles on their surface. Our decorated bubbles resonate in the 1 to 10 MHz frequency range and are thus potentially suitable for the current medical echographs.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Program (FP7 2007–2013) under the grant agreement n° NMP3-SL-2008-214032. The authors also thank the French Research Agency (ANR, Contract n° 2010-BLAN-0816-01) and the University of Strasbourg for support. G.N., P.N.N., P.P. and L.T.P. acknowledge the European Commission for a research fellowship. P.N.N. acknowledges the GIS-Fluor for a travel grant.

References

- 1 F. Yang, Y. Li, Z. Chen, Y. Zhang, J. Wu and N. Gu, *Biomaterials*, 2009, **30**, 3882–3890.
- 2 J. I. Park, D. Jagadeesan, R. Williams, W. Oakden, S. Chung, G. J. Stanisz and E. Kumacheva, *ACS Nano*, 2010, **4**, 6579–6586.
- 3 F. Yang, M. Zhang, W. He, P. Chen, X. Cai, L. Yang, N. Gu and J. Wu, *Small*, 2011, **7**, 902–910.
- 4 Z. Liu, T. Lammers, J. Ehling, S. Fokong, J. Bornemann, F. Kiessling and J. Gätjens, *Biomaterials*, 2011, **32**, 6155–6163.
- 5 H. Ai, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2011, **63**, 772–788.
- 6 T. B. Brismar, D. Grishenkov, B. Gustafsson, J. Haärmark, Å. Barrefelt, S. V. V. N. Kothapalli, S. Margheritelli, L. Oddo, K. Caidahl, H. Hebert and G. Paradossi, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 1390–1399.
- 7 E. C. Unger, T. P. McCreery, R. H. Sweitzer, V. E. Caldwell and Y. Wu, *Invest. Radiol.*, 1998, **33**, 886–892.
- 8 E. Stride, C. Porter, A. G. Prieto and Q. Pankhurst, *Ultrasound Med. Biol.*, 2009, **35**, 861–868.
- 9 D. Vlaskou, P. Pradhan, C. Bergemann, A. L. Klivanov, K. Hensel, G. Schmitz, C. Plank and O. Mykhaylyk, *AIP Conf. Proc.*, 2010, **1311**, 485–494.
- 10 C. Plank, D. Vlaskou, U. Schillinger and O. Mykhaylyk, *Ther. Delivery*, 2011, **2**, 717–726.
- 11 H. Mannell, J. Pircher, F. Folcher, Y. Stampnik, T. Räthel, B. Gleich, C. Plank, O. Mykhaylyk, C. Dahmani, M. Wörnle,

- A. Ribeiro, U. Pohl and F. Krötz, *Nanomed.: Nanotechnol., Biol. Med.*, 2012, **8**, 1309–1318.
- 12 H. Mulvana, R. J. Eckersley, M.-X. Tang, Q. Pankhurst and S. Stride, *Ultrasound Med. Biol.*, 2012, **38**, 864–875.
- 13 H. Mulvana, R. J. Eckersley, R. Browning, J. V. Hajnal, E. Stride, T. Barrack, M. Tang, Q. Pankhurst and D. Wells, *Proceed. IEEE Ultrasonics Symp.*, 2010, art. n°5935952, 670–673.
- 14 A. F. H. Lum, M. A. Borden, P. A. Dayton, D. E. Kruse, S. I. Simon and K. W. Ferrara, *J. Controlled Release*, 2006, **111**, 128–134.
- 15 K. W. Ferrara, M. A. Borden and H. Zhang, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 881–892.
- 16 E. S. Schutt, D. H. Klein, R. M. Mattrey and J. G. Riess, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 3218–3235.
- 17 S. Rossi, G. Waton and M. P. Krafft, *ChemPhysChem*, 2008, **9**, 1982–1985.
- 18 S. Rossi, G. Waton and M. P. Krafft, *Langmuir*, 2010, **26**, 1649–1655.
- 19 T. J. Daou, G. Pourroy, J. M. Grenèche, A. Bertin, D. Felder-Flesch and S. Begin-Colin, *Dalton Trans.*, 2009, 4442.
- 20 T. J. Daou, S. Begin-Colin, J. M. Grenèche, F. Thomas, A. Derory, P. Bernhardt, P. Légaré and G. Pourroy, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 4494–4505.
- 21 B. Basly, D. Felder-Flesch, P. Perriat, C. Billotey, J. Taleb, G. Pourroy and S. Begin-Colin, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 985–987.
- 22 J. G. Riess and M. P. Krafft, *Mater. Res. Soc. Bull.*, 1999, **24**, 42–48.
- 23 M. P. Krafft, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2006, **44**, 4251–4258.
- 24 A. Kabalnov, J. Bradley, S. Flaim, D. Klein, T. Pelura, B. Peters, S. Otto, J. Reynolds, E. Schutt and J. Weers, *Ultrasound Med. Biol.*, 1998, **24**, 751–760.
- 25 F. Gerber, M. P. Krafft, G. Waton and T. F. Vandamme, *New J. Chem.*, 2006, **30**, 524–527.
- 26 C. Szijjarto, S. Rossi, G. Waton and M. P. Krafft, *Langmuir*, 2012, **28**, 1182–1189.
- 27 P. N. Nguyen, T. T. Trinh Dang, G. Waton, T. Vandamme and M. P. Krafft, *ChemPhysChem*, 2011, **12**, 2646–2652.

RSC Advances

Supporting information

Compressible Multi-Scale Magnetic Constructs: Decorating the Outer Surface of Self-Assembled Microbubbles with Iron Oxide Nanoparticles

Phuc Nghia Nguyen, Gergana Nikolova, Prasad Polavarapu, Gilles Waton, Lai Truong Phuoc, Geneviève Pourroy, Marie Pierre Krafft

Cite this DOI: 10.1039/C3XX00000X

www.rsc.org/xxxxxx

Supplementary Information

Compressible Multi-Scale Magnetic Constructs: Decorating the Outer Surface of Self-Assembled Microbubbles with Iron Oxide Nanoparticles

Phuc Nghia Nguyen^a, Gergana Nikolova^a, Prasad Polavarapu^a, Gilles Waton^a, Lai Truong Phuoc^b, Geneviève Pourroy^b, Marie Pierre Krafft^{*a}

^aSystèmes Organisés Fluorés à Finalités Thérapeutiques (SOFFT) Institut Charles Sadron (ICS) CNRS - Université de Strasbourg (UPR 22). 23 rue du Loess, BP 84047. 67034 Strasbourg Cedex 2. France.

^bInstitut de Physique et de Chimie des Matériaux de Strasbourg (IPCMS) CNRS - Université de Strasbourg (UMR 7504). 23 rue du Loess, BP 43. 67034 Strasbourg Cedex 2. France.

Experimental Section

Materials. Perfluorooctyl iodide (C₈F₁₇I) was from Atochem, iron chloride hexahydrate (FeCl₃·6H₂O, 99% extra pure) from Acros Organics, undecenol, iron chloride tetrahydrate (FeCl₂·4H₂O, >99%), hydrochloric acid (HCl, min 37%), perfluorohexane (>99%) and Pluronic F68 (a polyoxyethylene-polyoxypropylene triblock copolymer, *MW*~8300, purity >99%) from Sigma Aldrich. Tetramethylammonium hydroxide (N(CH₃)₄OH aqua solution) was from Alfa Aesar. A HEPES buffer solution (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, from Sigma) (20 mmol L⁻¹) in a 150 mmol L⁻¹ NaCl solution was prepared and its pH adjusted to 7.0 with 1N NaOH. Water was purified using a Millipore system (surface tension: 72.1 mN m⁻¹ at 20°C, resistivity: 18.2 MΩ cm).

Synthesis of (Perfluorooctyl)undecyl Phosphate C₈F₁₇(CH₂)₁₁OP(O)(OH)₂ (F8H11Phos). The non-commercially available precursor, C₈F₁₇(CH₂)₁₁OH, was prepared by radical addition of C₈F₁₇I on undecenol, followed by dehalogenation using gaseous HCl.^[1] A solution of 130 mg (78 μL, 0.85 mmol, 2.5 eq) of POCl₃ in 1 mL of dry Et₂O was cooled to 0°C under argon and under stirring. 200 mg (0.34 mmol) of F8H11OH in 4 mL Et₂O were added dropwise over 60 min at 0 °C and stirred at room temperature for 24 h, after which 0.5 mL of water was added and the mixture was stirred for 16 h. The two phases were separated and the aqueous phase was extracted with Et₂O (3 times). The combined ether phases were extracted with a 5% NaHCO₃ solution (3 times). The pH of the aqueous phase was adjusted to ~1 with diluted HCl and extracted with ethyl acetate (3 times). The organic phase was

washed with water, dried over MgSO_4 and the solvent evaporated to yield 190 mg (84%) of *F8H11Phos* (white solid). ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 1.33-1.43 (m, 14H), 1.55-1.75 (m, 4H), 2.15 (m, 2H), 3.96 (dt, $J = 6.8, 6.6$ Hz). ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm): 21.3, 26.7, 30.1, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.7, 31.5, 31.7, 67.8. Anal. Calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{F}_{17}\text{O}_4\text{P}$: C, 34.04; H, 3.61. Found: C, 34.4; H, 3.82.

Synthesis of Fe_3O_4 Nanoparticles. Solutions of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mol L^{-1}) and $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2 mol L^{-1}) were prepared by dissolving the iron salts in HCl (2 mol L^{-1}) and deoxygenated with argon for 30 min. 10 mL of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution and 2.5 mL of $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ solution were mixed and heated to 70°C under argon under stirring. A 1 mol L^{-1} $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{OH}$ solution was then injected at 0.7 mL min^{-1} and vigorously stirred for 20 min. The precipitate was washed with distilled water until pH 7 was reached. The nanoparticles' size was $10 \pm 1 \text{ nm}$, as determined by TEM.^[2, 3]

Preparation of Bare Microbubbles. *F8H11Phos* (10 mmol L^{-1}) was dispersed in the HEPES/NaCl buffer (one night, room temperature, magnetic stirring). Pluronic F68 was added to facilitate dispersion (*F8H11Phos*:F68 molar ratio 10:1). A 1 mL aliquot of *F8H11Phos*/F68 dispersion was transferred to a glass tube (inner diameter 18 mm, length 63 mm) and pre-sonicated under air at low power (setting 2) for 30 s at room temperature. The sonicator (Vibracell, Bioblock-Scientific, Illkirch, France) was operated at 20 kHz (3 mm titanium probe, output $\sim 600 \text{ W}$, duty cycle 40%). The *F8H11Phos*/F68 dispersion was then sonicated for 15 s (setting 2, $\sim 200 \text{ W}$) at room temperature under N_2 saturated with perfluorohexane by bubbling through three successive perfluorohexane-containing vials. The sonicator probe was consistently placed 5 mm below the dispersion's surface. The aggregated microbubble suspension (foam) was diluted with buffer (8 mL). Size fractionation was achieved by floatation under gravity (30 min). Aliquots (1 or 2 mL, in order to keep the initial values of the ultrasound attenuation coefficient comparable) were consistently sampled at a depth of 55 mm from the edge of the glass vial and injected into the buffer-filled ultrasonic measuring cell (cell volume: 140 mL) thermoregulated at 25°C .

Preparation of Fe_3O_4 Nanoparticle-Decorated Microbubbles. A 1 mL aliquot of the above *F8H11Phos*/F68 dispersion was placed in a glass tube with 1 mL of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ dispersion (5 mg mL^{-1}) in HEPES/NaCl buffer and vortexed. This mixture was sonicated for 15 s, or 2 min, under a perfluorohexane atmosphere and diluted with 8 mL of HEPES buffer. Size fractionation was achieved by floatation under gravity (30 min) and aliquots were injected in the ultrasonic cell for AAM. 30 min were allowed before analysis by OM and SLS.

Acoustical Determination of Microbubble Size Distributions. The attenuation of the acoustical pulse that propagates through the aqueous bubble dispersion was measured and fitted to standard simple-harmonic resonator curves to determine bubble sizes.^[4-7] The setup has been designed so that the ultrasound field does not alter the stability of the bubbles: First, the acoustical power that is used is low ($<0.1 \text{ W cm}^{-2}$; peak-to-peak acoustical pressure $<3 \times 10^4 \text{ Pa}$). Second, the wave package only lasts $10 \mu\text{s}$, and only 256 data points were recorded during the whole experimental span time along a pseudologarithmic scale, ensuring that the bubbles were only weakly exposed to ultrasound.^[8] Each measurement was repeated on 3 to 5 different bubble preparations.

Optical Microscopy. Three to four droplets of bubble dispersion were placed into a concave glass slide, covered with a glass slide, and observed with an Olympus BH2 (Tokyo, Japan) microscope. Rapid image acquisition used a Lumenera Infinity 2 CCD camera (Lumenera, Ottawa, Canada). Bubble radii were measured using the ImageJ software on 5 to 10 slides.^[9]

Dynamic Light Scattering (DLS). A Malvern Zetasizer Nano ZS was used (scattering angle 90°). The *z*-averaged hydrodynamic mean diameters of the Fe_3O_4 NPs dispersed in the HEPES/NaCl buffer were determined using the Malvern software. The measurements were achieved at 25°C on $5 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ concentrated dispersions at pH 7.

Static Light Scattering (SLS). To obtain acceptable obscuration values, 1 mL of bubble dispersion prepared from a 10 mM-concentrated *F8H11*Phos dispersion was injected in the 10 mL HEPES buffer-containing cell of a Coulter LS100 instrument (Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL). The samples were continuously agitated at 25°C . Fraunhofer's theory was used to analyze the diffraction pattern.

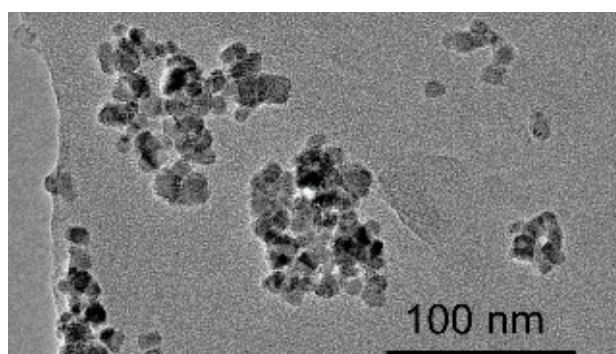


Figure S1. Transmission electron micrograph (TEM) of a dried sample of Fe_3O_4 nanoparticles. The average diameter of the individual magnetite core is $10 \pm 2 \text{ nm}$.

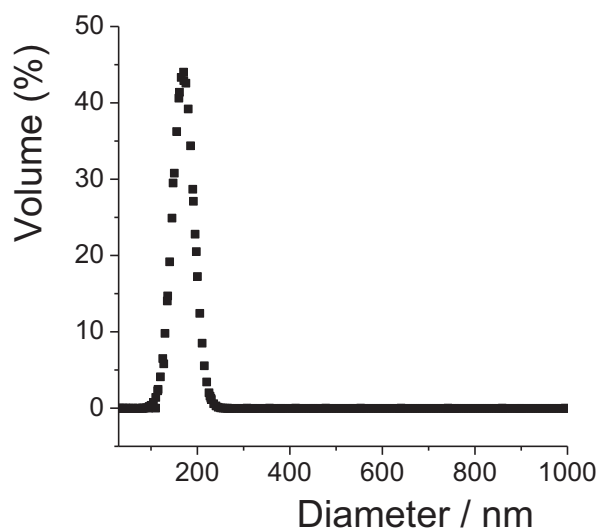


Figure S2. Dynamic light scattering of Fe_3O_4 nanoparticles dispersed in the HEPES/NaCl buffer at pH 7. The 10 nm NPs form narrowly dispersed clusters of ~ 170 nm in diameter.

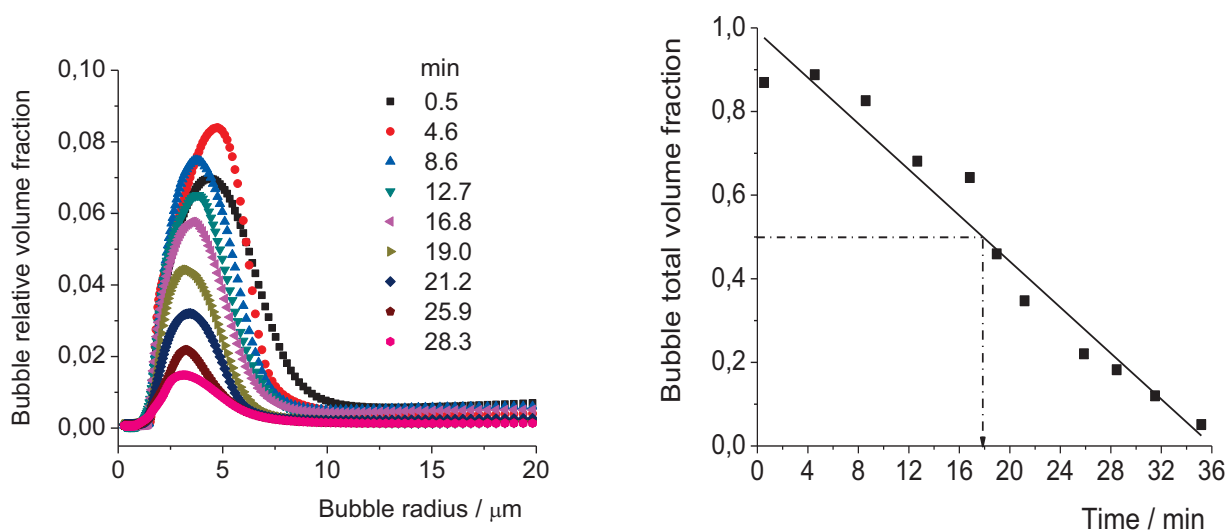


Figure S3. a) Size distributions at various time points of bare microbubbles stabilized by *F8H11Phos* in the HEPES buffer (pH 7), as determined by the acoustical attenuation method. b) Time evolution of the volume fraction of *F8H11Phos* bubbles, indicating a half-life of ~ 18 min.

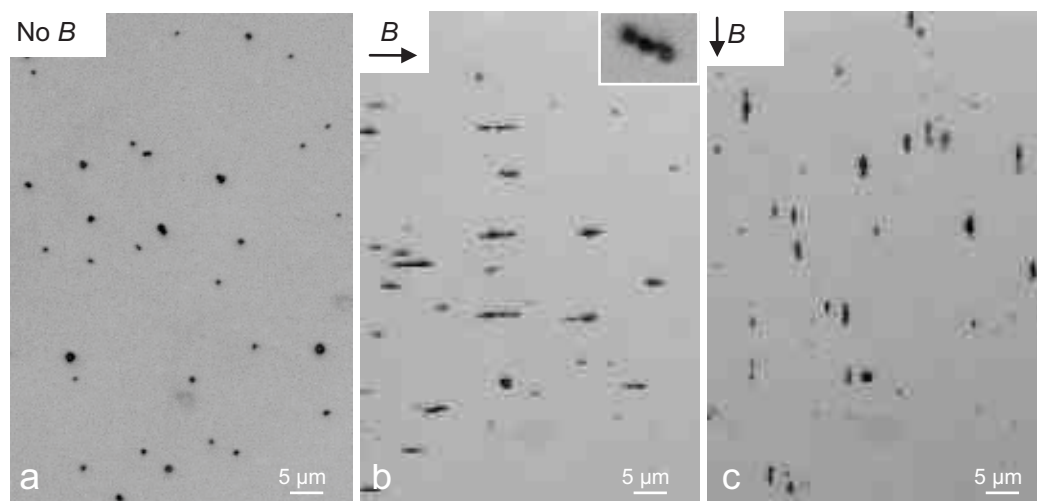


Figure S4. Optical micrographs of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ -decorated MBs. a) In the absence of magnetic field B , the decorated microbubbles are distributed randomly. When submitted to the magnetic field, they string up and align horizontally (b) or vertically (c), depending on the direction of B . Inset: magnification of a trio of bubbles. A video of the experiment is available from the author.

- [1] N. O. Brace, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 3033.
- [2] T. J. Daou, J. Grenèche, G. Pourroy, S. Buathong, A. Derory, C. Ulhaq-Bouillet, B. Donnio, D. Guillon, S. Begin-Colin, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 5869.
- [3] J. Santoyo Salazar, L. Perez, O. De Abril, L. Truong Phuoc, D. Ihiwakrim, M. Vazquez, J.-M. Grenèche, G. Pourroy, *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 1379.
- [4] N. De Jong, L. Hoff, T. Skotland, N. Bom, *Ultrasonics* **1992**, *30*, 95.
- [5] D. E. Goertz, N. de Jong, A. F. W. van der Steen, *Ultrasound Med. Biol.* **2007**, *33*, 1376.
- [6] H. Medwin, *J. Acoust. Soc. Am.* **1977**, *62*, 1041.
- [7] T. G. Leighton, *The Acoustic Bubble*, Academic Press, San Diego, **1994**.
- [8] S. Rossi, G. Waton, M. P. Krafft, *Langmuir* **2010**, *26*, 1649.
- [9] W. S. Rasband, *Vol. U.S. National Institute of Health, Bethesda, MD*, U.S. National Institute of Health, Bethesda, MD. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. **1997-2005**.

Conclusion générale

Conclusion

Les propriétés hydrophobes et lipophobes des chaînes fluorées confèrent aux fluorocarbures et aux tensioactifs fluorés des caractéristiques bien particulières. L'étude de monocouches de phospholipides en présence de fluorocarbures est importante pour le développement de nouvelles applications biomédicales basées sur des associations de ces deux composants et, en particulier, pour une meilleure compréhension de leurs rôles respectifs dans deux applications identifiées (les surfactants pulmonaires de remplacement et les agents de contraste).

Dans le cadre de cette thèse, nos deux objectifs principaux ont consisté à évaluer d'une part l'impact de l'adsorption de phospholipides et/ou des fluorocarbures à l'interface air/eau pour des applications de substitution du surfactant pulmonaire et, d'autre part, à élaborer et étudier de nouvelles microbulles stabilisées par des fluorocarbures et des tensioactifs fluorés pour des applications en tant qu'agents de contraste multimodaux.

La tensiométrie par analyse de profil de bulle lors de l'étude de l'adsorption dynamique d'une série de phospholipides à une interface eau/air, la phase gazeuse étant saturée en perfluorohexane, un fluorocarbure non polaire et non amphiphile, a permis de démontrer que le composé fluoré accélère de manière significative la vitesse d'adsorption des phospholipides à cet interface et qu'il en diminue la tension interfaciale d'équilibre. Cette étude a permis de conclure qu'une molécule non polaire et non amphiphile peut avoir une activité d'agent co-tensioactif vis-à-vis de phospholipides à l'interface air/eau.

L'étude de l'adsorption de dipalmitoylphosphatidylcholine à la surface d'une bulle millimétrique sous oscillations périodiques a permis de mettre en évidence un enrichissement de l'interface par des molécules de phospholipides venant de la phase dispersée et un abaissement permanent de la tension interfaciale. Le phénomène se produit uniquement lorsque le temps caractéristique de la perturbation est comparable au temps caractéristique de la transition liquide expansé/liquide condensé subit par la monocouche de phospholipide. Il est intéressant de noter que la gamme de périodes d'oscillations est proche de celle de la respiration humaine. L'observation de ces nouveaux phénomènes devrait pouvoir être rapprochée de la dynamique au niveau pulmonaire d'un film d'agent tensioactif lors de la respiration. D'un point de vue méthodologique, ces résultats ouvrent des perspectives pour l'étude de la dynamique et des propriétés de transport de films insolubles de phospholipides

qui ne pouvaient être étudiés en l'absence d'oscillations, l'équilibre n'étant pas atteint dans un délai raisonnable.

L'étude de l'adsorption de dipalmitoylphosphatidylcholine en présence d'albumine a permis de conclure, en accord avec des études précédentes, que ce phospholipide ne s'adsorbe pas de manière significative à l'interface air/eau et qu'il ne peut contribuer à diminuer la tension interfaciale quand l'albumine est présente. Néanmoins, il a pu être mis en évidence que la dipalmitoylphosphatidylcholine déplace l'albumine et diminue la tension interfaciale lorsque le film interfacial est soumis à des oscillations sinusoïdales prolongées. De plus, l'introduction d'un fluorocarbure gazeux dans la bulle accélère la cinétique d'adsorption par un ordre de grandeur. La période choisie (10 s) et l'amplitude de la surface de variation (15%) sont des conditions physiologiques normales rencontrées dans la respiration humaine. Notre étude a également permis de montrer que l'albumine ne pénètre pas un film adsorbé de dipalmitoyl phosphatidylcholine lorsque la protéine est ajoutée après que le film de phospholipide soit dans un équilibre d'état condensé. Ces observations pourraient contribuer à mieux décrire la dynamique des films du surfactant alvéolaire natif et, de manière plus générale, la respiration et ce, en ne prenant pas en considération le rôle clé joué par les protéines présentes dans la composition du surfactant pulmonaire.

Notre étude sur les microbulles de gaz nous a permis de montrer qu'un phosphate perfluoroalkylé utilisé comme tensioactif constitutif de la paroi des microbulles permettaient de stabiliser ces dernières au-delà de leur rayon critique et durant des périodes de plusieurs semaines. C'est un comportement exceptionnel, si on considère que les microbulles stabilisées par des phospholipides standard collapsent en quelques secondes après avoir atteint le rayon critique.

Nous avons mis à profit la stabilité extrême de ces microbulles pour décorer leur surface externe de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer (Fe_3O_4). Ces microbulles décorées sont stables pendant plusieurs heures et conservent leurs propriétés échogènes, ces dernières ne sont pas amorties par la couche de nanoparticules. Ces microbulles décorées sont les premiers objets à associer de véritables bulles de gaz recouvertes d'un film flexible de nanoparticules à leur surface.

Reference

- [1] A. W. Adamson, *Physical Chemistry of Surfaces*, Wiley Interscience Publication, Chichester, **1990**.
- [2] D. F. Evans, H. Wennerstrom, *The Colloidal Domain*, 2nd Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [3] M. J. Rosen, *Surfactant and Interfacial Phenomena*, Wiley Interscience, New Jersey, **2004**.
- [4] K. Tsujii, *Surface Activity: Principles, Phenomena, and Application*, Academic Press, San Diego, **1998**.
- [5] X. Y. Hua, M. J. Rosen *J Colloid Interface Sci.* **1988**, 124, 652 - 659.
- [6] M. J. Rosen, X. Y. Hua *J Colloid Interface Sci.* **1990**, 139, 397 - 407.
- [7] C. H. Chang, E. I. Franses *Colloids Surf A.* **1995**, 100, 1-45.
- [8] W. Henry *Nicholson's.* **1901**, 4, 224.
- [9] I. Langmuir *Phys Rev.* **1916**, 8, 2.
- [10] I. Langmuir *Proc Natl Acad Sci.* **1917**, 3, 141.
- [11] I. Langmuir *J Am Chem Soc.* **1918**, 15, 75.
- [12] V. B. Fainerman, S. V. Lylyk, E. V. Aksenenko, A. V. Makievski, J. T. Petkov, J. Yorke, R. Miller *Colloids Surf A.* **2009**, 334, 1-7.
- [13] S. Schurch, F. H. Y. Green, H. Bachofen *Biochim Biophys Acta.* **1998**, 1408, 180-202.
- [14] J. Eastoe, J. S. Dalton *Adv Colloid Interface Sci.* **2000**, 85, 103-144.
- [15] A. F. H. Ward, L. Tordai *J Chem Phys.* **1946**, 14, 453-461.
- [16] F. Monroy, J. G. Kahn, D. Langevin *Colloids Surf A.* **1998**, 143, 251-260.
- [17] B. A. Noskov, A. V. Akentiev, A. Y. Bilibin, I. M. Zorin, R. Miller *Adv Colloid Interface Sci.* **2003**, 104, 245-271.
- [18] J. B. Li, G. Kretzschmar, R. Miller, H. Möhward *Colloids Surf A.* **1999**, 149, 491-497.
- [19] V. B. Fainerman, E. V. Aksenenko, S. V. Lylyk, A. V. Makievski, F. Ravera, J. T. Petkov, J. Yorke, R. Miller *Colloids Surf A.* **2009**, 334, 16-21.
- [20] E. H. Lucassen-Reynders, A. Cagna, J. Lucassen *Colloids Surf A.* **2001**, 186, 63-72.
- [21] S. M. I. Sadd, A. W. Neumann, A. E.J. *Colloids Surf A.* **2010**, 354, 34-44.
- [22] A. L. Klibanov *Adv Drug Deliv Rev.* **1999**, 37.
- [23] A. L. Klibanov *Top Curr Chem.* **2002**, 222, 73-106.
- [24] E. G. Schutt, D. H. Klein, R. M. Mattrey, J. G. Riess *Angew Chem Int Ed.* **2003**, 42.
- [25] J. G. Riess *Curr Opin Colloid Interface Sci.* **2003**, 8, 259-266.

- [26] A. L. Klibanov *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 9-17.
- [27] S. Sirsi, M. Borden *Bubble Sci Eng Technol.* **2009**, 1, 3-17.
- [28] E. Stride, M. J. Edirisinghe *Med Biol Eng Comput.* **2009**, 47, 809-811.
- [29] C. Christiansen, H. Kryvi, P. C. Sontum, T. Skotland *Biotechnol Appl Biochem.* **1994**, 19, 307-320.
- [30] S. Podell, C. Burrascano, M. Gaal, B. Golec, J. Maniquis, P. Mehlhaff *Biotechnol Appl Biochem.* **1999**, 30, 213-223.
- [31] F. Cavalieri, M. Ashokkumar, F. Grieser, F. Caruso *Langmuir.* **2008**, 24, 10078-10083.
- [32] G. Korpanty, P. A. Grayburn, R. V. Shohet, R. A. Brekken *Ultrasound Med Biol.* **2005**, 31, 1279-1283.
- [33] K. W. Ferrara, M. A. Borden, H. Zhang *Acc Chem Res.* **2009**, 42, 881-892.
- [34] W. H. Wang, C. C. Moser, M.A. Wheatley *J Phys Chem.* **1996**, 100, 13815-13821.
- [35] S. Singhal, C. C. Moser, M. A. Wheatley *Langmuir.* **1993**, 9, 2426-2429.
- [36] D. G. Shchukin, K. Köhler, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov *Angew Chem Int Ed.* **2005**, 44, 3310-3314.
- [37] A. Kabalnov, D. Klein, T. Pelura, E. Schutt, J. Weers *Ultrasound Med Biol.* **1998**, 24, 739-749.
- [38] R. T. Beyer, and Letcher, S.V., *Physical Ultrasonic*, Academic Press, New York, **1969**.
- [39] P. S. Epstein, M. S. Plesset *J Chem Phys.* **1950**, 18, 1505-1509.
- [40] P. B. Duncan, D. Needham *Langmuir.* **2004**, 20, 2567-2578.
- [41] J. Hanwright, J. Zhou, G. M. Evans, K. P. Galvin *Langmuir.* **2005**, 21, 4912-4920.
- [42] M. A. Borden, M. L. Longo *J Phys Chem B.* **2004**, 108, 5009-6016.
- [43] G. Pu, M. L. Longo, M. A. Borden *J Am Chem Soc.* **2005**, 127, 6524-6525.
- [44] M. Borden, L. Longo *Langmuir.* **2002**, 18, 9225-9233.
- [45] T. G. Leighton, *The acoustic bubble*, Academic press, San Diego (CA), US, **1994**.
- [46] S. Rossi, G. Waton, M. P. Krafft *Langmuir.* **2010**, 26, 1649-1655.
- [47] J. A. Clements *The Physiologist.* **1962**, 5, 11-28.
- [48] J. A. Zasadzinski, J. Ding, H. E. Warriner, F. Bringezu, A. J. Waring *Curr Opin Colloid Interface Sci.* **2001**, 6, 506-513.
- [49] I. R. Wright, L. J. Dobbs *Annu Rev Physiol.* **1991**, 53, 395-414.
- [50] J. G. Riess *Chem Rev.* **2001**, 101, 2797-2920.
- [51] M. P. Krafft, J. G. Riess *J Polym Sci Part A Polym Chem.* **2007**, 45, 1185-1198.
- [52] M. P. Krafft *Biochimie.* **2012**, 94, 11-25.
- [53] R. Díaz-López, N. Tsapis, E. Fattal *Pharm Res.* **2010**, 27, 1.

- [54] F. Gerber, M. P. Krafft, T. F. Vandamme, M. Goldmann, P. Fontaine *Angew Chem Int Ed.* **2005**, 44, 2749-2752.
- [55] F. Gerber, T. F. Vandamme, M. P. Krafft *CR Chim.* **2009**, 12, 180-187.
- [56] F. Gerber, M. P. Krafft, T. F. Vandamme, M. Goldmann, P. Fontaine *Biophys J.* **2006**, 90, 3184-3192.
- [57] F. Gerber, M. P. Krafft, T. F. Vandamme *Biochim Biophys Acta.* **2007**, 1768, 490-494.
- [58] A. D. Postle, E. L. Heeley, D. C. Wilton *Comp Biochem Physiol A Physiol.* **2001**, 129, 65-73.
- [59] J. Pérez-Gil, K. M. W. Keough *Biochim Biophys Acta.* **1998**, 1408, 203-217.
- [60] U. Pison, M. Max, A. Neuendank, S. Weissbach, S. Pietschmann *Eur J Clin Invest.* **1994**, 24, 586-599.
- [61] E. Crouch, J. R. Wright *Annu Rev Physiol.* **2001**, 2001, 521-554.
- [62] T. R. Korfhagen, V. Sheftelyevich, M. Burhans, M. D. Bruno, G. F. Ross, S. E. Wert, M. T. Stahlman, A. H. Jobe, M. Ikegami, J. A. Whitsett, J. H. Fisher *J Biol Chem.* **1998**, 273, 28438 - 28443.
- [63] J. Ding, D. Y. Takamoto, A. Von Nahmen, M. M. Lipp, K. Y. C. Lee, A. J. Waring, J. A. Zasadzinski *Biophys J.* **2001**, 80, 2262 - 2272.
- [64] D. Y. Takamoto, M. M. Lipp, A. Von Nahmen, K. Y. C. Lee, A. J. Waring, J. A. Zasadzinski *Biophys J.* **2001**, 81, 153 - 169.
- [65] Y. Y. Zuo, R. A. W. Veldhuizen, A. W. Neumann, N. O. Petersen, F. Possmayer *Biochim Biophys Acta.* **2008**, 1778, 1947-1977.
- [66] R. Veldhuizen, K. Nag, S. Orgeig, F. Possmayer *Biochim Biophys Acta.* **1998**, 1408, 90 - 108.
- [67] J. Ding, I. Doudevski, H. E. Warriner, T. Alig, J. A. Zasadzinski *Langmuir.* **2003**, 19, 1539 - 1550.
- [68] U. Pison, R. Herold, S. Schürch *Colloids Surf A.* **1996**, 114, 165 - 184.
- [69] B. M. Discher, K. M. Maloney, D. W. Grainger, C. A. Sousa, S. B. Hall *Biochem J.* **1999**, 38, 374-383.
- [70] J. P. Bégué, D. Bonnet-Delpon, *Chimie Bioorganique et Médicinale du Fluor*, EDP Science, Paris, **2005**.
- [71] B. E. Smart in *Fluorocarbons, Vol.* (Eds.: S. Patai, Z. Rappoport), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, New York, **1983**, pp.603-655.
- [72] J. G. Riess *Tetrahedron.* **2002**, 58, 4113-4131.
- [73] M. P. Krafft, J. G. Riess *Chem Rev.* **2009**, 109, 1714-1792.

- [74] M. P. Krafft *Adv Drug Deliv Rev.* **2001**, 47, 209-228.
- [75] J. G. Riess *Chem Rev.* **2001**, 101, 2797-2919.
- [76] E. Kissa, Fluorinated Surfactants, synthesis, properties, application, Dekker, M., New York, **1994**.
- [77] K. Shinoda, M. Hato, T. Hayashi *J Phys Chem.* **1972**, 76, 909-914.
- [78] G. J. T. Tiddy in *Concentrated surfactant systems, Vol.* (Ed. H. F. Eicke), Birkhauser Verlag, Basel **1985**, pp.148-159.
- [79] B. M. Fung, D. L. Mamrosh, E. A. O'Rear, C. B. Fresh, J. Afzal *J Phys Chem.* **1988**, 92, 4405-4411.
- [80] W. Guo, T. A. Brown, B. M. Fung *J Phys Chem.* **1991**, 95, 1829-1836.
- [81] J. G. Riess *Artif Organs.* **1984**, 8, 44-56.
- [82] J. G. Riess, M. P. Krafft *Chem Phys Lipids.* **1995**, 75, 1-14.
- [83] S. F. Flaim *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* **1994**, 22, 1043-1054.
- [84] Y. Tsuda, K. Yamanouchi, K. Yokayama, T. Suyama *Biomater Artif Cells Artif Organs.* **1998**, 16, 473-484.
- [85] W. R. Ravis, J. F. Hoke, D. L. Parsons *Drug Metab Rev.* **1991**, 23, 375-411.
- [86] Y. Ni, D. H. Klein, D. Song *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* **1996**, 24, 81-90.
- [87] V. V. Obraztsov, A. S. Kabalnov, K. N. Makarov *J Fluorine Chem.* **1991**, 54, 375.
- [88] L. Zarif, M. Postel, B. Septe, L. Trevino, J. G. Riess, A. M. Mahé, R. Follana *Pharm Res.* **1994**, 11, 122-127.
- [89] R. Hirschl, T. Pranikoff, P. Gauger, R. Schreiner, R. Dechert, R. Bartlett *Lancet.* **1995**, 346, 1201-1202.
- [90] C. L. Leach, J. S. Greenspan, D. Rubenstein, T. H. Shaffer, M. R. Wolfson, J. C. Jackson, R. DeLemos, B. P. Fuhrman *N Engl J Med.* **1996**, 335, 761-766.
- [91] M. R. Wolfson, J. S. Greenspan, K. S. Deoras, S. D. Rubenstein, T. H. Shaffer *J Appl Physiol.* **1992**, 72, 1024-1031.
- [92] M. P. Krafft, J. G. Riess, J. G. Weers in *The design and engineering of oxygen-delivering fluorocarbon emulsions Vol.* (Ed. S. Benita), Harwood Academic Publisher, Amstecdam, **1998**, pp.235-333.
- [93] L. Gattinoni, L. D'Andrea, P. Pelosi, G. Vitale, A. Pesenti, R. Fumagalli *JAMA.* **1993**, 269, 2122-2127.
- [94] K. P. Morris, P. N. Cox, C. D. Mazer, H. Frndova, C. McKerlie, R. Wolfe *Intens Care Med.* **2000**, 26, 756-763.

- [95] M. J. Thomassen, L. T. Buhrow, H. P. Wiedemann *Crit Care Med.* **1997**, 25, 2045-2047.
- [96] T. M. Smith, D. M. Steinhorn, K. Thusu, B. P. Fuhrman, P. Dandona *Crit Care Med.* **1995**, 23, 1533-1539.
- [97] T. Koch, M. Ragaller, D. Haufe, A. Hofer, M. Grosser, D. M. Albrecht, M. Kotzsch, T. Luther *Anesthesiology.* **2001**, 94, 101-109.
- [98] C. M. Woods, G. Neslund, E. Kornbrust, S. F. Flaim *Am J Physiol.* **2000**, 278, 1008-1017.
- [99] D. M. Colton, G. O. Till, K. J. Johnson, J. J. Gater, R. B. Hirschl *J Crit Care.* **1998**, 13, 136-139.
- [100] M. A. Croce, T. C. Fabian, J. H. J. Patton, S. M. Melton, M. Moore, L. Trentham *J Traum.* **1998**, 45, 273-282.
- [101] S. F. Van Eeden, M. E. Klut, M. A. Leal, J. Alexander, Z. Zonis, P. Skippen *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2000**, 22, 441-450.
- [102] A. T. Rotta, B. Gunnarsson, L. J. Hernan, B. P. Fuhrman, D. M. Steinhorn *J Crit Care.* **1999**, 14, 84-92.
- [103] K. K. Nobuhara, D. O. Fauza, J. W. Difiore, M. H. Hines, J. C. Fackler, R. Slavin, R. Hirschl, J. M. Wilson *J Pediatr Surg.* **1998**, 33, 292-297.
- [104] E. I. Franses, O. A. Basaran, C. H. Chang *Curr Opin Colloid Interface Sci.* **1996**, 1, 296-303.
- [105] P. Lecomte du Noüy *J Gen Physiol.* **1925**, 5.
- [106] L. Wilhelmy *Ann Phys.* **1863**, 119, 177.
- [107] T. Young, *Miscellaneous works*, **1855**.
- [108] P. S. Laplace, *Mécanique Céleste*, JMB Duprat, Paris, **VII**.
- [109] M. Hoorfar, A. W. Neumann *Adv Colloid Interface Sci.* **2006**, 121, 25-49.
- [110] N. J. Alvarez, L. M. Walker, S. L. Anna *Langmuir.* **2010**, 26, 13310-13319.
- [111] J. W. Jennings, Jr., N. R. Pallas *Langmuir.* **1988**, 4, 959-967.
- [112] P. Cheng, A. W. Neumann *Colloids Surf A.* **1992**, 62, 297-305.
- [113] C. Antoine *C R Hebd Seances Acad Sci.* **1888**, 107, 681-684, 778-780, 836-837.
- [114] D. Chatterjee, K. Sarkar, P. Jain, N. E. Schreppler *Ultrasound Med Biol.* **2005**, 31, 781-786.
- [115] M. X. Tang, R. J. Eckersley, J. A. Noble *Ultrasound Med Biol.* **2005**, 31, 377-384.
- [116] H. C. van de Hulst, *Light Scattering by Small Particles*, Dover Publications, New York, **1981**.

- [117] W. S. Rasband, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, **1997-2012**.
- [118] M. Blank, R. H. Ottewill *J Phys Chem.* **1964**, 68, 2206-2211.
- [119] F. Hauxwell, R. H. Ottewill *J Colloid Interface Sci.* **1968**, 28, 514-521.
- [120] F. Hauxwell, R. H. Ottewill *J Colloid Interface Sci.* **1970**, 34, 473-479.
- [121] C. Jho, D. Neason, S. Shogbola, A. D. King *J Colloid Interface Sci.* **1977**, 65, 141-154.
- [122] C. M. Roth, K. U. Goss, R. P. Schwarzenbach *J Colloid Interface Sci.* **2002**, 252, 21-30.
- [123] P. J. Linstrom, W. G. Mallard, NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, <http://webbook.nist.gov>.
- [124] R. Pajarre, P. Koukkari *J Colloid Interface Sci.* **2009**, 337, 39-45.

Influence de Composés Perfluoroalkylés sur des Films Minces de Phospholipides à une Interface Gaz/Eau

Résumé

Les fluorocarbures ont un fort potentiel en médecine. Cependant, et en dépit du fait que certaines formulations employant des fluorocarbures sont utilisées en clinique, il n'existe que relativement peu d'études visant à déterminer les interactions entre un fluorocarbure et une membrane de phospholipides. Notre étude concentre à l'interface fluorocarbure/phospholipide, qui représente d'une part un modèle simplifié du surfactant pulmonaire natif dont le composant majoritaire est la dipalmitoylphosphatylcholine (DPPC), et d'autre part la paroi de microbulles développées comme nouveaux agents théranostiques.

Tout d'abord, nous montrons que les fluorocarbures abaissent considérablement la tension interfaciale d'équilibre d'une série de phospholipides et accélèrent fortement leur adsorption. Nous montrons que des oscillations périodiques appliquées à la bulle induisent une transition du film de DPPC vers un état d'organisation plus dense. L'application d'oscillations périodiques permet aussi à la DPPC d'expulser du film interfacial une protéine, l'albumine, dont la présence est souvent liée aux troubles dus au mauvais fonctionnement du surfactant pulmonaire. L'effet des fluorocarbures, qui accélère considérablement l'expulsion de l'albumine par la DPPC, est également étudié.

D'autre part, nous avons obtenu des microbulles exceptionnellement stables grâce à une série homologue de phosphates perfluoroalkylés. Nous avons également réussi à former des microbulles couvertes par des nanoparticules magnétiques, tout en gardant les propriétés échogènes des bulles. De telles microbulles offrent un potentiel comme des agents de contraste bimodaux pour l'IRM et l'échsonographie.

Résumé en anglais

Fluorocarbons have a great potential in medicine. However, and despite the fact that some formulations using fluorocarbons are used clinically, only a few studies are reported that aim to determining the interactions between a fluorocarbon and a membrane of phospholipids. Our work concentrated on the fluorocarbon/phospholipid interface, which represents, on one hand, a simplified model of the lung surfactant, the major component of which is dipalmitoylphosphatylcholine (DPPC), and on the other hand, the shell of microbubbles developed as new theranostic agents.

In a first part, we show that fluorocarbons significantly reduce the equilibrium interfacial tension of a series of phospholipids and greatly accelerate their adsorption rate. We also show that periodical oscillations applied to the bubble induce a transition of DPPC film to state with a denser organization. The application of periodical oscillations also allows DPPC to expel from the interfacial film a protein, albumin, whose presence is often associated with disorders caused by dysfunction of the lung surfactant. The impact of fluorocarbons, which considerably accelerate the expulsion from the interfacial film of albumin, is also studied.

In a second part, we have obtained exceptionally stable microbubbles with a homologous series of perfluoroalkylated phosphates. We were also able to form microbubbles covered by magnetic nanoparticles, while preserving the echogenicity of the bubbles. Such microbubbles offer a potential as bimodal contrast agents for MRI and echography.