



HAL
open science

Modulation des propriétés de membrane des polymersomes : perméabilité et évolution de forme

Romain Salva

► **To cite this version:**

Romain Salva. Modulation des propriétés de membrane des polymersomes : perméabilité et évolution de forme. Autre. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2013. Français. NNT : 2013BOR15267 . tel-01124166

HAL Id: tel-01124166

<https://theses.hal.science/tel-01124166>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Romain SALVA

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : POLYMÈRES

MODULATION DES PROPRIÉTÉS DE MEMBRANE DES POLYMERSOMES : PERMÉABILITÉ ET ÉVOLUTION DE FORME

Directeurs de recherche : M. Patrick GUENOUN, M. Sébastien LECOMMANDOUX

Soutenue le : 18 Décembre 2013

Devant la commission d'examen formée de :

| | | |
|---------------------------|--|------------|
| Mme LI Min-Hui | Directrice de recherche, CNRS, Institut Curie | Rapporteur |
| M. MARQUES Carlos | Directeur de recherche, Institut Charles Sadron | Rapporteur |
| Mme BRULET Annie | Ingénieur de recherche, CNRS, CEA-Saclay | Examineur |
| M. CRAMAIL Henri | Professeur, Université Bordeaux 1 | Examineur |
| Mme VIALLAT Annie | Directrice de recherche, CNRS, Université de Marseille | Examineur |
| M. GUENOUN Patrick | Ingénieur CEA, Saclay | Examineur |
| M. LECOMMANDOUX Sébastien | Professeur, Institut Polytechnique de Bordeaux | Examineur |

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO) et au Laboratoire Interdisciplinaire sur l'Organisation Nanométrique et Supramoléculaire (LIONS). Ils ont bénéficié d'un co-financement du Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives et de la région Aquitaine.

Dans un premier temps je tiens à remercier le Prof. Henri Cramail, directeur du LCPO, et M. Eric Eliot, directeur du SIS2M, pour m'avoir accueilli au sein de leurs structures respectives et ainsi m'avoir permis de réaliser ma thèse dans de très bonnes conditions de travail.

J'adresse bien évidemment toute ma reconnaissance à mes deux directeurs de thèse, le Dr. Patrick Guenoun et le Prof. Sébastien Lecommandoux, pour m'avoir fait confiance et donné l'opportunité de travailler sur ce projet de thèse mais également pour leur investissement à mes côtés pendant ces trois ans. Vous avez toujours été disponibles pour répondre à mes questions, que ce soit en réunion mais aussi en discussion de couloir (sur la science ou autre...), et avez su trouver le bon équilibre entre me guider dans mes recherches et me laisser avancer seul sur mon chemin, ce qui m'a permis de m'épanouir dans ce projet. Sébastien, un grand merci pour ta sympathie et pour m'avoir donné le goût de la science des polymères dès mes cours en école. Merci beaucoup Patrick pour ton enthousiasme face aux challenges et le second éclairage que tes connaissances en physique des membranes ont apporté sur mon travail. Vos nombreuses qualités scientifiques et personnelles ainsi que le soutien que vous m'avez apporté dans les moments difficiles ont été déterminant, j'ai énormément apprécié travailler avec vous et ai beaucoup grandi à vos côtés tout au long de cette aventure.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à toutes les personnes avec qui j'ai collaboré et qui m'ont épaulé au cours de ces travaux. Merci aux Dr. Olivier Sandre, Dr. Jean-François Le Meins et Dr. Christophe Schatz, les permanents du deuxième étage du LCPO, pour tous leurs conseils avisés sur de nombreux aspects scientifiques de ma thèse et les discussions annexes. Un grand merci à deux super post-docs du LCPO, le Dr. Julie Thévenot et le Dr. Colin Bonduelle, pour m'avoir mis en selle au début de ce projet en m'apprenant les secrets de la ROP et de la chimie sous atmosphère inerte. Vous êtes tous deux d'excellents scientifiques que j'apprécie et respecte beaucoup.

Je remercie vivement le Dr. Annie Brûlet pour son implication dans les expériences de SANS mais aussi pour sa grande disponibilité et gentillesse, la porte de son bureau m'a toujours été ouverte même quand elle n'était pas là ! Merci encore Olivier pour m'avoir accompagné pendant cette semaine de mesure intensive et le traitement des données. Un grand merci au Dr. Marc Schmutz pour les magnifiques images de Cryo-TEM réalisées, elles nous ont permis d'ouvrir les yeux, et pour sa volonté de poursuivre sa collaboration avec le LCPO.

Merci beaucoup au Dr. Corinne Chevillard sans qui le microscope confocal serait seulement à mes yeux un appareil dans une salle obscure, et aussi pour son aide pour les expériences de minéralisation. Merci au Dr. Hermann Nuss pour m'avoir transmis son expérience sur la fabrication et l'utilisation des puces microfluidiques.

Un grand merci aux personnels techniques et administratifs qui font tourner les laboratoires et nous apportent leur aide au quotidien : Nicolas, Anne-Laure, Cédric, Manu, Loïc, Elodie, Patrick H, Cricri, Corinne, Nicole, Catherine, Bernadette, Michèle et tous les autres.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail et l'intérêt qu'ils y ont porté : le Dr. Min-Hui Li et le Dr. Carlos Marques en qualité de rapporteurs, le Dr. Annie Brûlet et le Dr. Annie Viallat en tant qu'examineurs et le Prof. Henri Cramail qui a accepté de présider ce jury.

Un très gros merci à tous ceux qui ont fait de ces trois années un moment inoubliable avec toutes les soirées, afterwork et repas, pauses café institutionnelles et bons moments. Il y a les lions et lionceaux : Elo et sa super musique de bureau, les titistes (Cécile et Baptiste), Frédéric, Tony, Julie, Romain, Lucie... Les thésards de ma génération : Charlotte, Camille, Jules, Chrystilla, Thomas, Lise, Vincent et Dan, et tous les autres : An, Edgar, Marie, Paul, Audrey, Blandine, Elise, Deborah... Bien sûr je n'oublie pas tous nos post-docs chéris : Colin le parieur de gâteaux compulsif, Hugo, Julie, Loïc, Floraine, Silvia, Dr.Z « Kévin », Gaétane, Valentina, Antoine et tant d'autres ! Merci à tous pour avoir rendu ces trois années agréables !

Un immense merci à ma famille adorée pour son soutien depuis toujours, et en particulier à ma mère qui a toujours été là pour moi, pour m'écouter et me redonner du courage. Merci aussi à mes amis proches, qui m'ont toujours encouragé et permis de me ressourcer.

Enfin, je remercie de tout mon cœur Carine pour son amour, sa patience et son soutien en toutes circonstances, je ne serais jamais arrivé jusqu'ici sans elle.

Romain

Sommaire

Liste des abréviations

| | |
|---|------------|
| Introduction générale..... | 1 |
| 1 Etude bibliographique..... | 5 |
| 1.1 Auto-assemblage en solution..... | 7 |
| 1.2 Structures vésiculaires..... | 11 |
| 1.3 Propriétés des vésicules..... | 23 |
| 1.4 Modification des propriétés de membrane..... | 55 |
| 1.5 Conclusion..... | 69 |
| 2 Matériel et méthodes..... | 71 |
| 2.1 Produits chimiques..... | 73 |
| 2.2 Techniques d'analyses chimiques..... | 78 |
| 2.3 Caractérisation des vésicules..... | 80 |
| 3 Synthèse et auto-assemblage de copolymères triblocs..... | 95 |
| 3.1 Introduction – Etat de l'art..... | 97 |
| 3.2 Synthèse des copolymères triblocs..... | 103 |
| 3.3 Etude de l'auto-assemblage..... | 107 |
| 3.4 Conclusion..... | 115 |
| 3.5 Annexes..... | 116 |
| 4 Modification de la perméabilité des vésicules..... | 123 |
| 4.1 Formation de vésicules hybrides polymère / lipide..... | 126 |
| 4.2 Mesures du coefficient de perméabilité à l'eau..... | 135 |
| 4.3 Expérience de minéralisation..... | 150 |
| 4.4 Conclusion..... | 158 |
| 4.5 Annexes..... | 159 |

| | |
|---|------------|
| 5 Nano-polymersomes en conditions de choc osmotique : déformations membranaires et évolution de la forme | 167 |
| 5.1 Etude du comportement par diffusion dynamique de la lumière..... | 170 |
| 5.2 Vésicules de PDMS _{22-g} -PEO ₁₂ | 172 |
| 5.3 Vésicules de PEO _{17-b} -PDMS _{66-b} -PEO ₁₇ | 180 |
| 5.4 Vésicules de PBut _{46-b} -PEO ₃₀ | 184 |
| 5.5 Evolution des morphologies | 187 |
| 5.6 Conclusion | 196 |
| 5.7 Annexes | 197 |
| Conclusion générale..... | 205 |
| Références | 209 |

Liste des abréviations

Cmc = concentration micellaire critique
 d : épaisseur de membrane hydrophobe (nm)
DC₁₃PC : 2-ditridecanoyl-*sn*-glycero phosphocholine
DIPEA : N,N-diisopropyléthylamine
DLPC : 1,2-di-lauryoyl-*sn*-glycero phosphocholine
DLS : Diffusion dynamique de la lumière
DMPC : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
DNPA : Diffusion des Neutrons aux Petits Angles
DODAB : dioctadecyldiméthylammonium bromide
DODAC : dioctadecyldiméthylammonium chloride
DOPC 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
DOPG dioleoylphosphatidylglycerol
DPPC : Dipalmitoylphosphatidylcholine
DTNB : acide 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque
EDTA : Acide ethylene diamine tétraacétique
EPC : Egg Yolk Phosphatidylcholine
 f : fraction massique hydrophile
GUV : Vésicule Unilamellaire Géante (> 1 μm)
 H : courbure moyenne
HSPC : Hydrogenated soy phosphatidylcholine
ITO : Indium Tin Oxyde
 K : courbure gaussienne
 K_a : module élastique (mN/m)
 k_c : rigidité de courbure (kT)
LUV : Vésicules Unilamellaire (100 nm – 1 μm)
MLV : Vésicule Multilamellaire
ADE : Area Difference Elasticity
MSVs : Metal Sorbing Vesicles
MVV : Vésicule encapsulant d'autre vésicules
 M_w : Masse molaire
 $N_{\text{Polymère}}$: degré de polymérisation d'un polymère
PAA : poly(acide acrylique)
PBA : poly(*n*-acrylate de butyle)
PBuO : poly(oxyde de butylène)
PBut : polybutadiène
PCL : polycaprolactone
PDEAEM : poly(diéthyl amino éthyle méthacrylate)
PDMIBM : poly(3,4-diméthyle maleic imidobutyl méthacrylate)

PDMS : poly(diméthylsiloxane)
PDPA : poly(2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate)
PEE : poly(éthyle éthylène)
PEO : poly(oxyde d'éthylène)
PEtOz : poly(ethyl oxazoline)
 P_f : Coefficient de perméabilité à l'eau ($\mu\text{m/s}$)
PGA : poly(acide glutamique)
PI : poly(isoprène)
PIAT : poly3-(isociano-L-alanyl-aminoéthyle) thiophène
PIB : poly(isobutylène)
PLA : poly(acide lactique)
PMOXA : poly(méthylloxazoline)
PMPC : poly((2-méthacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine)
POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero phosphocholine
PS : polystyrène
PTMSPMA : poly(3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate])
 R_H : Rayon hydrodynamique
SUV : Petite Vésicule Unilamellaire (20 – 100 nm)
TEM : microscopie électronique à transmission
 T_g : Température de transition vitreuse
THF : tétrahydrofurane
 T_m : Température de transition coopérative d'une phase lipidique ($^{\circ}\text{C}$)
TMOS : tétraméthyl orthosilicate
 α : déformation de la membrane (%)
 γ : tension interfaciale
 τ : tension de surface

Introduction générale

Introduction générale

Le domaine des nanotechnologies, en plein essor, se place à l'interface entre de nombreuses disciplines. Les applications potentielles sont très variées, tant au niveau de la nanoélectronique (*e.g.* polymères semi-conducteurs), de la nanobiotechnologie (*e.g.* outils de diagnostic et de thérapie) ou des nanomatériaux (*e.g.* nanotubes de carbone). Son impact sur l'économie est très prometteur : à l'horizon 2015, 15% de l'activité manufacturière mondiale sera concernée par des dispositifs ou matériaux utilisant des avancées issues des nanotechnologies. En 2008, le montant du marché mondial est estimé à 500 milliards de dollars et pourrait doubler d'ici 2015.¹

Par ailleurs, les vésicules sont des structures auto-assemblées formant des compartiments clos à l'échelle nanométrique ou micrométrique. Elles présentent de nombreux intérêts pour la nanomédecine, une branche des nanotechnologie, qui étudie la possibilité de les utiliser comme nano-vecteurs multivalents ayant des capacités de ciblage, d'imagerie et de traitement.² Leur capacité à cloisonner des volumes aqueux de différentes compositions et concentrations en fait également des structures adaptées pour des applications en tant que nanoréacteurs.³

Dans ce contexte, il apparaît nécessaire de comprendre en détail les mécanismes permettant de modifier les propriétés membranaires des vésicules en vue d'élaborer des structures fonctionnelles. Un aspect particulièrement important est le contrôle des propriétés de diffusion à travers la membrane qui, dans la continuité des thématiques de recherche des différents partenaires impliqués dans ce projet, est primordial pour la conception et l'étude de réacteurs de minéralisation⁴ et de nanovecteurs pour le transport de principe actifs.⁵

Il existe deux classes de vésicules qui peuvent répondre aux besoins de ces travaux : les liposomes dont les membranes sont constituées de lipides, *i.e.* les amphiphiles constituant les membranes cellulaires, et les polymersomes dont la membrane est formée de copolymères amphiphiles.

De par leur similarité avec les membranes cellulaires, les liposomes sont utilisés comme systèmes modèles pour l'étude de phénomènes biologiques et sont souvent biocompatibles, ce qui en fait de bons candidats pour les applications de vectorisation. On sait également que ce type de structure se rencontre *in vivo* dans les processus de biominéralisation, où elles assurent le transport des particules minérales jusqu'au lieu de minéralisation. Les vésicules lipidiques

souffrent cependant d'une relativement faible tenue mécanique, préjudiciable dans le cadre de notre étude.⁶

Notre intérêt se porte vers les vésicules formées de copolymères amphiphiles, qui présentent généralement des propriétés mécaniques supérieures à celles des liposomes, *e.g.* une membrane plus rigide supportant de plus grandes déformations.⁶ De plus, les outils de la chimie macromoléculaire permettent de maîtriser la nature chimique, l'architecture et la taille des blocs. Cela rend les membranes des polymersomes plus aisément fonctionnalisables ainsi que leurs propriétés mécaniques plus facilement ajustables.

Le premier objectif de ce travail de thèse concerne la synthèse de copolymères à blocs amphiphiles portant des parties hydrophiles adaptées aux besoins des applications de vectorisation ou de minéralisation, le PEO⁷ et le PGA,⁸ et leur auto-assemblage sous forme de vésicules. Les tailles respectives des différents segments de ces copolymères ont été choisies pour maximiser les chances de former ce type de structure.⁹ De plus, les procédés de synthèse sélectionnés permettent de modifier la taille des différents blocs et donc d'apporter un premier niveau de contrôle des propriétés de membrane.

Le second objectif de ce travail est l'obtention de vésicules géantes à partir des copolymères synthétisés, dans le but d'étudier leurs propriétés de membrane ainsi que leur modulation. En plus du « design » moléculaire, la voie retenue pour changer les propriétés de perméabilité est la formulation de la membrane. L'ajout d'ionophores devrait permettre de transporter spécifiquement certains ions à travers la membrane et l'ajout de lipides devrait permettre une modulation définie de l'ensemble des propriétés des membranes vésiculaires.

Le dernier objectif est enfin l'étude de l'évolution de forme des vésicules en réponse à des contraintes osmotiques et en fonction de la nature du copolymère qui compose leur membrane, ce paramètre physico-chimique pouvant présenter un intérêt pour les applications de délivrance contrôlée.

Ce manuscrit s'organise en 5 chapitres. Le premier chapitre correspond à une étude bibliographique résumant les bases de l'auto-assemblage d'amphiphiles en solution et la formation de vésicules. Les propriétés membranaires et structurales de ces objets sont présentées, ainsi que diverses stratégies permettant de les moduler.

Les réactifs, techniques expérimentales et différents appareils utilisés au cours de ces travaux de thèse sont décrits dans le chapitre 2.

Le chapitre 3 résume la synthèse des copolymères amphiphiles sélectionnés pour répondre aux besoins des applications de vectorisation et de minéralisation. Les essais d'auto-assemblage de

ces copolymères sous forme de vésicules *via* différents procédés de formation sont également présentés dans ce chapitre.

La mesure et la modification des propriétés membranaires fait l'objet du chapitre 4. En particulier, l'influence des paramètres moléculaires du copolymère sur la formation de membranes hybrides polymère / lipide est étudiée en établissant un parallèle avec les résultats obtenus pour un copolymère commercial de même nature chimique. L'impact sur la valeur du coefficient de perméabilité à l'eau P_f des vésicules est également étudié. La modification de la perméabilité des vésicules aux espèces ioniques est illustrée à travers des expériences de minéralisation intravésiculaire.

Le dernier chapitre (chapitre 5) décrit l'évolution de la forme des vésicules. L'étude a été menée en appliquant des chocs osmotiques sur des vésicules préparées avec plusieurs copolymères afin de mettre en avant les relations structure de la membrane / évolution de forme. Ces résultats permettent d'anticiper la forme que ces vecteurs vont adopter en conditions physiologiques.

Chapitre 1 :
Etude bibliographique

1 Etude bibliographique

Sommaire Chapitre 1

| | | |
|---------|---|----|
| 1.1 | Auto-assemblage en solution | 7 |
| 1.1.1 | Paramètre d'empilement..... | 8 |
| 1.1.2 | Copolymères amphiphiles | 9 |
| 1.2 | Structures vésiculaires | 11 |
| 1.2.1 | Membranes biologiques..... | 11 |
| 1.2.2 | Classification | 12 |
| 1.2.2.1 | Les liposomes..... | 12 |
| 1.2.2.2 | Les Polymersomes | 13 |
| 1.2.2.3 | Taille de la vésicule et multiplicité de sa membrane | 15 |
| 1.2.3 | Procédés de formation | 15 |
| 1.2.3.1 | Vésicules géantes (GUV)..... | 16 |
| 1.2.3.2 | Vésicules nanométriques..... | 22 |
| 1.3 | Propriétés des vésicules | 23 |
| 1.3.1 | Polymersomes vs. Liposomes..... | 23 |
| 1.3.2 | Particularité des membranes lipidiques : différentes phases | 24 |
| 1.3.2.1 | Influence de la température..... | 24 |
| 1.3.2.2 | Ajout de cholestérol | 26 |
| 1.3.3 | Propriétés mécaniques | 27 |
| 1.3.3.1 | Influence de l'épaisseur de la membrane | 28 |
| 1.3.3.2 | Propriétés mécaniques..... | 30 |
| 1.3.4 | Perméabilité..... | 33 |
| 1.3.4.1 | Paramètres gouvernant la perméabilité | 33 |
| 1.3.4.2 | La pression osmotique..... | 36 |
| 1.3.4.3 | Mesure du coefficient de perméabilité à l'eau – sans forces élastiques..... | 37 |

| | | |
|---------|--|----|
| 1.3.4.4 | Mesure du coefficient de perméabilité à l'eau – avec les forces élastiques | 40 |
| 1.3.5 | Evolution de la morphologie vésiculaire..... | 41 |
| 1.3.5.1 | Interaction avec des systèmes biologiques | 41 |
| 1.3.5.2 | Evolution des morphologies lors d'un choc osmotique..... | 45 |
| 1.3.5.3 | Modèles théoriques | 52 |
| 1.4 | Modification des propriétés de membrane | 55 |
| 1.4.1 | Modification chimique de la membrane | 55 |
| 1.4.2 | Canaux membranaires | 57 |
| 1.4.2.1 | Protéines transmembranaires | 57 |
| 1.4.2.2 | Ionophores | 60 |
| 1.4.3 | Formulation de la membrane : mélange d'amphiphiles..... | 61 |
| 1.4.3.1 | Mélanges polymère / polymère..... | 62 |
| 1.4.3.2 | Mélanges polymère / lipide..... | 64 |
| 1.5 | Conclusion..... | 69 |

Ce premier chapitre redonne les bases de l'auto-assemblage des molécules amphiphiles en solution, avec un intérêt particulier pour les morphologies vésiculaires. Différentes propriétés de ces structures, telles que leurs propriétés mécaniques, leur perméabilité ou encore leur forme sont présentées. L'objectif est de mettre en avant les paramètres sur lesquels il est possible d'influer pour modifier les propriétés de ces assemblages.

Le principe de l'auto-assemblage de molécules amphiphiles dans un milieu aqueux ainsi que différents outils permettant de prédire la morphologie finale sont présentés en partie 1. La classification des structures vésiculaires est détaillée dans la partie 2, ainsi que les procédés de mise en forme généralement utilisés pour les obtenir. Dans la partie 3, les propriétés des vésicules sont décrites en fonction de la nature de leur membrane. L'accent est porté sur la perméabilité à l'eau des membranes et les changements de forme des vésicules car ils sont intimement liés et influencent fortement l'utilisation potentielle de ces systèmes. Finalement, la partie 4 présente des méthodes qui permettent la modification des propriétés de membrane.

1.1 Auto-assemblage en solution

Les molécules amphiphiles sont à la fois constituées d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe (figure 1.1). En solution aqueuse, ces molécules amphiphiles sont solubles jusqu'à la concentration micellaire critique (cmc) au-delà de laquelle elles s'auto-assemblent spontanément, donnant naissance à différents types d'agrégats. Leur assemblage permet, au détriment de l'entropie des chaînes, de minimiser l'interface entre les parties hydrophobes et l'eau, ce qui est thermodynamiquement favorable, tout en laissant les parties hydrophiles au contact de l'eau. Il existe différentes familles d'amphiphiles : les tensioactifs, les lipides (que l'on rencontre dans tous les systèmes biologiques) et les copolymères amphiphiles. Les progrès en synthèse de copolymères ont permis d'accéder à une grande diversité de compositions (unités constitutives des blocs) et d'architectures, ce qui en fait des candidats de choix pour un auto-assemblage « sur mesure » en solution.

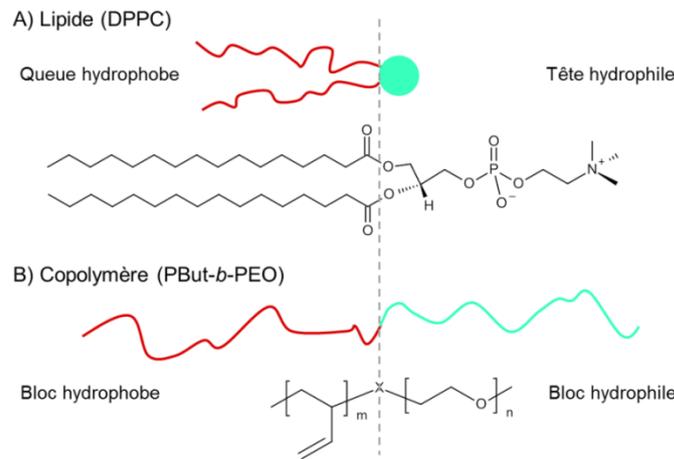


Figure 1.1. Représentations schématique et détaillée des parties hydrophiles et hydrophobes de deux sortes d’amphiphiles : A) un lipide et B) un copolymère à blocs.

1.1.1 Paramètre d’empilement

De nombreuses morphologies peuvent être obtenues par auto-assemblage d’amphiphiles en solution aqueuse. En 1976, Israelachvili, Mitchell et Ninham¹⁰ ont introduit un modèle qui permet de prédire les structures que l’on forme en fonction de la géométrie des lipides utilisés. Un paramètre d’empilement p peut être défini pour chaque molécule amphiphile :

$$p = \frac{v}{l_c \cdot a_0} \quad (1.1)$$

Pour le calcul de ce paramètre, a_0 représente l’aire interfaciale par tête polaire quand l’énergie libre du système est minimale, l_c la longueur étirée et v le volume occupé par la chaîne hydrophobe de l’amphiphile. Ainsi, à chaque géométrie de l’amphiphile correspond une valeur du paramètre d’empilement, qui elle-même indique la morphologie qui sera préférentiellement formée en solution (figure 1.2).

| | Cône | Cône tronqué | Cône tronqué | Cylindre | Cône inversé |
|-------------------------|-------------------|------------------|-----------------------|------------------|------------------|
| Forme du lipide | | | | | |
| $p = \frac{v}{a_0 l_c}$ | $< 1/3$ | $1/3 - 1/2$ | $1/2 - 1$ | ~ 1 | > 1 |
| Assemblage | Micelle sphérique | Micelle allongée | Bicouches (vésicules) | Bicouches planes | Micelle inversée |

Figure 1.2. Structures formées par auto-assemblage dans une solution aqueuse en fonction du paramètre d’empilement p (adapté de¹¹ et basé sur les résultats de¹²).

Au vu des représentations géométriques correspondant aux différentes valeurs du paramètre d'empilement (figure 1.2), il apparaît que ce paramètre peut être assimilé à un moyen de décrire la courbure de l'interface hydrophile/hydrophobe des morphologies formées. Plus l'aire interfaciale par tête polaire est grande (p petit) plus l'interface est courbée, ce qui conduit logiquement vers des structures micellaires dont l'interface hydrophile/hydrophobe est très courbée. Inversement, plus les chaînes hydrophobes sont grandes (p grand) moins l'interface est courbée et l'assemblage tend vers des bicouches planes.

La courbure de l'interface hydrophile/hydrophobe dans l'espace est décrite par la courbure Gaussienne K et la courbure moyenne H , calculées en tout point de l'interface par les rayons de courbure R_1 et R_2 (figure 1.3).

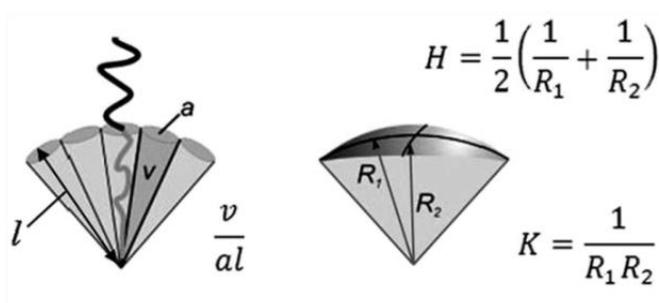


Figure 1.3. Représentation schématique du lien entre le paramètre d'empilement v/al (avec a l'aire interfaciale, v et l respectivement le volume occupé par et la longueur de la chaîne normale à l'interface), la courbure moyenne H et la courbure Gaussienne K .¹³

Le paramètre d'empilement p peut alors être relié à la courbure de l'interface hydrophile / hydrophobe selon la relation¹³ :

$$p = \frac{v}{al} = 1 - Hl + \frac{Kl^2}{3} \quad (1.2)$$

A chaque valeur du paramètre d'empilement correspondent donc des valeurs particulières de courbure. Par exemple, les bicouches planes sont obtenues pour un paramètre d'empilement de 1, c'est-à-dire des valeurs de courbure nulles (rayons R_1 et R_2 infinis).

1.1.2 Copolymères amphiphiles

Cette description géométrique a été étendue aux copolymères amphiphiles diblocs par Ahmed et Discher.⁹ Le paramètre qui permet de prédire la forme des agrégats obtenus lors de l'auto-assemblage est la fraction massique hydrophile f du copolymère amphiphile (figure 1.4). Quand la fraction massique hydrophile $f > 50\%$, le copolymère a une forme de cône, ce qui conduit à la formation de micelles sphériques. En diminuant légèrement la fraction massique hydrophile ($40\% < f < 50\%$), le copolymère adopte la forme d'un cône tronqué et l'agrégat le

plus favorable devient la micelle allongée. Les structures vésiculaires sont obtenues pour $25\% < f < 40\%$. Toutefois, ce modèle n'est qu'empirique et basé sur des observations expérimentales pour des copolymères diblocs flexibles et non chargés. Il est possible que pour des copolymères amphiphiles d'architecture différente (tribloc par exemple) les morphologies obtenues ne soient pas celles prédites par cette règle. C'est également vrai pour des copolymères dont un des blocs est rigide ou chargé.¹⁴

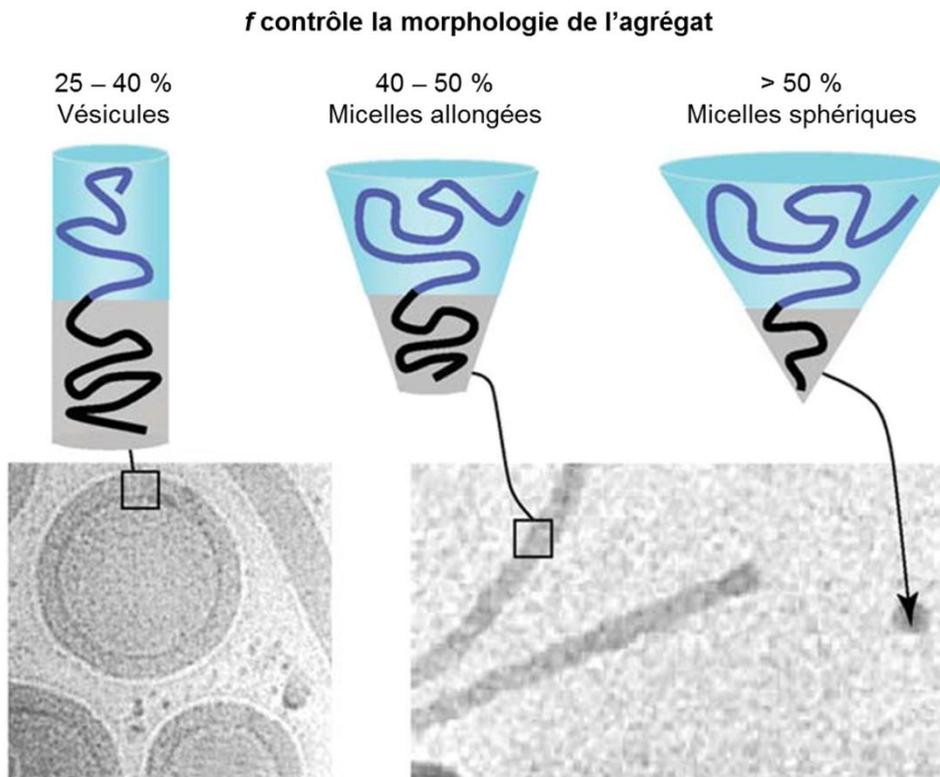


Figure 1.4. Schéma qui représente les différentes fractions massiques hydrophiles pour les copolymères à blocs au regard des morphologies observées - vésicules, micelles allongées et micelles sphériques - en cryo-TEM (adapté de ⁹).

La masse molaire du copolymère semble elle aussi être un paramètre important : les fractions hydrophiles massiques données par Ahmed et Discher sont valables pour des masses molaires allant de 2 000 à 20 000 Da. Jain et Bates¹⁵ ont déterminé des f associées aux changements de morphologie en adéquation avec les valeurs présentées par Ahmed et Discher pour un copolymère PBut-*b*-PEO dont la masse molaire du bloc hydrophobe est $M_{n \text{ PBut}} = 2500$ g/mol ($N_{\text{PBut}} = 46$). Cependant, ils observent que des morphologies intermédiaires telles que des réseaux apparaissent pour des masses molaires plus élevées ($M_{n \text{ PBut}} = 9200$ g/mol, $N_{\text{PBut}} = 170$).

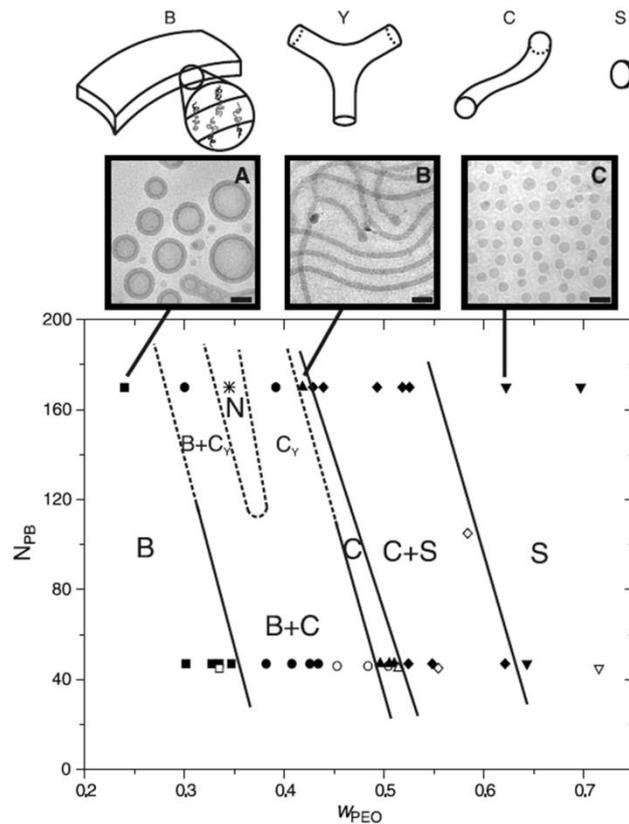


Figure 1.5. Diagramme des morphologies dans l'eau obtenues pour des copolymères diblocs PBut-*b*-PEO en fonction du degré de polymérisation N_{PBut} et de la fraction hydrophile massique f .¹⁵ La concentration massique en copolymère est fixée à 10 mg/mL.

1.2 Structures vésiculaires

Le terme « vésicule » regroupe l'ensemble des structures formées par des membranes refermées sur elles-mêmes. Ces structures forment donc des compartiments qui isolent une partie de la solution aqueuse, encapsulée, du milieu extérieur. On appelle « liposomes » les vésicules dont la membrane est composée d'une ou plusieurs bicouches lipidiques et « polymersomes » les vésicules dont la membrane est composée de copolymères amphiphiles.

1.2.1 Membranes biologiques

Toutes les cellules possèdent une membrane plasmique qui permet de délimiter son espace interne tout en assurant la communication avec le milieu extérieur. Elle permet de réguler le transport d'ions et de molécules, ou encore d'assurer l'équilibre osmotique de la cellule. Ces membranes, formées par une bicouche lipidique (~ 80%) dans laquelle sont insérées de nombreuses protéines fonctionnelles (~20 %), peuvent être considérées comme des fluides complexes bidimensionnels (figure 1.6).

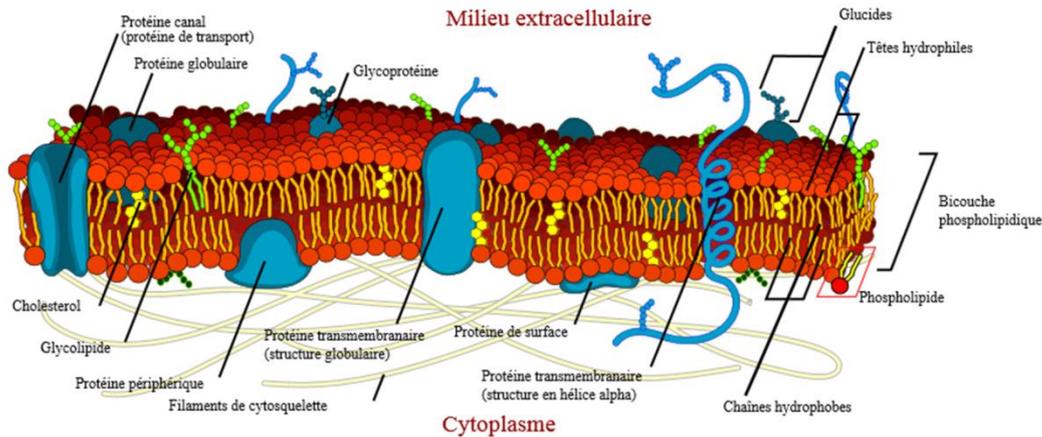


Figure 1.6. Structure schématique d'une membrane biologique.¹⁶

Le domaine hydrophobe de la bicouche lipidique, qui conditionne les propriétés mécaniques de la membrane, est un mélange de nombreux lipides différents (longueur de la chaîne aliphatique, famille de lipide).

1.2.2 Classification

1.2.2.1 Les liposomes

La découverte des vésicules lipidiques est attribuée à Alec Bangham en 1964.¹⁷ La membrane de ces vésicules est composée d'une ou plusieurs bicouches lipidiques, dans lesquelles les lipides sont orientés de manière à ce que les têtes polaires soient en contact avec les milieux aqueux (intérieurs et extérieurs) et les chaînes d'acide gras forment la partie interne de la bicouche lipidique (figure 1.7). L'épaisseur d'une bicouche lipidique varie généralement entre 3 et 5 nm.¹⁸

De par leur similarité avec les membranes cellulaires, les liposomes sont utilisés comme systèmes de membranes modèles. Ils permettent l'étude des propriétés physiques de lipides individuels ou de mélanges de lipides, simplifiant grandement l'étude par rapport aux membranes biologiques complexes. Aussi, de nombreux phénomènes biologiques impliquent des étapes de bourgeonnement, fusion et fission de la membrane. Grâce à la faible masse molaire des lipides, les bicouches lipidiques présentent souvent un état fluide et autorisent l'étude de tels événements.¹⁹ En revanche, ce ne sont que des « approximations » des phénomènes qui se produisent dans la nature, les membranes cellulaires étant des systèmes trop complexes pour être appréhendés dans leur globalité de nos jours.

Les liposomes sont également utilisés en tant que vecteurs pour la délivrance de principes actifs.²⁰ En effet, les lipides sont totalement biocompatibles et la morphologie vésiculaire permet d'encapsuler des substances actives tant hydrophiles qu'hydrophobes, respectivement

dans le milieu intravésiculaire ou au cœur de la phase lipidique (domaine hydrophobe de la bicouche). Cependant, ces systèmes souffrent souvent d'une faible tenue mécanique et il est difficile de leur conférer des propriétés de ciblage, leur modification chimique n'étant pas aisée.

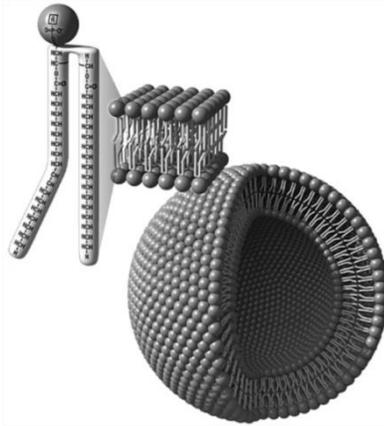


Figure 1.7. Représentation schématique d'un liposome unilamellaire.²¹

1.2.2.2 Les Polymersomes

1.2.2.2.1 Définition

Ces structures, obtenues pour la première fois en 1995 par l'équipe d'Eisenberg,²² sont des vésicules dont les membranes sont formées par l'auto-assemblage de copolymères amphiphiles en solution. Bien qu'on les considère comme les analogues des vésicules lipidiques, ce que souligne le terme « polymersome », la comparaison de leurs propriétés membranaires avec les liposomes²³ a montré que ces vésicules sont bien plus robustes. Cette différence est principalement due à la masse molaire des amphiphiles qui constituent la membrane : les liposomes sont essentiellement formés par des phospholipides, dont la masse molaire avoisine 1kDa, alors que les polymersomes peuvent être issus de l'auto-assemblage de copolymères de masses bien plus élevées. Les membranes formées sont ainsi plus épaisses, il y a plus d'interactions van der Waals donc une plus grande cohésion intermoléculaire.

En plus d'étendre la gamme de propriétés mécaniques des liposomes, un autre avantage des polymersomes sur les vésicules lipidiques est le grand nombre de blocs synthétisables grâce aux outils de synthèse aujourd'hui développés. Cela permet de concevoir « en théorie » avec précision tant l'architecture du copolymère que la nature chimique des différents blocs et ainsi ajuster les propriétés en fonction de l'application visée. Pour une vue plus complète des différents procédés de synthèse ainsi que des différents blocs qui permettent l'auto-assemblage sous forme de vésicules, le lecteur pourra se référer à des ouvrages spécialisés.²⁴

1.2.2.2 Applications

Les bénéfices apportés par la nature polymère de la membrane couplés aux avantages de la morphologie vésiculaire font des polymersomes de sérieux candidats pour des applications de vectorisation de principes actifs. La membrane de ces transporteurs étant très cohésive, de nombreux moyens ont été mis au point pour les déstabiliser de manière contrôlée. Des vésicules polymères dont la membrane est sensible à divers stimuli tels que le pH, la température, les conditions d'oxydo-réduction ou encore la lumière ont ainsi été développées.^{5, 25, 26} Il est également possible de fonctionnaliser leur surface pour cibler des zones spécifiques ou encore introduire des agents de contraste IRM dans la membrane.²

Les polymersomes sont aussi utilisés en tant que micros et nano-réacteurs, car ils permettent de confiner un milieu réactionnel (milieu intravésiculaire),^{3, 4, 27} ou comme membranes modèles pour des études de comportement cellulaire.²⁸ Par exemple, des protéines transmembranaires ont été introduites dans les membranes de polymersomes^{29, 30} ou des structures hiérarchisées qui imitent la structure des cellules ont été réalisées.³¹

1.2.2.3 Membranes

A la différence des membranes des liposomes, les membranes des vésicules polymères ne sont pas systématiquement des bicouches d'amphiphile. Seuls les copolymères diblocs de type AB forment des polymersomes dont la membrane est une bicouche au sens littéral, mais les membranes auto-assemblées de polymères ne sont pas exclusivement obtenues avec ce type de copolymère linéaire (figure 1.8). De nombreux articles rapportent la formation de vésicules stables à partir de copolymères triblocs symétriques ABA³² ou asymétriques ABC,³³ de mélanges binaires AB et BC³⁴ ainsi que de copolymères amphiphiles non-linéaires tels que des dendrimères ou des copolymères greffés.^{35, 36} Pour faciliter la lecture de ce chapitre, nous n'allons considérer par la suite que les membranes formées de bicouches (lipidiques ou de copolymères diblocs).

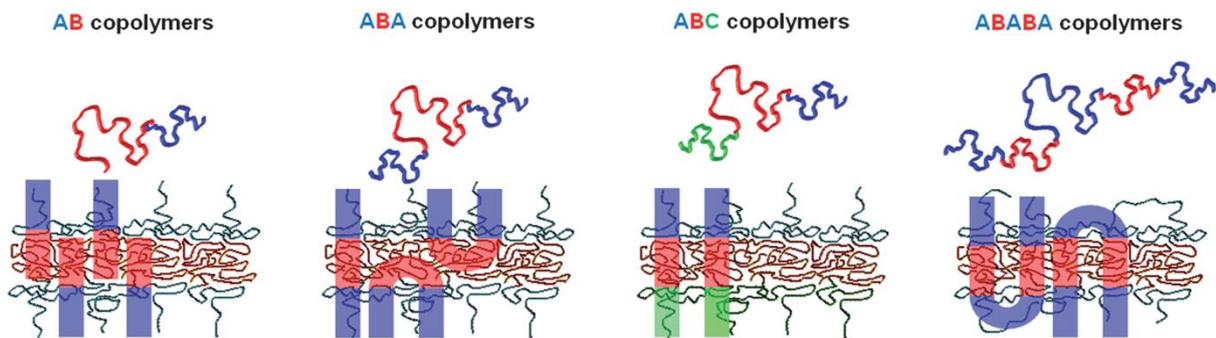


Figure 1.8. Représentation schématique de conformations de membrane composées de copolymères de différentes architectures.³⁷

1.2.2.3 Taille de la vésicule et multiplicité de sa membrane

Il y a différentes notations pour désigner les vésicules (liposomes et polymersomes confondus) en fonction de leur taille et de la multiplicité de leur membrane. Les vésicules dont la membrane est unilamellaire (deux monocouches) sont usuellement séparées en trois catégories : les vésicules de très faible diamètre ou « Small Unilamellar Vesicles » (SUV : 20 – 100 nm), celles dont le diamètre est plus élevé sont appelées « Large Unilamellar Vesicles » (LUV : 100 nm – 1 μm), et les vésicules géantes ou « Giant Unilamellar Vesicles » (GUV : >1 μm).

Les « MLV » sont les vésicules dont la membrane est multilamellaire, c'est-à-dire une succession de bicouches lamellaires séparées par une couche aqueuse (figure 1.9). Il est possible de transformer les vésicules multilamellaires en vésicules unilamellaires de plus petite taille en leur fournissant un apport conséquent en énergie. Expérimentalement, des SUV sont formées quand cette énergie est apportée *via* des ultrasons et des LUV sont formées par extrusion des MLV à travers des membranes en polycarbonate dont la taille des pores est d'une centaine de nanomètres.³⁸

Le terme « MVV » désigne quant à lui les « Multivesicular Vesicles », qui sont des vésicules encapsulées dans d'autres vésicules.

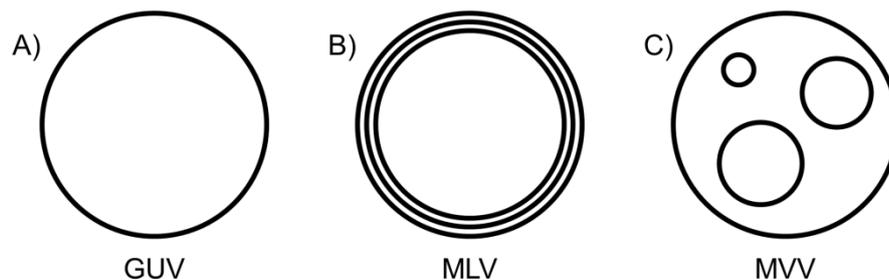


Figure 1.9. Représentation schématique A) d'une vésicule unilamellaire (GUV), B) d'une vésicule multilamellaire (MLV) et C) d'une vésicule encapsulante d'autres vésicules (MVV).

En général, les structures vésiculaires ne sont pas thermodynamiquement stables mais cinétiquement piégées pour un laps de temps pouvant aller jusqu'à plusieurs semaines.^{9, 12}

1.2.3 Procédés de formation

La méthode de préparation des structures auto-assemblées en solution est une étape importante. Comme vu partie 1.1.2, la morphologie à l'équilibre thermodynamique des objets obtenus par auto-assemblage dépend essentiellement de la fraction massique hydrophile et des interactions moléculaires des amphiphiles (plus précisément de l'aire par amphiphile et la tension interfaciale). Cependant, un procédé de formation peut conduire à des objets figés

cinétiquement dans une morphologie loin de l'équilibre thermodynamique. Aussi, en fonction du procédé de formation utilisé, des objets de même morphologie mais de taille très différente peuvent être obtenus.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, il a été nécessaire de former des vésicules aux échelles micrométriques et nanométriques. L'objectif de cette partie est de donner une vue d'ensemble de méthodes de formation permettant de former des vésicules à diverses échelles. Les recherches sur les vésicules lipidiques ayant précédé les travaux sur les polymersomes d'une trentaine d'années, de nombreuses procédures de formation ont été développées pour la formation de liposomes.

1.2.3.1 Vésicules géantes (GUV)

1.2.3.1.1 Réhydratation de films

La réhydratation de films est, historiquement, une des premières méthodes décrites pour former des vésicules géantes. Dès 1969, Reeves et Dowben ont décrit la préparation de vésicules géantes d'Egg yolk phosphatidylcholine (EPC) suivant cette méthode.³⁹

La première étape du protocole à suivre pour cette procédure est la formation de films minces de lipides, à partir d'une solution dans un solvant organique, sur un substrat plat. Cela permet, dans une certaine mesure, de préformer des bicouches sèches. L'ajout de la solution de réhydratation par la suite entraîne la réhydratation progressive des couches et, au fur et à mesure que l'eau pénètre entre les bicouches lipidiques superposées, leur gonflement (figure 1.10).

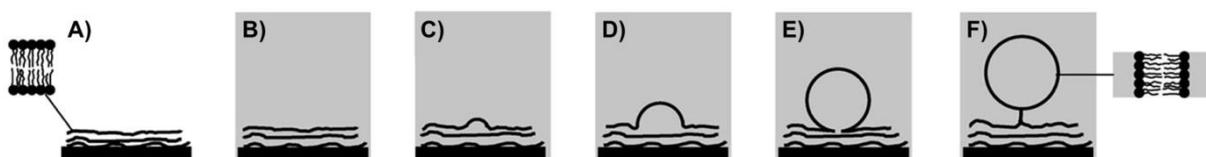


Figure 1.10. Représentation de la formation de vésicules géantes par réhydratation contrôlée d'un film de lipide (qui forme des bicouches) déposé sur un substrat solide.⁴⁰

En plus d'utiliser des amphiphiles qui s'auto-assemblent sous forme de bicouches flexibles en solution, il faut respecter certaines conditions expérimentales pour maximiser les chances de former des GUV. Il est très important de ne pas perturber le système pendant la réhydratation, car cela entraînerait la formation de fragments de membrane qui se refermeraient en MLV dans la solution. Il faut également que le film de lipide soit homogène et ne soit pas trop épais.⁴⁰

Une des forces de cette méthode est qu'elle permet de former des vésicules géantes en présence de concentrations en sels élevées, jusqu'à 2M. En revanche, cette technique ne permet pas de former des vésicules avec tous les amphiphiles et les temps de formation sont souvent

très longs (plusieurs dizaines d'heures). De plus, la majorité des vésicules formées sont multilamellaires, les tailles obtenues sont généralement polydisperses,⁴¹ et l'encapsulation de grosses molécules hydrosolubles (les enzymes par exemple) ou de composants chargés donne de mauvais résultats. Il est possible d'avoir une efficacité d'encapsulation qui varie beaucoup d'une vésicule à l'autre au sein d'un même échantillon.⁴²

La modification du substrat sur lequel le film d'amphiphiles est préparé avant la réhydratation résous partiellement les problèmes rencontrés avec cette méthode. Howse *et al.* ont ainsi montré qu'en utilisant une surface ayant des motifs sur lesquels les amphiphiles s'adsorbent sélectivement (régions hydrophiles de forme carré séparées par des zones fluorocarbonées) il est possible de diminuer la polydispersité en taille des vésicules formées. En effet, les dimensions des films de PEO-*co*-PBuO (poly(oxyde d'éthylène)-*co*-poly(oxyde de butylène)) qui se gonflent lors de la réhydratation sont limitées à la taille des motifs, ce qui contrôle le diamètre final des vésicules.⁴³ La réhydratation de films de lipides sur un gel de PVA permet quant à elle la formation très rapide de GUV (quelques minutes), y compris avec des amphiphiles qui donnent de mauvais résultats avec les techniques de réhydratation classiques (*e.g.* les lipides chargés).⁴⁴ Les taux d'encapsulation de petites molécules hydrophiles peuvent également être améliorés en les pré-dissolvant dans le gel de PVA. Cette méthode ne nécessite pas d'apport d'énergie supplémentaire, ce qui permet de s'assurer qu'il n'y a pas de dégradation des différents composants.

1.2.3.1.2 Electroformation

Cette méthode a été développée pour résoudre certains problèmes rencontrés lors de la formation de vésicules géantes unilamellaires par réhydratation de films : la multilamellarité des membranes, le temps de formation souvent très long, ou une formation impossible par simple hydratation. En effet, pour utiliser les liposomes en tant que modèles de membranes cellulaires, il faut s'assurer que leurs membranes sont unilamellaires.

La méthode d'électroformation, initialement publiée par Angelova et Dimitrov en 1986,⁴⁵ consiste à appliquer un courant alternatif (AC) ou continu (DC) pendant le gonflement de films de lipides entre deux électrodes dans un milieu aqueux. Ce procédé permet de former des vésicules unilamellaires géantes (prouvé par des mesures d'élasticité de courbure⁴⁶ et par microscopie électronique⁴⁷) avec de nombreux amphiphiles, dont les lipides et les copolymères à blocs.⁴⁸

Les films d'amphiphiles sont préparés sur la surface d'électrodes, souvent des lames de verre recouvertes d'une couche d'ITO ou des fils de platine. Ces électrodes sont ensuite

immergées dans la solution de réhydratation et un champ électrique externe, dont les conditions optimales sont trouvées au cas par cas (typiquement un signal sinusoïdal d'amplitude 1-7 V et de fréquence 10 Hz), est appliqué progressivement. La formation prend ensuite environ 2 heures, et il est conseillé de réduire la fréquence à 0,5 Hz pendant la dernière minute : cela aide les vésicules « matures » à devenir sphériques et se détacher du film.

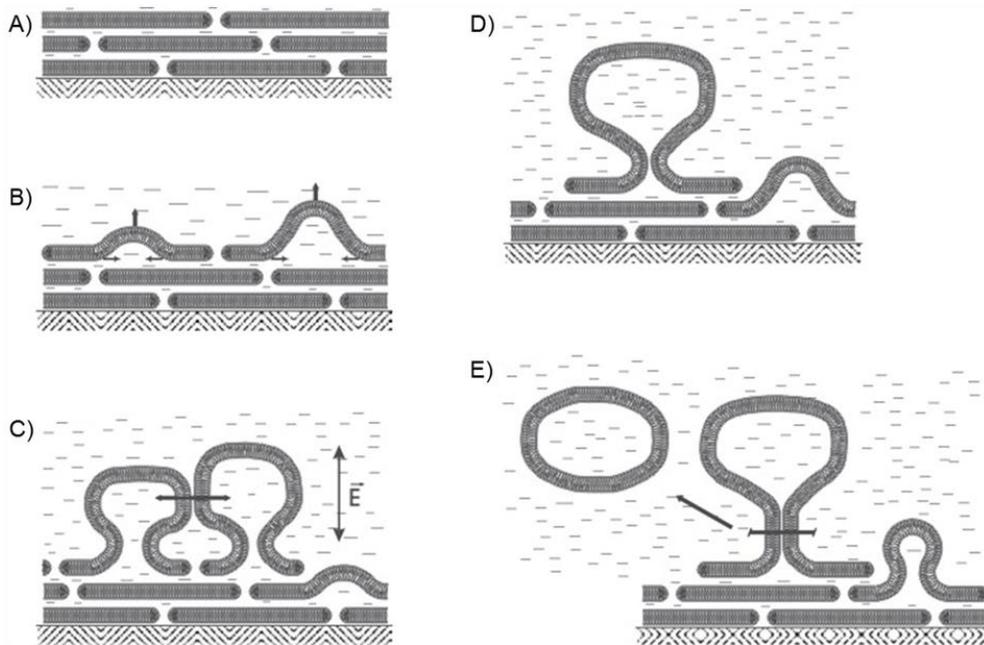


Figure 1.11. Schéma de la croissance d'une vésicule pendant l'électroformation (adapté de⁴⁸)

L'intérêt d'appliquer un champ électrique est qu'il induit un mouvement d'oscillation périodique du milieu de réhydratation au niveau de l'interface eau – électrode sur laquelle le film est déposé (figure 1.11.A). Ces mouvements d'oscillation électroosmotiques, qui se traduisent par des vibrations mécaniques, sont perpendiculaires à la surface de l'électrode et aident les bicouches préformées à s'éloigner de la surface (B). Les bourgeonnements qui en résultent grandissent jusqu'à atteindre une taille de 10-20 μm de diamètre (même ordre de grandeur que pour la réhydratation de film). A partir de ce stade, les vésicules en croissance entrent en contact (C) et fusionnent (D), ce qui permet d'atteindre des gammes de taille très élevées. Les vésicules obtenues après fusion redeviennent sphériques en quelques minutes et peuvent éventuellement se détacher du film (E).⁴⁸ Les vibrations électroosmotiques pendant la formation confèrent un excès de membrane aux vésicules (elles sont déformées), il leur faut quelques heures pour relaxer leurs contraintes et retrouver une forme sphérique suite à la formation.

La solution d'amphiphiles utilisée pour préparer le film sur l'électrode a une influence sur la qualité des GUV formées. En général, pour des lipides, le mélange de solvant est un mélange 9 :1 chloroforme / méthanol ou diéthyléther / méthanol, et la concentration en amphiphile varie entre 0,2 et 1,6 mg.ml⁻¹. Il est important d'avoir un mélange de solvant qui mouille bien la surface de l'électrode et une concentration massique assez faible pour ne pas former un film trop épais. En effet, il y a une épaisseur optimale pour former des GUV, les films trop fins ou trop épais n'aboutiront à aucun résultat. Pour cette raison, la méthode de formation du film est elle aussi importante. Estes et Mayer indiquent que les meilleurs résultats sont obtenus quand les films sont préparés par spin-coating, car cela permet d'avoir des films fins et homogènes.⁴⁹ Malheureusement cette technique consomme beaucoup de produit, c'est pourquoi on lui préfère souvent le dépôt de gouttes. Même si le film n'est pas homogène, une gamme importante d'épaisseurs est couverte et il y a forcément des zones adaptées à la formation de GUV.

L'électroformation permet de former des vésicules géantes unilamellaires plus grosses en un temps bien plus court (quelques heures) que la réhydratation de film. De plus, il est possible d'observer les vésicules en croissance pendant leur préparation. Comme pour la réhydratation de film, l'encapsulation de molécules hydrosolubles est globalement faible.

Le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle ne donne pas de très bons résultats quand le milieu de réhydratation contient des sels (> 15 mM).⁴ Dans ces conditions le flux électroosmotique est plus faible, et les ions s'intercalent entre les feuillettes de lipides lors de leur gonflement, ce qui défavorise leur séparation du film.⁵⁰ Il est également possible qu'une partie des composés présents dans la cellule d'électroformation se dégradent sous l'application du champ électrique externe.

1.2.3.1.3 Emulsion double - évaporation

Un autre moyen utilisé pour former des vésicules est l'utilisation d'émulsions doubles eau dans solvant organique dans eau (simplifié par (W/O)/W par la suite) comme architecture pour conduire l'assemblage. Le principe est le suivant : les copolymères à blocs sont solubilisés dans une phase organique volatile puis mélangés à une phase aqueuse pour former une émulsion W₁/O. Cette émulsion est ajoutée à une deuxième phase aqueuse, qui peut être différente, et mélangée pour former l'émulsion double (W₁/O)/W₂. Les copolymères diblocs, solubilisés dans la couche intermédiaire, stabilisent les interfaces concentriques de l'émulsion double : la partie hydrophobe (en bleu sur la figure 1.12) reste dans la couche de solvant organique et la partie hydrophile (en rouge) se place dans les milieux aqueux. Le solvant organique est ensuite

progressivement retiré de cette émulsion double par évaporation. La couche organique s'affine au fur et à mesure que le solvant s'évapore, jusqu'à ce que les blocs hydrophobes des copolymères entrent en contact et forment le cœur hydrophobe de la membrane du polymersome.⁵¹

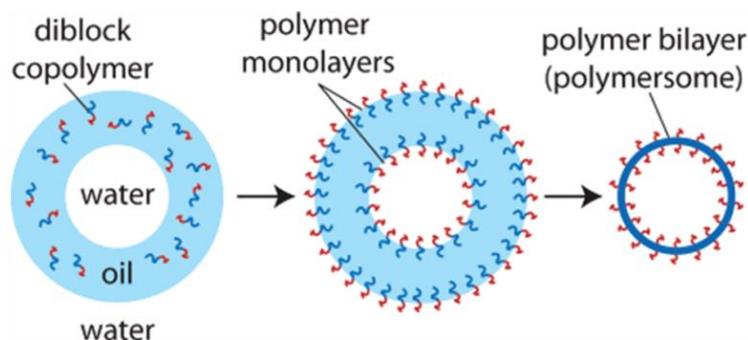


Figure 1.12. Représentation schématique de la formation d'un polymersome à partir d'une goutte d'émulsion double.⁵²

Il est donc important que le solvant solubilise parfaitement le copolymère, pour stabiliser l'interface efficacement, qu'il soit assez volatile pour être facilement retiré par évaporation et que sa tension interfaciale avec l'eau soit assez importante pour former des gouttes.

Un procédé élégant pour former des vésicules polymères en se basant sur ce principe est l'utilisation d'un montage microfluidique.⁵³ Cela permet la préparation d'une émulsion double en une seule étape, contrairement aux méthodes plus conventionnelles qui impliquent deux étapes principales, et conduit à la formation de polymersomes géants de taille homogène tout en assurant un taux d'encapsulation très élevé.

Ce type de montage microfluidique, utilisé pour la première fois en 2005 pour former des polymersomes de PBA-*b*-PAA (poly(*n*-acrylate de butyle)-*b*-poly(acide acrylique)), fonctionne comme suivant : deux tubes de section circulaire sont imbriqués dans un troisième capillaire de section carré (figure 1.13). La solution aqueuse contenue dans la goutte interne circule dans le tube d'injection, alors que la solution organique qui forme la couche intermédiaire et contient le copolymère à bloc circule dans le même sens mais autour de ce tube. Dans le même temps, la solution aqueuse représentant la phase continue arrive dans la direction opposée, autour du tube de collection. Au point de jonction de ces fluides, la solution qui joue le rôle de phase externe change de direction et passe avec les deux autres fluides à travers l'embout du tube de collection. Cette ouverture étant très étroite, des gouttes se forment. La taille des gouttes, qui contrôle la taille des polymersomes, peut être ajustée par la taille de l'ouverture.

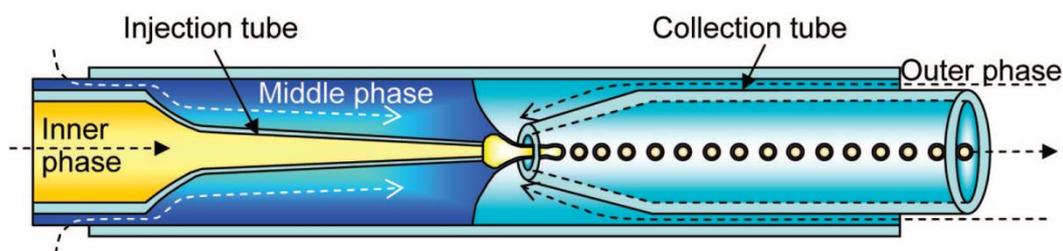


Figure 1.13. Schéma du système microfluidique permettant de former une émulsion double.

Le nombre de compartiments intravésiculaire de chaque polymersome peut également être contrôlé *via* le nombre de gouttes internes encapsulées dans la goutte de solvant organique avant évaporation.^{54, 55}

Un dernier avantage est que cette technique, où la formation des vésicules est gouvernée par l'émulsion double, permet de former des polymersomes avec des copolymères dont la fraction hydrophile ne permet à priori pas de former ce type de structures.⁵⁶ La seule condition est que le copolymère permette de stabiliser l'émulsion double. Il est même possible d'ajouter de l'homopolymère dans la membrane, et ainsi modifier ses propriétés, tant que cette condition est vérifiée.

La principale limitation est la qualité des membranes formées. En effet, il est possible que celles-ci retiennent une partie du solvant organique et des inhomogénéités d'épaisseur de membrane ont été relevées. Ces inhomogénéités peuvent être évitées en ajustant très précisément la concentration en copolymère de la couche organique.⁵² Néanmoins, cette étape est délicate : si la concentration en copolymère est trop basse l'interface n'est pas stabilisé et les polymersomes ne se forment pas ; mais si elle est trop élevée, on observe un phénomène de démouillage quand le solvant organique s'évapore, ce qui concentre l'excès de matière sur un côté de la vésicule et forme un « patch ». Ce phénomène est dû à une déplétion entre les interfaces W/O internes et externes à cause de la présence d'un excès de copolymères dans la phase organique.⁵²

1.2.3.1.4 Emulsion-centrifugation

Une autre classe de procédés qui permettent de former des vésicules géantes est l'émulsion-centrifugation. Le principe est de former une émulsion inverse W/O stabilisée par un amphiphile (première couche), puis de forcer les gouttes de cette émulsion à passer à travers une interface O/W elle aussi saturée en amphiphile (ajout de la deuxième couche d'amphiphile de la membrane). Dans la méthode de transfert d'une émulsion W/O,⁵⁷ une émulsion inverse préalablement formée est placée au-dessus d'une phase aqueuse et c'est la sédimentation des gouttes qui leur fait traverser l'interface. Cette méthode est assez lente mais permet de faire des

bicouches asymétriques. La méthode développée par Massiera *et al.*⁵⁸ permet de former beaucoup plus de vésicules car on force par centrifugation des gouttes à traverser successivement une solution saturée en lipides et une interface avec une solution aqueuse. Il n'est en revanche pas possible de former une membrane asymétrique avec cette deuxième technique. Comme pour les méthodes utilisant une émulsion double, le taux d'encapsulation obtenu est proche de 100%.

Les méthodes indiquées jusqu'ici sont celles les plus couramment utilisées pour former des vésicules géantes. Pour plus d'informations concernant des techniques moins souvent rencontrées, telles que la fusion de LUV, le lecteur pourra se référer à des revues spécialisées.⁴⁰

1.2.3.2 Vésicules nanométriques

Une première possibilité pour former des vésicules à l'échelle nanométrique est, comme expliqué dans la partie 1.2.2.3, de fournir de l'énergie à des vésicules multilamellaires pour les transformer en vésicules unilamellaires de plus petite taille. D'autres procédures couramment utilisées sont brièvement décrites dans cette partie.

1.2.3.2.1 *Dissolution directe*

C'est la méthode la plus simple, qui consiste à solubiliser directement l'amphiphile (avec ou sans agitation) dans une solution aqueuse au-dessus de sa concentration micellaire critique. L'auto-assemblage se fait alors progressivement, au fur et à mesure de la dissolution. Plusieurs paramètres peuvent avoir une influence sur les structures obtenues, telle que la température (T_g pour les copolymères et T_m pour les lipides), la présence de co-solvants ou encore la concentration.⁵⁹ Les vésicules obtenues avec cette méthode ont en général une large gamme de tailles et les membranes ne sont pas unilamellaires. Néanmoins cette technique n'est envisageable qu'avec les amphiphiles présentant une hydrophobicité modérée et une fluidité assez élevée à température ambiante.

1.2.3.2.2 *Nanoprécipitation*

Le point de départ de ce procédé est une solution de copolymère complètement dissous dans un solvant organique miscible à l'eau. Une solution aqueuse, qui est un solvant sélectif de l'amphiphile, est alors progressivement ajoutée dans la solution d'amphiphile. Quand les deux phases sont en contact, le solvant organique diffuse vers la phase aqueuse, ce qui diminue petit à petit la solubilité du copolymère. Les blocs hydrophobes de l'amphiphile commencent alors à s'agréger, ce qui déclenche l'auto-assemblage. Passé une certaine fraction en eau, tous les copolymères sont assemblés et les morphologies sont figées cinétiquement. Cette méthode

dépend donc des différentes interactions qui existent entre le solvant organique, l'eau et l'amphiphile.⁶⁰ Il est possible de contrôler l'assemblage en jouant sur des paramètres expérimentaux (la manière de mélanger, l'ordre et la vitesse d'ajout...) qui modifient ces interactions.⁶¹ Ce procédé est plus reproductible que la dissolution directe et permet un meilleur contrôle des tailles et des morphologies.

1.2.3.2.3 Emulsion double - évaporation

De manière similaire au procédé de formation de vésicules géantes, des émulsions doubles peuvent être utilisées pour former des vésicules nanométriques. Le principe est le même, une émulsion eau dans solvant organique dans eau stabilisée par un amphiphile est préparée puis le solvant organique est retiré. En revanche, l'émulsion n'est pas préparée à l'aide d'un système microfluidique mais par des méthodes plus conventionnelles comme une sonde à ultrasons. La taille des vésicules nanométriques ainsi formée peut être homogénéisée par la suite avec des méthodes comme l'extrusion.

1.3 Propriétés des vésicules

1.3.1 Polymersomes vs. Liposomes

Il y a principalement deux catégories de vésicules obtenues par auto-assemblage d'amphiphiles : les vésicules lipidiques et les vésicules polymères. La comparaison de leurs propriétés de membranes, tels que la rigidité de courbure k_c , la déformation à la rupture α_c ou le coefficient de perméabilité à l'eau P_f , a montré que les polymersomes sont plus robustes et moins perméables.²³ Cette stabilité accrue est attribuée à l'épaisseur de la membrane, bien plus élevée pour les vésicules polymères (10-50 nm) que pour les vésicules lipidiques (3-5 nm). Le tableau 1.1 récapitule les lois d'échelle qui régissent les différents paramètres de membrane de ces systèmes et donne un ordre de grandeurs de ces paramètres.

| | Liposomes | Polymersomes | Loi d'échelle |
|---|-----------------------------|----------------------------------|---|
| Rigidité de courbure (kT) | 11 – 30 ⁽⁶²⁾ | 40 – 460 ^(63, 64) | $d \sim 2$ ⁽⁶³⁾ |
| Module élastique (mN/m) | 250 ± 2 ⁽⁶²⁾ | 80 – 100 ⁽⁶⁵⁾ | $d \sim 0$ ⁽⁶⁵⁾ |
| Déformation à la rupture (%) | 5 ⁽⁶⁵⁾ | 20 – 50 ⁽⁶⁵⁾ | $d \sim 1,6$ (pour $M < M_c$) ⁽⁶⁵⁾ |
| Epaisseur de membrane (nm) | 3 – 5 nm ⁽¹⁸⁾ | 10 – 50 nm ⁽⁶⁵⁾ | $M \sim 0,55$ ^(65, 66) ou $M \sim 0,66$ ⁽⁶⁷⁾ |
| Coeff. de perméabilité à l'eau ($\mu\text{m/s}$) | 25 – 150 ⁽²³⁾ | 0,7 – 10 ⁽⁵³⁾ | $d \sim -1$ ⁽⁶⁸⁾ |
| Coeff. de diffusion latérale ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) | 3,8 ⁽⁶⁹⁾ | 0,12 – 0,0024 ⁽⁶⁹⁾ | Rouse ⁽⁶⁹⁾ |

Tableau 1.1. Comparaison des paramètres de membrane entre les liposomes et les polymersomes, adapté de ⁶.

1.3.2 Particularité des membranes lipidiques : différentes phases

1.3.2.1 Influence de la température

De nombreux phospholipides présentent une transition de phase dans la membrane lorsque la température augmente. Cette transition correspond au passage d'une phase gel, appelée « L_β » si les chaînes carbonées sont perpendiculaires à la bicouche lipidique ou « L_β' » si elles forment un angle par rapport à la normale à la bicouche lipidique (« tilt angle »), vers une phase cristal-liquide lyotrope appelée « L_α ». Les techniques d'analyse qui permettent d'étudier ces transitions sont principalement la calorimétrie différentielle à balayage, la résonance magnétique nucléaire, la diffusion dynamique de la lumière et la diffraction des rayons X.

Cette transition est liée aux mouvements de rotation possibles autour des liaisons C-C des chaînes carbonées qui forment la partie hydrophobe des lipides. Les chaînes aliphatiques peuvent donc adopter différentes conformations :

- la conformation *trans*, l'état le plus stable et de plus faible énergie (figure 1.14.A)
- la conformation gauche, qui correspond à un état d'énergie plus élevée (figure 1.14.B)

Il est également possible que les chaînes carbonées contiennent des insaturations en configuration *cis*.

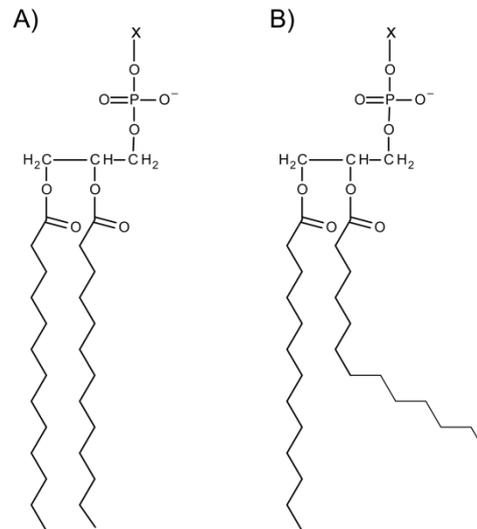


Figure 1.14. A) Phospholipide en configuration tout-*trans* et B) avec une liaison gauche.

A faible température les chaînes carbonées sont majoritairement en conformation *trans* et les lipides se compactent dans la membrane pour former une phase gel (figure 1.15). Les chaînes, parallèles les unes aux autres, sont en extension et pour certaines familles de lipides (*e.g.* les phosphatidylcholines) elles ont un « tilt angle » d'environ 32° . En chauffant le système, la probabilité de passer de la conformation tout-*trans* à gauche augmente. Au-dessus de la température de pré-transition T_{pr} , une partie des chaînes carbonées présentent une conformation gauche, ce qui perturbe l'empilement des lipides. Le « tilt angle » disparaît et des ondulations périodiques (« ripples ») apparaissent à la surface des liposomes. En continuant de chauffer jusqu'à une température limite T_m , on observe une transition coopérative des lipides correspondant à la fusion coopérative des phases gel pour former une phase cristal-liquide désordonnée L_α .

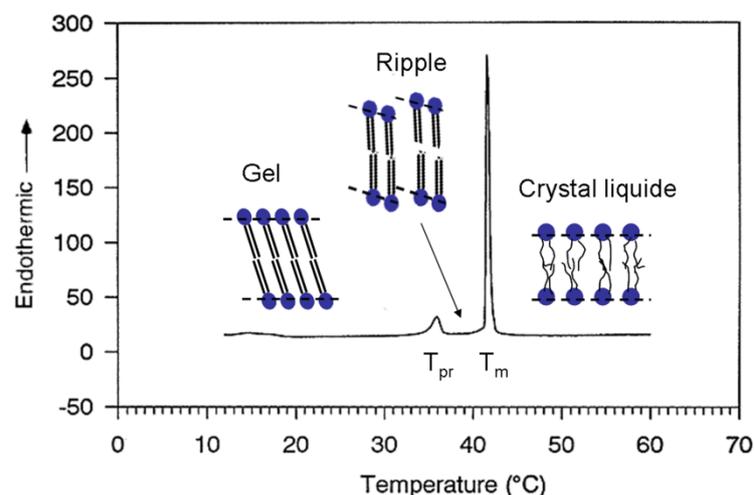


Figure 1.15. Thermogramme d'une membrane lipidique et phase lipidique correspondante.

La transition de phase s'accompagne d'une modification des paramètres physiques de la membrane, qui a été quantifiée précisément grâce au couplage de la diffraction des rayons X aux grands angles et des simulations de dynamique moléculaire.^{70, 71} En phase gel les chaînes sont étirées donc la bicouche est plus épaisse. Les têtes polaires sont relativement immobiles et la région interfaciale de la double couche est partiellement déshydratée. La transition vers la phase cristal-liquide désordonnée L_α s'accompagne d'une augmentation du volume occupé par lipide dans la membrane car les chaînes carbonées sont moins étirées. Cela entraîne une diminution de l'épaisseur de membrane et une augmentation de l'aire par tête polaire.

De manière générale, tout ce qui s'oppose à l'expansion latérale des lipides s'oppose à la transition coopérative. Plus les chaînes carbonées sont longues, plus il y a d'interactions hydrophobes entre les lipides donc plus la température de transition coopérative T_m est élevée. Le nombre d'insaturations de la chaîne carbonée impacte également la T_m puisque les insaturations en configuration *cis* provoquent des coudes qui défavorisent les interactions entre les lipides.

Le changement de phase des membranes lipidiques entraîne un changement brusque des propriétés de la membrane. Les phases gel sont généralement figées et imperméables, au contraire des phases cristal-liquide désordonnées L_α qui sont fluides et perméables. De plus, la membrane présente un pic de perméabilité au niveau de la transition coopérative à cause de la présence d'interfaces entre des clusters de phase gel et de phase cristal-liquide.⁷²⁻⁷⁴ De manière générale, les propriétés des liposomes sont caractérisées au-dessus de la T_m .

1.3.2.2 Ajout de cholestérol

L'ajout de cholestérol dans les phases lipidiques peut entraîner l'apparition d'une phase lamellaire supplémentaire, la phase cristal-liquide ordonnée L_o . En fonction de la fraction molaire en cholestérol, les membranes présentent alors une séparation de phase entre des domaines riches en cholestérol, en phase cristal-liquide ordonnée L_o , et des domaines pauvres en cholestérol sous forme cristal-liquide désordonnée L_α ou en phase gel (figure 1.16).^{75, 76}

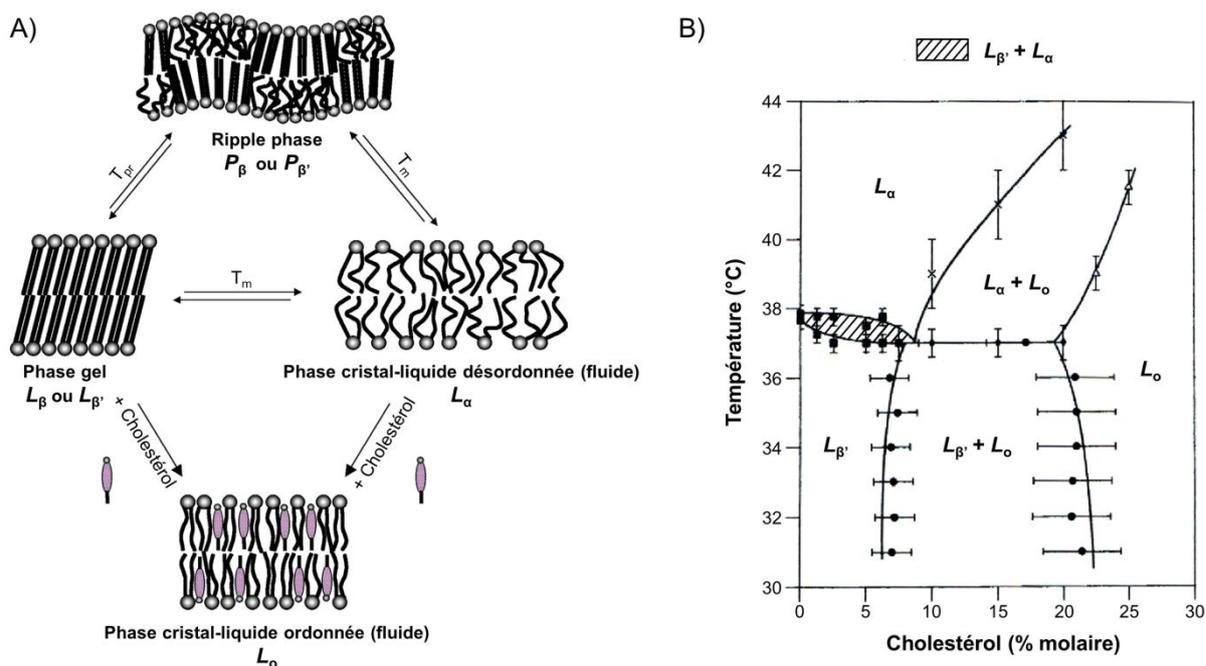


Figure 1.16. A) Schéma illustrant les différents états physiques adoptés par une bicouche lipidique en phase aqueuse (adapté de ⁷⁷). B) Diagramme de phase partiel obtenu pour des mélanges Cholestérol / DPPC (adapté de ⁷⁸)

L'apparition d'une phase cristal-liquide ordonnée L_o se traduit par un élargissement voir la disparition de la transition de phase coopérative, une augmentation (diminution) de l'ordre orientationnel des chaînes carbonées des phospholipides au-dessus (en dessous) de la transition de phase, une diminution du « tilt angle » et une disparition de la pré-transition de phase.⁷⁵

Une évolution des propriétés de la membrane accompagne l'apparition de cette phase lamellaire. De manière simplifiée, l'ajout de cholestérol dans les membranes lipidiques permet de les renforcer tout en leur conférant un caractère fluide. Par exemple, la mobilité latérale des lipides y est similaire à celle d'une phase cristal-liquide désordonnée L_{α} mais la tension nécessaire pour étirer la bicouche est plus élevée.⁷⁸ Bien que sa perméabilité passive soit plus élevée que celle de la phase gel elle reste assez faible, bien en dessous de celle de la phase cristal-liquide désordonnée L_{α} .⁷⁴

1.3.3 Propriétés mécaniques

Dans la suite de cette partie nous allons nous intéresser majoritairement aux propriétés des vésicules polymères. Elles ont surtout été étudiées pour des copolymères flexibles diblocs et triblocs.

1.3.3.1 Influence de l'épaisseur de la membrane

1.3.3.1.1 Epaisseur de la membrane

Un avantage majeur des polymersomes par rapport aux vésicules lipidiques est le fait que l'épaisseur de la membrane peut être modifiée simplement en changeant la masse molaire du bloc hydrophobe. Comme de nombreuses propriétés mécaniques sont directement liées à l'épaisseur de membrane, leur contrôle peut être réalisé *via* la masse molaire du copolymère. Toutefois, différentes lois d'échelle ont été obtenues en fonction du système étudié.⁶

Des mesures d'épaisseur de membrane réalisées par cryo-TEM sur des vésicules nanométriques (100 – 200 nm) préparées avec une gamme de PBut-*b*-PEO (polybutadiène-*b*-poly(oxyde d'éthylène)) ont montré un épaississement de la membrane de 8 à 21 nm quand la masse molaire du copolymère augmente.⁶⁵ La loi d'échelle qui relie l'épaisseur de membrane à la masse molaire de la partie hydrophobe du copolymère, déterminée expérimentalement, est $d \sim M_{wh}^b$ avec $b \sim 0,55$ (figure 1.17).

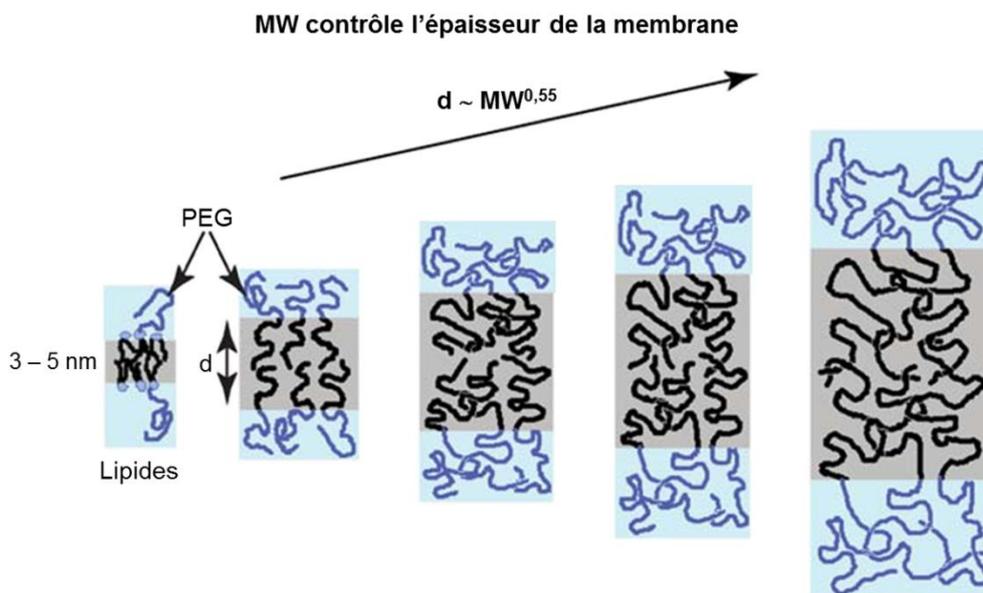


Figure 1.17. Représentation schématique de la dépendance de l'épaisseur de membrane à la masse molaire du bloc hydrophobe (M_{wh}) du copolymère qui la compose.⁹

Une valeur similaire de l'exposant a été déterminée par des simulations de dynamique moléculaire considérant des chaînes de PEE-*b*-PEO (poly(éthyle éthylène)-*b*-poly(oxyde d'éthylène)).⁶⁶ Il a cependant été trouvé, numériquement, que cette valeur est valable pour des membranes dont l'épaisseur est supérieure à 8 nm ($M_w > 3\text{kDa}$), et que pour les systèmes de masse molaire plus faible ($d < 7\text{nm}$) l'exposant est $b \sim 0,82$. Finalement, un exposant $b \sim 0,66$ a été déterminé expérimentalement sur des membranes de PBUO-*b*-PEO.⁷⁹

Les simulations, qui permettent d'aller plus loin que l'expérimentation, ont également montré que pour les systèmes de faible masse molaire il y a une zone de très faible densité hydrophobe au milieu de la membrane (les deux feuilletts de la bicouche sont distincts). Cette zone s'atténue quand la masse des copolymères augmente, les deux feuilletts de la bicouche se fondent entre eux pour former une seule couche hydrophobe de densité homogène. Ces résultats permettent d'expliquer les exposants déterminés pour les lois d'échelle : pour les faibles masses, du même ordre de grandeur que les lipides, les chaînes hydrophobes sont très étirées (b proche de 1). En revanche, l'exposant proche de 0,5 pour les masses élevées traduit une conformation de chaînes gaussiennes non contraintes, en accord avec une couche hydrophobe proche de l'état fondu.⁶⁶

1.3.3.1.2 Fluidité de la membrane

Les polymersomes géants permettent la caractérisation détaillée des propriétés de membrane en utilisant des techniques de micromanipulation de vésicules isolées. Un premier indice qui montre que les membranes polymères sont fluides est que l'on peut voir les fluctuations thermiques.²³ Elles semblent cependant beaucoup plus visqueuses que celles des liposomes, comme l'ont montré des mesures de viscosité de membrane⁶⁴ et du coefficient de diffusion latérale.⁶⁹

1.3.3.1.3 Déformation à la rupture

La déformation moyenne à la rupture maximale $\alpha_c = \Delta A_c/A_0$ atteinte pour les polymersomes est elle aussi bien plus élevée que pour les liposomes, elle peut atteindre quasiment 50%.⁶⁵ L'évolution semble proportionnelle à l'épaisseur de la membrane selon la loi d'échelle $\alpha_c \sim d^{1,6}$ ($\sim M_{wh}^{0,6}$), valable tant que la masse du copolymère n'est pas trop élevée et qu'il n'y a pas d'interdigitation entre les couches. Les membranes des liposomes rompent bien en dessous de ces limites ($\alpha_c \sim 5\%$) car elles sont beaucoup plus susceptibles de présenter des défauts à cause de leur faible épaisseur. La stabilité des membranes, *e.g.* leur résistance à la rupture, augmente bien avec leur épaisseur (figure 1.18).

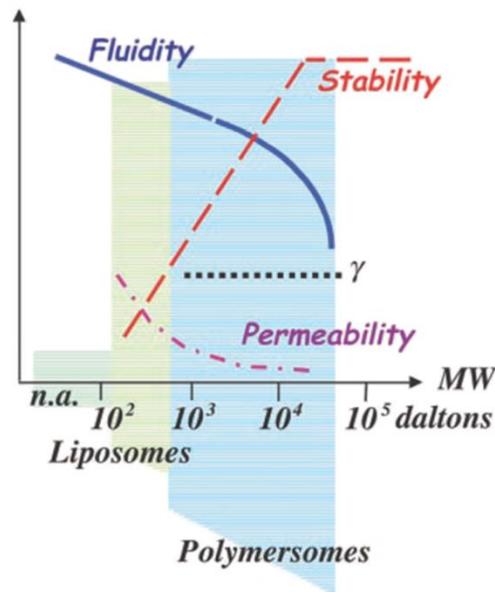


Figure 1.18. Evolution des propriétés de membrane en fonction de son épaisseur.⁸⁰

1.3.3.2 Propriétés mécaniques

1.3.3.2.1 Module élastique et rigidité de courbure

Le module élastique K_a caractérise la résistance de la membrane aux efforts de type compression-dilatation tels que l'étirement de la membrane lors d'expérience de gonflement ou de manipulations en micropipette. Il est le même quelle que soit la masse du copolymère utilisé et est donc indépendant de l'épaisseur de membrane ($K_a \sim d^0$).⁶⁵ Il est principalement lié à la tension interfaciale γ entre les blocs ($K_a \sim 4 \gamma$), elle-même dépendant de la nature chimique des blocs du copolymère.

La capacité de la membrane à se courber, représentée par la rigidité de courbure k_c , est reliée à l'épaisseur de membrane par la relation $k_c = \beta K_a d^2$.⁶³ Cette variation quadratique est en accord avec les théories sur les bicouches membranaires.⁸¹ L'interdigitation possible entre les deux feuillettes d'une bicouche au-delà d'une certaine masse molaire ne change pas l'exposant mais se reflète dans le préfacteur β .

1.3.3.2.2 Energie d'une vésicule

L'énergie totale d'une vésicule peut être écrite comme suivant⁸² :

$$E_{\text{Vésicule}} = E_{\text{Courbure}} + E_{\text{ADE}} + E_{\text{Osmotique}} + E_{\text{Elastique}} \quad (1.3)$$

E_{Courbure} : elle correspond au coût énergétique pour courber la membrane, l'état de plus faible énergie étant la conformation plane. Quand le rayon de courbure est très grand devant l'épaisseur de la membrane, on peut écrire l'énergie de courbure locale par unité de surface en

tout point de la membrane, et ce quelle que soit la forme, par l'expression introduite en 1973 par Helfrich⁸³ :

$$e_{Courbure} = \frac{k_c}{2} (2H)^2 + k_G K \quad (1.4)$$

avec H la courbure moyenne et K la courbure Gaussienne qui décrivent la courbure de la membrane (figure 1.3 partie 1.1.1), et k_c la rigidité de courbure et k_G la rigidité de courbure gaussienne qui sont des paramètres du matériau qui compose la membrane.

Avoir une membrane ouverte coûte de l'énergie car les bords sont exposés à l'eau (pour un disque de rayon R_d cette énergie est reliée à la tension de ligne γ : $E_{\text{ligne}} = 2\pi\gamma R_d$), aussi il faut des configurations où la membrane est refermée sur elle-même. L'énergie de courbure de la membrane devient donc l'intégrale de l'énergie de courbure d'Helfrich sur toute la surface :

$$E_{Courbure} = \frac{k_c}{2} \oint dA (2H)^2 + k_G \oint K dA \quad (1.5)$$

Le deuxième terme de cette énergie dépend de la topologie de la vésicule (nombre de genres / nombre de « poignées ») et non de sa forme :

$$\oint K dA = 4\pi(1 - g) \quad (1.6)$$

On peut donc ignorer ce terme tant que la topologie ne change pas (genus invariant).

E_{ADE} : ce terme, qui représente une énergie de courbure non locale, vient du fait que l'on ne peut pas décrire la membrane comme une surface 2D imbriquée dans un espace 3D, c'est en réalité une bicouche. Son expression est la suivante :

$$E_{ADE} = \frac{\alpha\pi k_c}{2D^2 A} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \quad (1.7)$$

avec α un paramètre adimensionné qui dépend du matériau (voir partie 1.3.5.3.2), D l'épaisseur hydrophobe de la bicouche, A l'aire de la vésicule, ΔA_0 et ΔA la différence d'aire entre les deux feuilletts de la bicouche à l'état d'équilibre et hors de l'état d'équilibre.

E_{Osmotique} : ce terme décrit la pression osmotique à laquelle est soumise la membrane de la vésicule. Il est dû à la présence de molécules auxquelles la membrane est imperméable.

La pression osmotique est :

$$\Pi = RT \left(\frac{n}{V} - c \right) \quad (1.8)$$

avec $R = 8,314 \text{ J.mol.K}^{-1}$ la constante des gaz parfaits, V le volume de la vésicule, n le nombre de moles de soluté dans la vésicule et c la concentration en soluté à l'extérieur de la vésicule. Cela conduit à une énergie :

$$E_{Osmotique}(V) = \int_{V_0}^V dV' \Pi(V') = RT \left[n \ln \left(\frac{V}{V_0} \right) - c(V - V_0) \right] \quad (1.9)$$

et le volume pour laquelle la pression osmotique disparaît est $V = \frac{n}{c}$.

Ce terme est prépondérant par rapport aux autres s'il n'est pas nul. Par exemple, dans le cas d'une vésicule ayant un rayon $R_0 = 10 \mu\text{m}$ dans une solution contenant 10^{-4} mol.m^3 de soluté, seule une différence de 10^{-7} mol.m^3 est contrebalancée par l'énergie de courbure. Cela signifie qu'une vésicule en condition de déséquilibre osmotique va ajuster son volume pour retourner en condition d'équilibre. Le terme d'énergie osmotique est par conséquent nul.

E_{Elastique} : comme pour l'énergie osmotique, ce terme est nul quand la vésicule est à l'équilibre. Il est à prendre en compte quand la membrane est déformée et soumise à une tension, comme lors d'expériences de micromanipulation avec une micropipette ou de chocs hypotoniques.

Il y a deux régimes de déformation distincts. Quand on impose de très faibles tensions de surface τ (régime entropique), on observe une augmentation de l'aire de la vésicule $\alpha = (A - A_0) / A_0$ proportionnelle au logarithme de la tension imposée :

$$\alpha = \frac{k_B T}{8\pi k_c} \ln \left(\frac{\tau}{\tau_i} \right) \quad (1.10)$$

avec A_0 l'aire initiale de la vésicule (l'aire initialement projetée pour une manipulation en micropipette), $k_B T$ l'énergie thermique, k_c la rigidité de courbure de la membrane et τ_i la tension initiale pour laquelle $A = A_0$.⁶⁴ Cette augmentation de la surface visible de la vésicule correspond au lissage des fluctuations thermiques de la membrane. Dans ce régime de déformation, les forces élastiques sont très faibles et l'énergie de courbure reste majoritaire.

En imposant des tensions de surface τ plus élevées, il n'y a plus d'aire « cachée » liée aux fluctuations thermiques et on étire la membrane. Dans ce régime, la tension de surface est directement proportionnelle à la déformation de la membrane :

$$\tau(t) = K_a \alpha(t) \quad (1.11)$$

avec K_a le module élastique. Les forces élastiques qui s'opposent à l'étirement de la membrane ne sont pas négligeables et peuvent être assimilées à une pression qui s'applique sur la membrane de la vésicule :

$$\Delta p = \frac{2\tau(t)}{R(t)} \quad (1.12)$$

avec $R(t)$ le rayon de la vésicule pour une déformation de la membrane $\alpha(t)$.

1.3.4 Perméabilité

Une des propriétés intrinsèques les plus intéressantes des membranes amphiphiles est leur nature semi-perméable, *i.e.* leur perméabilité sélective aux molécules hydrophiles et hydrophobes. Cela confère aux vésicules la capacité de compartimentaliser des volumes aqueux de différentes compositions et concentrations, et donc la capacité à encapsuler des principes actifs. La caractérisation de la perméabilité des vésicules permet de déterminer leur efficacité en tant que vecteur ou encore de comprendre leur réponse à des phénomènes d'osmose.

De nombreuses méthodes, développées pour les membranes lipidiques, permettent d'étudier la perméabilité à l'eau des vésicules. Une partie des techniques est basée sur le suivi de l'évolution temporelle de la taille des vésicules (par microscopie optique⁸⁴⁻⁸⁶ et diffusion dynamique de la lumière^{87, 88}) et l'autre partie sur le suivi des changements de l'environnement de certains solutés par spectroscopie (auto-extinction de fluorophores^{89, 90} et diffusion Raman anti-stokes⁹¹). Dans la plupart des cas, la force motrice de la perméation est un choc osmotique.

1.3.4.1 Paramètres gouvernant la perméabilité

1.3.4.1.1 Epaisseur de la membrane

L'épaisseur de membrane est un paramètre important pour contrôler la perméabilité aux petites molécules hydrophiles, au moins en ce qui concerne le mécanisme de diffusion passive. Typiquement, la perméabilité à l'eau des polymersomes est 10 à 20 fois plus faible que celle des vésicules lipidiques. En fonction du copolymère utilisé, différentes valeurs ont été mesurées : 2,5 $\mu\text{m/s}$ pour des vésicules de PEO₄₀-*b*-PEE₃₇, 3900 g.mol⁻¹),²³ 7 $\mu\text{m/s}$ pour des vésicules de PBA-*b*-PAA (5500 g.mol⁻¹),⁵³ 0,8 $\mu\text{m/s}$ pour des vésicules de PMOXA₁₅-*b*-PDMS₁₁₀-*b*-PMOXA₁₅ (poly(méthylloxazoline)-*b*-poly(diméthylsiloxane)-*b*-poly(méthylloxazoline), 10700 g.mol⁻¹),³⁰ 3,1 $\mu\text{m/s}$ pour les vésicules de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ (3800 g.mol⁻¹) et 28 $\mu\text{m/s}$ pour celles de PDMS-*g*-PEO (poly(diméthylsiloxane)-*g*-poly(oxyde d'éthylène), 3000 g.mol⁻¹).³⁶ Excepté pour le dernier copolymère, ces valeurs sont bien en dessous de celles communément observées pour les vésicules lipidiques (25-150 $\mu\text{m/s}$).^{92, 93}

Battaglia *et al.* ont étudié le coefficient de perméabilité d'une petite molécule hydrophile (la DTNB : acide 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque) en fonction de la masse molaire et de l'architecture du copolymère amphiphile utilisé pour former la membrane des vésicules.⁶⁸ Les copolymères utilisés sont des diblocs EB et des triblocs EBE et BEB (B pour PBuO et E pour PEO) de différentes masses molaires. Il apparaît que le coefficient de perméabilité de la DTNB

ne dépend pas de l'architecture du copolymère et est inversement proportionnel à l'épaisseur de membrane (d^{-1}), en accord avec la première loi de Fick (figure 1.19.A).

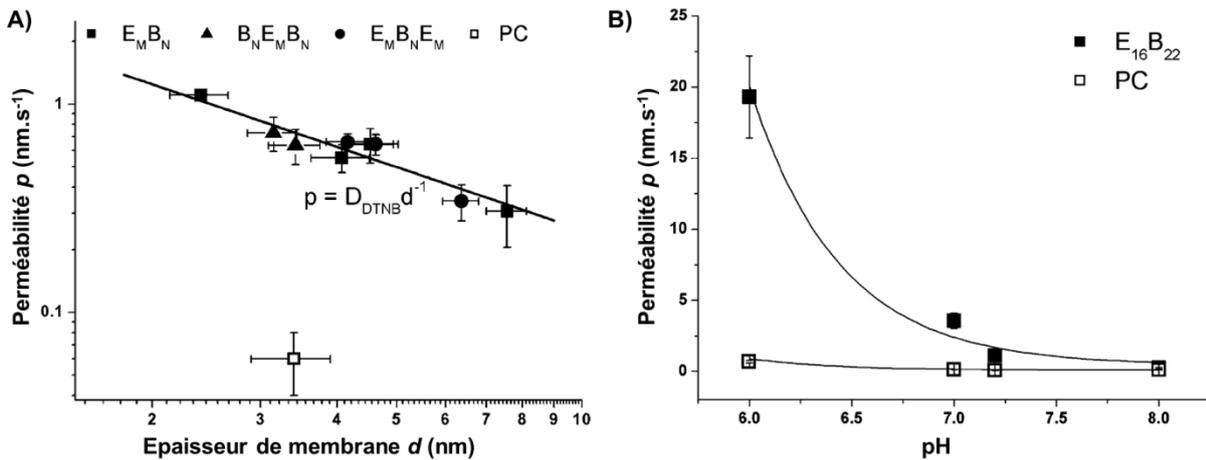


Figure 1.19. A) Perméabilité en fonction de l'épaisseur des membranes d'Egg yolk phosphatidylcholine (EPC) et de poly(oxyde de butylène)-poly(oxyde d'éthylène) (EB). Le coefficient de diffusion de la DTNB a été calculé à $2,5 \text{ nm}^2\cdot\text{s}^{-1}$. B) Perméabilité des membranes d'EB et de PC en fonction du pH.⁶⁸

1.3.4.1.2 Nature de la membrane

En plus de l'épaisseur de la membrane, que l'on contrôle *via* la masse molaire du copolymère, la polarité de la membrane est elle aussi un paramètre qui influe beaucoup sur la valeur de sa perméabilité. Un second résultat de Battaglia *et al.* est que les membranes d'EB sont une dizaine de fois plus perméables à la DTNB que les membranes formées par de l'EPC. Bien que cela paraisse surprenant, ceci est dû à la nature plus hydrophile des polyéthers (PBuO) que les chaînes aliphatiques des lipides.⁶⁸ De manière générale, plus le bloc hydrophobe de l'amphiphile est polaire plus la perméabilité à l'eau et aux petites molécules polaires est grande.⁹⁴ Le même résultat peut être obtenu en ajoutant des petites molécules hydrophiles, directement dans la solution de vésicules, qui vont changer le profil de polarité de la membrane. Bauer *et al.* ont ainsi montré que la perméabilité à l'eau de vésicules de $\text{PI}_{33}\text{-}b\text{-PEO}_{25}$ (poly(isoprène)-*b*-poly(oxyde d'éthylène), $3344 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) augmente quand on ajoute de l'éthanol dans la solution car ces molécules se logent dans la membrane, ce qui a pour effet d'augmenter la polarité de la couche hydrophobe et donc de diminuer la barrière énergétique pour la perméation des molécules d'eau.⁹⁵ Cette variation de perméabilité est parfaitement réversible.

Les membranes formées par certains copolymères à blocs amphiphiles sont par nature semi-perméables. Les polymersomes de $\text{PS-}b\text{-PIAT}$ (polystyrène-*b*-poly3-(isocyno-L-alanyl-aminoéthyle) thiophène) sont ainsi d'excellents candidats pour les applications en tant que

nanoréacteur car leur membrane est perméable aux petites molécules alors que de plus grosses molécules comme des enzymes restent encapsulées dans le milieu intravésiculaire.^{96, 97} La nature de ce phénomène n'est pas encore entièrement comprise, il est possible que la structure secondaire en hélice du bloc hydrophile PIAT empêche un assemblage optimal des copolymères dans la membrane.

Dans les systèmes lipidiques, où la partie hydrophobe est une chaîne carbonée, la perméabilité à l'eau dépend de la composition de la membrane et tout particulièrement du nombre d'insaturations des chaînes hydrophobes : plus ce nombre est élevé plus la perméabilité est grande.^{98,99} Par ailleurs, les perméabilités des liposomes sont généralement déterminées au-dessus de la T_m des lipides, elle est beaucoup plus faible en dessous.

1.3.4.1.3 Soluté

La perméabilité de la membrane dépend également de la nature du soluté. Battaglia *et al.* ont montré que les membranes d'EB sont beaucoup plus perméables aux molécules neutres que les membranes de PC (env. 20 fois), alors qu'elles ne sont qu'environ trois fois plus perméable que les membranes d'EPC quand l'espèce est chargée (figure 1.19.B).⁶⁸ Les membranes polymères sont en général très peu perméables aux molécules hydrophiles, sauf si celles-ci sont petites et de faible polarité. La taille du soluté a elle aussi une influence sur sa perméabilité : pour les petits solutés neutres ($R_h \sim$ quelques nanomètres), la vitesse de perméation dépend majoritairement de leur rayon hydrodynamique, il y a peu d'influence de leur nature chimique. En revanche, passé une taille critique, c'est la nature chimique du soluté qui a plus d'importance que sa taille.¹⁰⁰

La perméabilité des liposomes à certaines molécules neutres solubles dans l'eau, telles que le glucose et le sucrose, est faible.¹⁰¹ En revanche, ils sont très perméables à de plus petites molécules qui sont solubles à la fois dans l'eau et la membrane comme le glycérol¹⁰² ou l'urée.¹⁰³ Bien que les membranes soient perméables aux protons ($P \sim 1 \mu\text{m/s}$), elles sont très peu perméables aux ions multivalents comme Ca^{2+} ($P \sim 2,5 \cdot 10^{-7} \mu\text{m/s}$).¹⁰⁴ Les membranes des polymersomes y sont encore moins perméables que celles des liposomes du fait de leur plus grande épaisseur.

Il existe donc de multiples moyens pour contrôler la perméabilité passive des membranes à différents types de molécules. Si l'imperméabilité naturelle de ces membranes à certains composés permet leur encapsulation, elle permet aussi de contrôler activement des perméabilités spécifiques en utilisant par exemple des protéines transmembranaires ou des ionophores.

1.3.4.2 La pression osmotique

L'utilisation de chocs osmotiques est une approche simple et répandue qui permet de collecter des informations sur la perméabilité de la membrane. En conditions de déséquilibre osmotique, une vésicule ajuste son volume pour retourner en condition d'équilibre car l'énergie osmotique qui s'applique sur sa surface est prépondérante par rapport à son énergie de courbure (voir partie 1.3.3.2.2). En se basant sur ce principe, E. Boroske et W. Helfrich ont montré que la contraction de vésicules unilamellaires géantes induite par la pression osmotique, mesurée par microscopie optique et résolue dans le temps, est un moyen efficace pour déterminer le coefficient de perméabilité à l'eau des membranes.⁸⁴

La pression osmotique qui s'exerce sur la membrane d'une vésicule dépend de la différence d'osmolarité entre le milieu intravésiculaire et le milieu extérieur : $\Delta\Pi = RT(c_{\text{int}} - c_{\text{ext}}) = RT\Delta c$.

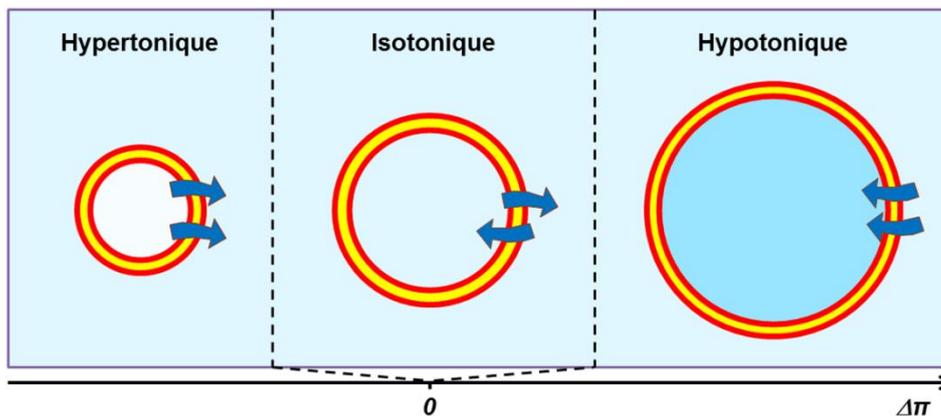


Figure 1.20. Représentation schématique du comportement d'une vésicule dans les différentes conditions d'osmolarité.

Quand la concentration en soluté extérieure à une vésicule est plus élevée que la concentration en soluté encapsulée ($c_{\text{int}} < c_{\text{ext}}$), la pression qui s'applique sur la membrane est négative et on parle de choc hypertonique (ou hyperosmotique). La vésicule retourne à l'équilibre en expulsant une partie ou totalité de l'eau qu'elle contient pour augmenter la concentration en soluté encapsulé (figure 1.20). La contraction qui en résulte implique nécessairement un excès de surface par rapport au volume encapsulé, ce qui conduit à de nombreux changements de forme (voir partie 1.3.5).

Dans le cas contraire, la concentration en soluté dans la vésicule est plus élevée que celle du milieu extérieur ($c_{\text{int}} > c_{\text{ext}}$) et on parle de choc hypotonique (ou hypo-osmotique). La vésicule gonfle au fur et à mesure qu'elle absorbe de l'eau pour diminuer la concentration intravésiculaire en soluté (figure 1.20). Au cours du gonflement la tension dans la membrane

de la vésicule augmente, ce qui modifie l'équilibre des forces en jeu, et il est possible que le gonflement de la vésicule s'arrête avant que l'équilibre des pressions osmotiques soit atteint à cause de ces forces élastiques. Cela se produit quand la pression osmotique $\Delta\pi = RT\Delta c$ est compensée par la pression de Laplace $\Delta p(t) = 2K_a\alpha(t)/R(t)$. Dans le cas où les forces élastiques ne compensent pas la pression osmotique, la tension de surface augmente jusqu'à la tension de lyse. La vésicule va alors soit exploser, soit former des pores transitoires de manière à expulser rapidement une partie de son contenu afin de relaxer la tension membranaire.

La présence des forces élastiques lors des chocs hypotoniques peut perturber la mesure du coefficient de perméabilité à l'eau. De manière générale, on travaille avec les petits changements de taille ($\alpha < \sim 10\%$) pour pouvoir les négliger.

1.3.4.3 Mesure du coefficient de perméabilité à l'eau – sans forces élastiques

L'ensemble des équations décrites dans cette partie ne prend pas en compte les forces élastiques. Le flux osmotique de l'eau à travers une membrane en réponse à un choc osmotique est décrit par la relation :

$$J(t) = -P_f \Delta c(t) \quad (1.13)$$

avec P_f le coefficient de perméabilité de la membrane à l'eau (dimension d'une vitesse) et $\Delta c(t)$ la différence de concentration en soluté à un instant t . En considérant que la surface osmotiquement active, à travers laquelle le flux d'eau passe, a une aire A il est possible d'écrire :

$$\frac{dn}{dt} = -A P_f \Delta c(t) \quad (1.14)$$

En utilisant le volume molaire de l'eau $v_w \sim 0,018 \text{ L.mol}^{-1}$, on peut donc décrire l'évolution du volume d'une vésicule soumise à un choc osmotique en fonction du temps :

$$\frac{dV(t)}{dt} = -A v_w P_f \Delta c(t) \quad (1.15)$$

La membrane étant très peu perméable au soluté responsable du déséquilibre osmotique, la différence de concentration en fonction du temps est :

$$\Delta c(t) = c^{ext} - c^{int}(t) = c^{ext} - c_0^{int} \frac{V_0^{vésicule}}{V^{vésicule}(t)} \quad (1.16)$$

avec $V_0^{vésicule}$ le volume initial de la vésicule et $V^{vésicule}(t)$ son volume à un instant t .

1.3.4.3.1 Cas d'une vésicule sphérique

Si la vésicule observée est sphérique, la valeur de son volume est directement reliée à la valeur de son rayon. La variation du volume en fonction du temps peut alors être exprimée comme suivant :

$$\frac{dV(t)}{dt} = -A v_w P_f \left(c^{ext} - c_0^{int} \frac{R_0^3}{R(t)^3} \right) \quad (1.17)$$

L'hypothèse la plus simple est de considérer que la surface active A de la vésicule change peu au cours du choc osmotique. On peut donc écrire $dV(t) = A dR(t)$ et :

$$\frac{dR(t)}{dt} = -v_w P_f \left(c^{ext} - c_0^{int} \frac{R_0^3}{R(t)^3} \right) \quad (1.18)$$

De plus, pour des changements de volume faibles (déformation de la surface $\alpha < \sim 10\%$), on peut écrire l'approximation suivante :

$$\frac{R_0^3}{R(t)^3} = 1 - 3 \frac{R(t) - R_0}{R_0} + 6 \left(\frac{R(t) - R_0}{R_0} \right)^2 \quad (1.19)$$

Il y a alors différentes approches possibles pour déterminer le coefficient de perméabilité P_f dans le domaine des faibles déformations :

- *Approximation à l'ordre 0* : c'est l'approximation la plus souvent utilisée, dans laquelle on considère que $R_0^3/R(t)^3 = 1$. L'évolution du rayon en fonction du temps est alors linéaire et s'exprime de la manière suivante :

$$\frac{dR(t)}{dt} = -v_w P_f (c^{ext} - c_0^{int}) \quad (1.20)$$

La valeur du coefficient de perméabilité, qui est proportionnelle à la pente de l'évolution du rayon au cours du temps, est extraite de l'équation 1.20 (figure 1.21).

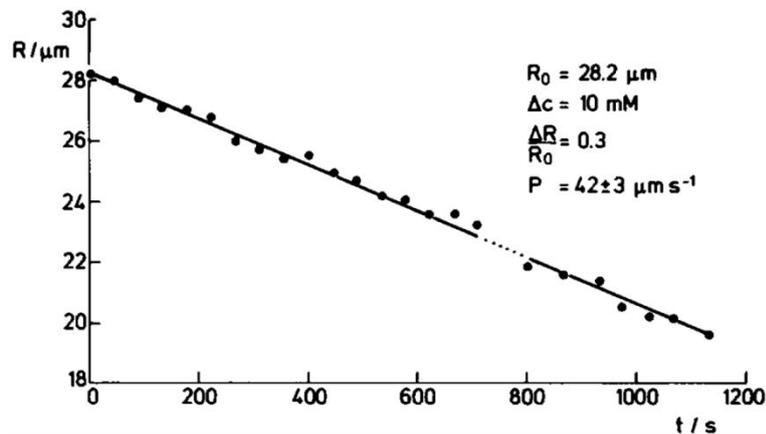


Figure 1.21. Evolution temporelle du rayon d'une vésicule géante soumise à un choc hypertonique.⁸⁴

- *Approximation à l'ordre 1* : on l'utilise quand le second terme de l'approximation n'est pas négligeable. On utilise cette fois $R_0^3/R(t)^3 = 1 - 3(R(t) - R_0)/R_0$. Cela conduit à une expression du rayon qui varie de manière exponentielle avec le temps :

$$R(t) = R_0[A - (A - 1)\exp(-kt)] \quad (1.21)$$

avec le paramètre $A = (4 c_0^{int} - c^{ext})/3 c_0^{int}$ sans dimensions et le paramètre $k = (3 v_w P_f c_0^{int})/R_0$ en s^{-1} , à partir duquel le coefficient de perméabilité à l'eau P_f est extrait.

On observe cependant une forte contraction du rayon de la vésicule lors d'un choc hypertonique (figure 1.21). Cela entraîne l'apparition d'un excès de surface qui peut produire des bourgeonnements à l'intérieur de la vésicule observée.^{85, 86, 105} Une équation introduite par Boroske et Helfrich permet de tenir compte de « vésicules filles » de rayon r qui se détachent de la vésicule mère⁸⁴ :

$$\frac{dR(t)}{dt} \left(1 - \frac{2}{3} \frac{r}{R(t)}\right) = -v_w P_f \Delta c \quad (1.22)$$

1.3.4.3.2 Cas d'une vésicule non-sphérique

Certaines méthodes pour mesurer le coefficient de perméabilité à l'eau des vésicules, comme les manipulations à l'aide de micropipettes, ne permettent pas de conserver une forme sphérique. Olbrich *et al.*⁹⁹ ont observé que l'évolution temporelle du volume d'une vésicule soumise à un choc hypertonique puis replacée dans son milieu d'origine suit une loi exponentielle (figure 1.22).

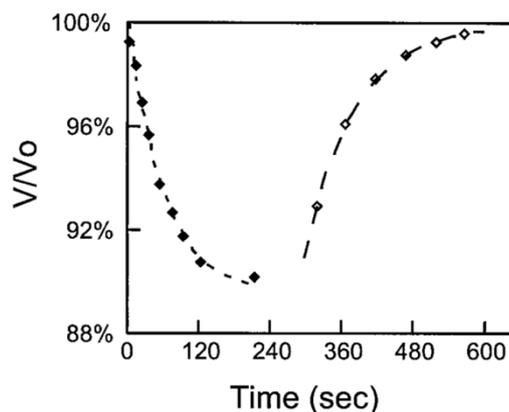


Figure 1.22. Evolution temporelle du volume d'une vésicule soumise à un choc hypertonique (première phase de la courbe, $\Delta c = 200 \text{ mOsm} - 220 \text{ mOsm} = -20 \text{ mOsm}$) puis replacée dans son milieu d'origine. On observe une récupération totale du volume d'origine.⁹⁹

En repartant de l'équation 1.15 obtenue juste avant de faire l'hypothèse de sphéricité de la vésicule, on obtient :

$$\frac{dV(t)}{dt} = -A v_w P_f \left(c^{ext} - c_0^{int} \frac{V_0^{vésicule}}{V^{vésicule}(t)} \right) \quad (1.23)$$

Si on considère que la membrane est imperméable au soluté et qu'il n'y a pas de perte au cours de l'expérience, alors la concentration intravésiculaire est définie à tout moment par $c(t) = m/V(t)$, m étant la masse de soluté encapsulée. A l'équilibre des pressions osmotiques on a donc $c^{ext} = c_\infty$ et $c_0^{int} V_0^{vésicule} = c_\infty V_\infty$. En introduisant $V(t)^* = V(t)/V_\infty$ il est alors possible d'écrire :

$$\frac{dV(t)^*}{dt} = -\frac{A v_w P_f c_\infty}{V_\infty} \left(\frac{V(t)^* - 1}{V(t)^*} \right) \quad (1.24)$$

Cela conduit à l'équation exponentielle suivante :

$$(V(t)^* - 1)\exp(V(t)^*) = (V_0^* - 1)\exp(kt + V_0^*) \quad (1.25)$$

avec k la constante de décroissance (s^{-1}). On obtient alors le coefficient de perméabilité en utilisant la relation :

$$P_f = \frac{kV_\infty}{Ac_\infty v_w} \quad (1.26)$$

avec v_w le volume molaire de l'eau.

1.3.4.4 Mesure du coefficient de perméabilité à l'eau – avec les forces élastiques

Les équations décrites précédemment sont faussées pour les mesures du coefficient de perméabilité à l'eau en conditions hypotoniques à cause des forces élastiques qui apparaissent dans la membrane de la vésicule au cours du gonflement. C'est la raison pour laquelle ce type de mesure est généralement réalisé pour de petites déformations de la membrane ($\alpha < 10\%$), afin de négliger la tension de surface.

Toutefois, il est possible de décrire l'évolution temporelle du volume d'une vésicule sphérique en tenant compte des forces élastiques :¹⁰⁶

$$\frac{dV}{dt} = -L_h A \left(RT \Delta c(t) + \frac{2K_a \alpha(t)}{R(t)} \right) \quad (1.27)$$

avec L_h la conductivité hydraulique ($L_h = \frac{P_f v_w}{RT}$), $\Delta c(t)$ le gradient de concentration responsable du choc, R la constante de gaz parfaits, T la température, $\alpha(t)$ la déformation de membrane, $R(t)$ le rayon de la vésicule, P_f le coefficient de perméabilité à l'eau et K_a le module élastique. Au cours d'une expérience de choc hypotonique, il est donc en théorie possible de déterminer à la fois le coefficient de perméabilité à l'eau de la membrane (faible déformations) et le module élastique K_a de la membrane.

1.3.5 Evolution de la morphologie vésiculaire

1.3.5.1 Interaction avec des systèmes biologiques

Le développement de nouvelles méthodes de préparation de micro et nano-particules anisotropes, de manière contrôlée et reproductible, a permis d'étudier l'influence de la forme sur les procédés d'internalisation cellulaire.^{107, 108} Cela a mis en évidence qu'en plus de certains paramètres physico-chimiques, tels que la taille et la fonctionnalisation de surface,^{109, 110} la forme des particules est un paramètre important qui modifie leur biodistribution et leurs interactions avec les cellules, et par conséquent leurs propriétés thérapeutiques et d'imagerie.

Le premier niveau auquel la morphologie des particules intervient est leur transport dans le système sanguin. Une forme non-sphérique favorise l'accumulation des particules le long des parois des vaisseaux sanguins sous flux laminaire, ce qui est avantageux dans le cas d'une stratégie de ciblage vasculaire. Les particules peuvent ainsi sonder la diversité biologique et biophysique des parois sanguines, accéder plus facilement aux petits vaisseaux sanguins et donc couvrir de plus nombreuses surfaces.¹¹¹

Une fois les particules arrivées à proximité des cellules cibles, il est nécessaire qu'elles s'y fixent pour être internalisées ou non par la suite. Sharma *et al.* ont montré que l'adhésion de particules de polystyrène à la surface de macrophages dépend de leur forme.¹¹² Ils observent le classement suivant (figure 1.25.B) : ellipsoïdes prolates > ellipsoïdes oblates > sphères. Ces résultats ont été confirmés par des simulations dans lesquelles l'influence de la forme et de la taille des particules sur l'interaction adhésive particules / cellules (sous un flux laminaire linéaire qui représente le flux sanguin) a été étudiée.¹¹³ Il en ressort que pour chaque rapport d'aspect γ des particules il existe un volume optimal V_{opt} qui maximise les forces d'adhésion, et qu'à un volume fixé V les particules oblates (rapport d'aspect $\gamma > 1$) sont plus efficaces pour adhérer à un support sous flux laminaire que les particules sphériques (figure 1.23). Ce dernier résultat est très intéressant car il signifie que pour une même probabilité d'adhésion les particules oblates peuvent avoir un volume plus élevé et donc une plus grande capacité de transport.

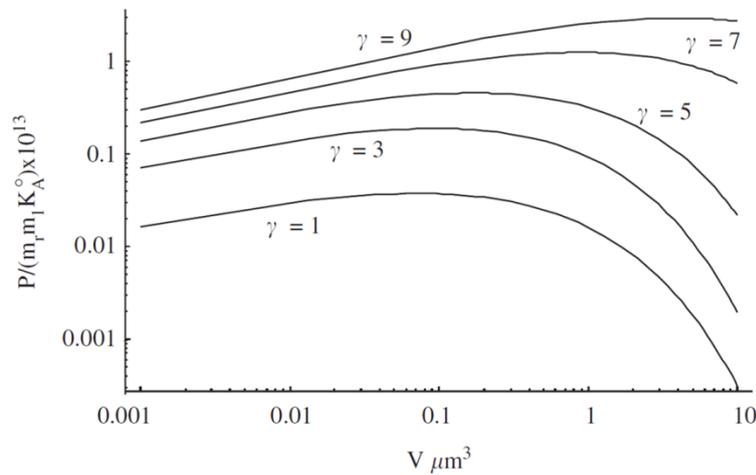


Figure 1.23. Probabilité d'adhésion P en fonction du volume V d'une particule oblate pour différentes valeurs du rapport d'aspect γ ($\gamma =$ demi-grand axe / demi-petit axe).¹¹³

La troisième et dernière étape sur laquelle la forme de la particule a une influence est l'endocytose, c'est-à-dire le mécanisme par lequel la cellule cible importe les particules extracellulaires. Deux procédés, qui dépendent de la taille des particules, ont principalement été étudiés. Pour les particules micrométriques (dimensions caractéristiques des vésicules géantes), le procédé d'internalisation est la phagocytose. Champion et Mitragotri ont étudié *in vitro* l'influence de la morphologie en incubant des macrophages (cellules phagocytiques professionnelles) avec des microparticules de polystyrène de différentes formes.¹¹⁴ Pour une particule unique, il apparaît que c'est sa forme locale au point de contact avec un macrophage qui détermine si la cellule va phagocyter ou simplement s'étaler sur la particule. C'est important car la forme locale varie au sein d'une même morphologie (sauf dans le cas d'une sphère). Pour généraliser et quantifier le rôle de la forme sur la phagocytose, ils ont introduit un angle Ω (figure 1.24.A).

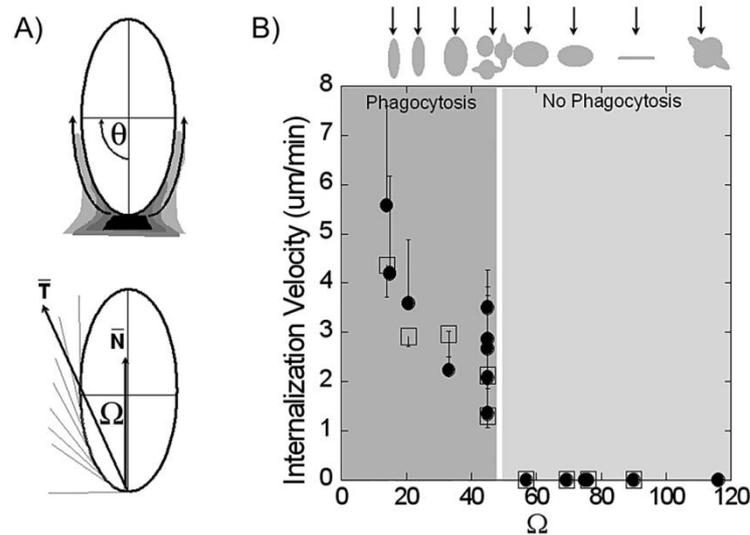


Figure 1.24. A) Représentation schématique de l'avancée de la membrane lors de la phagocytose et définition de l'angle Ω . T représente la tangente moyenne à la surface de la particule pour des angles allant de $\theta = 0^\circ$ à $\theta = 90^\circ$, et Ω est l'angle entre T et la normale à la membrane au site de contact. B) Vitesse d'internalisation (distance parcourue par la membrane divisée par le temps de l'internalisation) en fonction de l'angle Ω pour différentes morphologies. Les points pleins représentent des particules non opsonisées et les carrés blancs des particules opsonisées.¹¹⁴

Les résultats montrent que la vitesse de phagocytose diminue quand Ω augmente (figure 1.24.B). De plus, une chute de la vitesse d'internalisation est observée pour $\Omega \sim 45^\circ$, ce qui signifie qu'au-delà de cet angle de contact initial il n'y a plus de phagocytose. Le macrophage s'étale simplement sur la particule mais il n'y a plus d'internalisation, c'est une phagocytose « frustrée ». A une échelle globale, et non locale, Sharma *et al.* ont observé une meilleure phagocytose pour les particules oblates que les particules sphériques. Ces deux types de particules sont mieux phagocytées que les particules prolates (figure 1.25).¹¹² Il est intéressant de constater que bien que les particules prolates soient celles qui aient la meilleure adhésion, leur faible taux d'internalisation en fait celles qui ont le taux de phagocytose le plus bas (figure 1.25.B). C'est une bonne illustration du fait que l'adhésion n'est qu'une étape de la phagocytose.

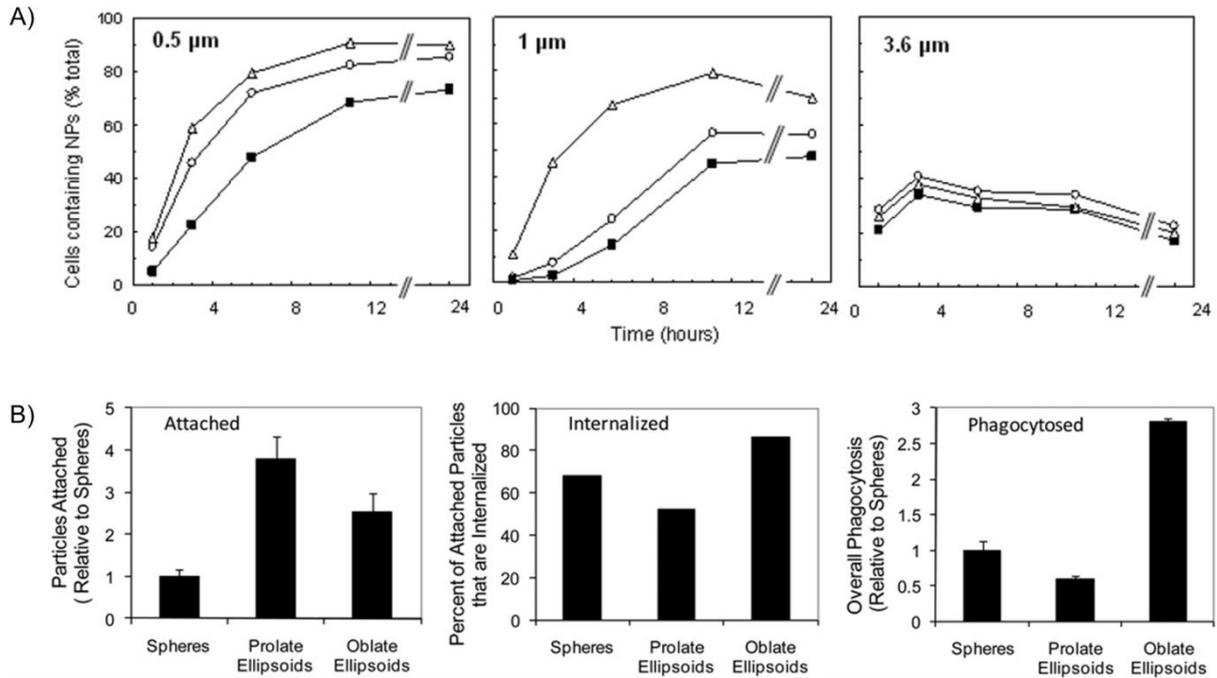


Figure 1.25. A) Evolution du pourcentage de cellules ayant phagocyté au moins une particule en fonction du temps. Chaque symbole correspond à une forme : sphères (○), ellipsoïdes prolates (■) et ellipsoïdes oblates (△). Le nombre dans le coin à gauche correspond à la taille de la particule sphérique à partir de laquelle les particules ont été faites. B) Comparaison de l'efficacité de l'étape d'adhésion, l'étape d'internalisation et de la phagocytose globale pour les particules préparées à partir des sphères de 1 μm de diamètre.¹¹²

Pour les particules nanométriques, le procédé d'endocytose souvent rencontré est la RME (Receptor Mediated Endocytosis) dans laquelle des molécules (ligands) réparties sur la surface de la particule se lient aux récepteurs correspondants exprimés à la surface de la cellule cible, qui va éventuellement se courber pour invaginer le corps étranger. Différentes études prouvent qu'il est possible d'extrapoler les résultats obtenus à l'échelle micrométrique, *i.e.* pour la phagocytose, à l'échelle nanométrique. A l'aide de simulations, Decuzzi *et al.* ont étudié l'influence de la taille et de l'orientation d'une particule anisotrope par rapport à la membrane de la cellule sur son internalisation.¹¹⁵ Leurs résultats sont décrits en fonction du rapport d'aspect de la particule, qui est défini comme étant le rapport de l'axe parallèle à la surface sur l'axe orthogonal à la surface. Pour les rapports d'aspect inférieurs à 1, c'est-à-dire les particules perpendiculaires à la surface de la cellule (équivalent aux angles $\Omega < 45^\circ$), on observe une internalisation au-dessus d'un rapport d'aspect critique Γ'_{cr} . En dessous de cette limite les particules ne sont pas du tout enveloppées par la membrane. Pour les rapports d'aspect supérieurs à 1, les particules allongées sont parallèles à la membrane (équivalent à un angle $\Omega > 45^\circ$) et ne sont internalisées que jusqu'à un deuxième rapport d'aspect critique Γ''_{cr} . Au-dessus de cette limite, les particules sont seulement partiellement enfoncées dans la membrane,

ce qu'ils appellent une « endocytose frustrée ». L'équipe de Chan a obtenu des résultats expérimentaux qui confirment cet effet.¹¹⁶ Ils ont observé que des nanoparticules cylindriques d'or avec un rapport longueur sur rayon élevé sont moins bien internalisées par les cellules HeLa que des nanoparticules sphériques avec une taille caractéristique similaire. Ils n'ont cependant pas fait l'étude sur des nanoparticules de forme oblate.

Une autre possibilité qui implique le design de la forme d'une particule est de tirer profit du fait que les vaisseaux sanguins proches de certaines tumeurs sont plus poreux que les vaisseaux sains à cause d'un défaut de jonction entre les cellules épithéliales. Chauhan *et al.* ont comparé *in vitro* la diffusion de nanoparticules cylindriques et sphériques de même rayon hydrodynamique à travers des membranes de porosité contrôlée.¹¹⁷ Pour des pores de 5000 nm ils obtiennent la même vitesse de diffusion pour les deux formes, mais pour des pores de 100-400 nm la diffusion des particules cylindriques est une dizaine de fois plus rapide. Les tests *in vivo* faits sur des tumeurs montrent que les nano-cylindres pénètrent 4 fois plus rapidement et qu'il y en a 1,7 fois plus en volume. C'est à priori la dimension plus courte des nanoparticules cylindriques qui facilite leur transport à travers les pores.

Le contrôle de la forme des nanoparticules est donc une nouvelle voie prometteuse pour améliorer les performances des systèmes utilisés en tant que vecteurs thérapeutiques. Les bénéfices potentiels concernent autant le transport que l'adhésion et l'internalisation des nanoparticules. A plus large échelle, cela peut également permettre d'augmenter la capacité de transport des particules tout en maintenant une efficacité équivalente ou de prolonger le temps de circulation des particules en limitant leur réponse au système immunitaire (utilisation de particules très anisotropes pour éviter la phagocytose). Aussi, une faible amélioration des performances des systèmes de vectorisation aurait d'importantes répercussions sur l'efficacité des traitements d'aujourd'hui.

1.3.5.2 Evolution des morphologies lors d'un choc osmotique

Une condition nécessaire pour qu'une vésicule sphérique change de forme est que l'on modifie son rapport aire / volume. L'utilisation de gradients de pression osmotique, qui forcent les vésicules à adapter leur volume interne pour retourner à l'équilibre, est un moyen simple à mettre en œuvre pour changer ce rapport. Il en résulte de nombreux changements de forme, qui dépendent à la fois du type de choc appliqué et du système étudié.

1.3.5.2.1 Choc hypotonique

Les liposomes et les polymersomes géants gonflent de façon similaire en conditions hypotoniques afin de diminuer la surpression intravésiculaire. Si la tension de lyse est atteinte avant que l'équilibre des pressions osmotiques soit rétabli les vésicules explosent⁸⁷ ou relarguent périodiquement une partie de leur contenu pour diminuer la tension de membrane en parallèle du gonflement.^{36, 56} Dans tous les cas les vésicules géantes gonflées restent sphériques tant qu'elles ne sont pas détruites.

Un comportement similaire a été observé pour des liposomes à l'échelle nanométrique. Même si la méthode de préparation en conditions isotoniques peut leur conférer une forme initiale anisotrope, le gonflement en conditions hypotoniques leur redonne une forme sphérique.^{118, 119} Passé un certain gonflement, ces nano-vésicules relâchent une partie de leur contenu pour diminuer la tension de surface tout en maintenant une forme sphérique.^{120, 121}

1.3.5.2.2 Choc hypertonique - Vésicules géantes

Le comportement des vésicules en conditions hypertoniques est plus compliqué car la diminution du volume interne implique un excès d'aire de la membrane. La majorité des formes obtenues expérimentalement^{122, 123} en soumettant des liposomes unilamellaires géants à un choc hypertonique ont été prédites théoriquement (voir partie 1.3.5.3). Dans ces conditions, les vésicules évoluent d'une forme sphérique à toute une variété de formes anisotropes comme des ellipsoïdes oblates et prolates, des stomatocytes - *i.e.* des vésicules ayant une forme d'estomac - et même des formes non-axisymétriques ressemblant à des étoiles de mer (figure 1.26).

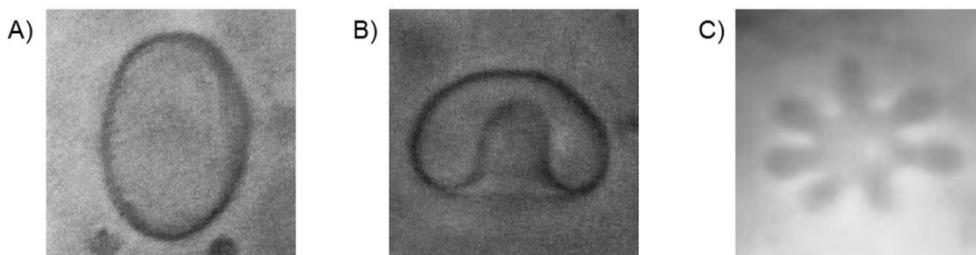


Figure 1.26. Morphologies obtenues expérimentalement et décrites par les modèles théoriques : A) vésicule prolate, B) stomatocyte et C) forme en étoile de mer.^{122, 123}

Un mode de contraction qui n'est pas décrit par les modèles théoriques a été observé pour des liposomes géants d'EPC,¹⁰⁵ de DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)⁸⁶ et de DOPG (dioleoylphosphatidylglycerol).⁸⁵ Il y a deux étapes lors de la diminution du rayon : une première phase linéaire jusqu'à $\Delta R/R_0 \sim 0,3$, et une deuxième phase non-linéaire pendant laquelle des « vésicules filles » apparaissent à l'intérieur de la « vésicule mère » (la vésicule soumise au choc hypertonique) jusqu'à ce que sa surface interne soit entièrement recouverte.

La vésicule résultante présente une forme semblable à une framboise (figure 1.27.A et 1.27.B). Deux raisons ont été avancées pour expliquer la déviation de la transition de forme par rapport aux prédictions. Premièrement, la méthode utilisée pour appliquer le choc osmotique est plus douce.¹⁰⁵ La deuxième raison est liée à la nature du système car une vitesse de transfert du lipide entre les deux feuilletts de la bicouche lente peut résulter en une forte tendance au bourgeonnement alors qu'une redistribution rapide du lipide entre les deux monocouches favorise les transitions de forme classiques.⁸⁵

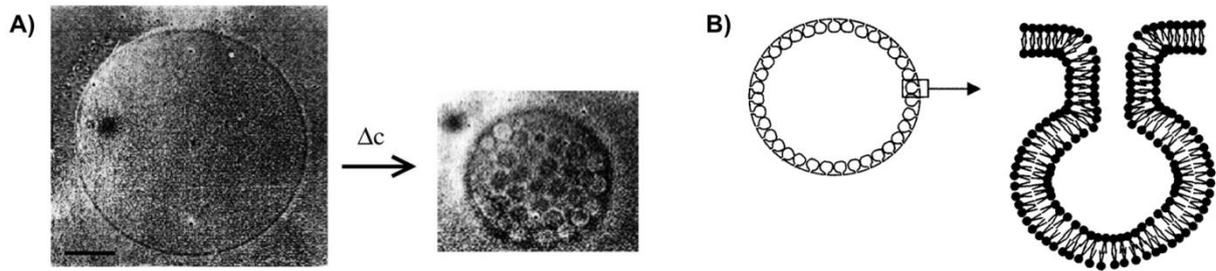


Figure 1.27. A) Vésicule géante unilamellaire en conditions isotoniques, puis après 15 min de choc hypertonique contrôlé avec un gradient de concentration en glucose $\Delta c = 250$ mM.¹⁰⁵ B) Schéma de la forme « framboise » et détails sur le bourgeonnement de la membrane orienté vers l'intérieur de la vésicule mère.⁸⁶

De nombreuses zones d'ombre subsistent quant au phénomène de formation de ces « vésicules framboises ». Il n'est pas possible que les vésicules conservent une forme sphérique lors de la première phase (contraction linéaire) car une contraction du rayon de 10 à 30 % équivaut à diminution de 20 à 60 % en surface, et une déformation aussi grande ne peut pas être absorbée par la compression latérale d'une bicouche lipidique. Cela signifie qu'il y a déjà des invaginations mais qu'elles sont trop petites pour être résolues au microscope optique. C'est en accord avec les suppositions sur la perte de surface active faites par Boroske et Helfrich lors de leurs mesures du coefficient de perméabilité à l'eau (voir partie 1.3.4.3.1).⁸⁴ Une des propositions pour expliquer l'apparition de ces bourgeonnements intravésiculaires est liée à l'excès de surface de la membrane. Le flux d'eau à travers la membrane induit un flux de lipide parallèle, ce qui déséquilibre la quantité de lipides entre les deux feuilletts et induit une forte courbure spontanée locale.

Des expériences de regonflement faites sur ces « vésicules framboises » semblent montrer qu'une partie au moins des vésicules filles est toujours attachée à la membrane de la vésicule mère (figure 1.27.B). Les observations suggèrent que plus la rigidité de courbure k_c de la membrane est élevée plus la taille des invaginations est grande. En revanche les observations diffèrent sur l'homogénéité de leur taille.

Des changements de forme similaires sont attendus pour les polymersomes géants unilamellaires soumis à des chocs hypertoniques si la membrane polymère possède assez de mobilité dans les conditions expérimentales.^{124, 125} Toutefois, même avec une membrane formée par des blocs hydrophobes de faible température de transition vitreuse (T_g), de nombreux comportements ont été observés en fonction de la nature du polymère et de son architecture. La formation de « vésicules framboises » a été observée pour des polymersomes géants unilamellaires de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ et de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀.³⁶ Cependant des formes non axisymétriques ont également été observées pour le PBut₄₆-*b*-PEO₃₀, ainsi que l'apparition de facettes le long de la membrane ou encore l'explosion des vésicules (figure 1.28).

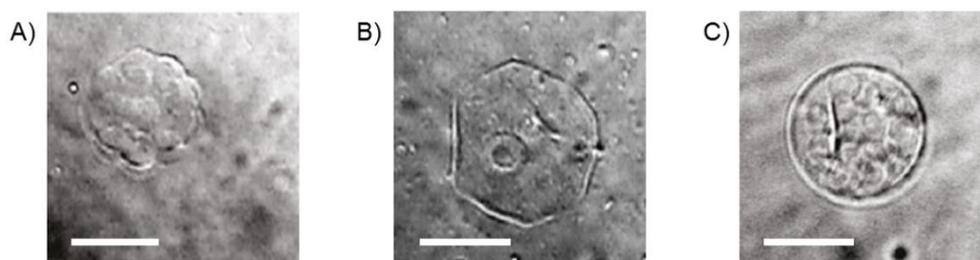


Figure 1.28. A) Vésicule framboise de PDMS-*g*-PEO obtenue après un choc hypertonique. B) Vésicule de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ qui montre des facettes pendant un choc hypertonique. C) Vésicule framboise de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ obtenue après un choc hypertonique (ce n'est pas la même vésicule qu'en B). Les barres d'échelle représentent 20 μm .³⁶

Contrairement aux résultats obtenus pour les membranes lipidiques, qui semblent indiquer une augmentation de la taille des vésicules internes avec la rigidité de courbure de la membrane, les vésicules filles qui apparaissent ont une taille similaire pour les deux copolymères bien que leurs membranes soient supposées avoir des propriétés différentes (en se basant sur la différence de fluidité et d'épaisseur).

Lorenceau *et al.* ont rapporté une structure effondrée sur elle-même pour des vésicules géantes de PBA-*b*-PAA dans des conditions hypertoniques (figure 1.29).⁵³ Un comportement similaire a été rapporté pour des vésicules de PEO-*b*-PLA (poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(acide lactique), 10 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), la rupture de la membrane du polymersome ayant été attribuée au caractère semi-cristallin du PLA.⁵⁶

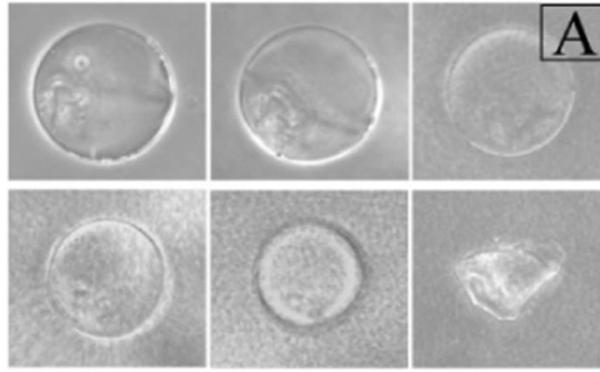


Figure 1.29. Photographies montrant l'évolution d'une vésicule de PBA-*b*-PAA de 70 μm de diamètre soumise à un choc hypertonique. L'intervalle entre deux images successives est de 1 minute, excepté pour les deux dernières images qui sont séparées de 5 minutes.⁵³

Il apparaît que la nature et la nano-structuration de la membrane à une forte influence sur la transformation des vésicules géantes en conditions hypertoniques.

1.3.5.2.3 Choc hypertonique - Vésicules nanométriques

La taille des vésicules, et donc le rayon de courbure de la membrane, est un autre paramètre qui impacte les changements de forme induits par un choc hypertonique. Les études menées sur des vésicules nanométriques de DOPC et d'EPC, qui forment des « vésicules framboises » non décrites par les modèles théoriques à l'échelle microscopique, ont montré une évolution d'une forme sphérique vers des formes d'ellipsoïdes oblates ou prolates (figure 1.30).^{126, 127} A cette échelle, les changements de formes observés pour ces systèmes sont en accord avec les modèles théoriques (voir partie 1.3.5.3).

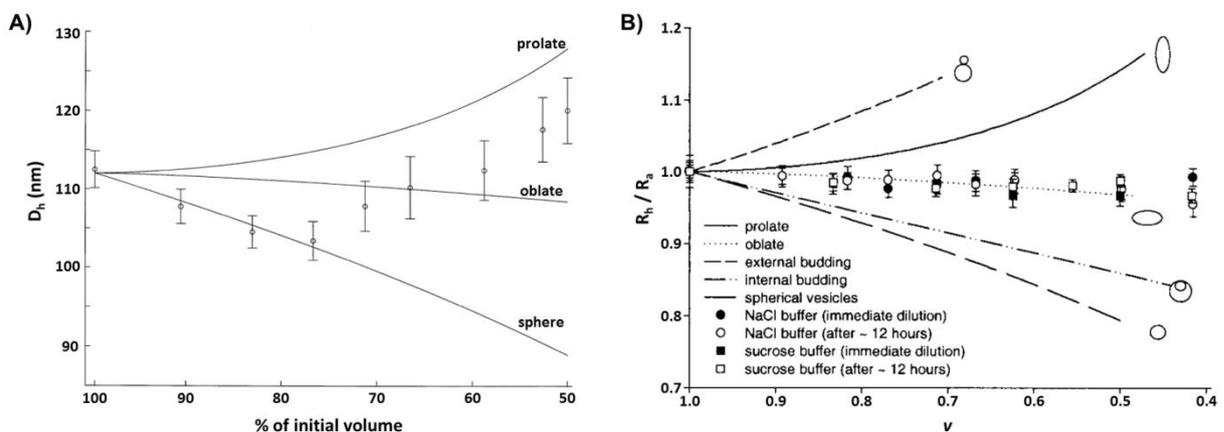


Figure 1.30. A) Evolution de la taille des vésicules d'EPC en fonction de la diminution du volume interne. Les trois lignes sont les modèles correspondant à des vésicules qui seraient restées sphériques, qui auraient formé des ellipsoïdes oblates ou des ellipsoïdes prolates.¹²⁶ B) Evolution de la taille des vésicules de DOPC mesurée par DLS en conditions hypertoniques (deux solutés : cercles = NaCl et carrés = sucrose). Les points pleins correspondent aux mesures faites directement après le mélange et les points blancs à celles faites après 12 heures. Les courbes pleines correspondent aux changements théoriques du rayon hydrodynamique en fonction du volume réduit v pour différentes formes axisymétriques.¹²⁷

Ces résultats ont été obtenus par DLS en comparant les rayons hydrodynamiques mesurés pour différents volumes réduits ν aux rayons hydrodynamiques théoriques que l'on obtiendrait pour les différentes formes de même surface et même volume interne. Le volume réduit ν correspond, pour un objet dont la membrane a une surface A , au ratio entre le volume encapsulé par la membrane (V) et le volume d'une sphère de même surface : $\nu = 3(4\pi)^{1/2}V/A^{3/2}$. Pour ces mesures, la surface moyenne A a été calculée à partir du rayon hydrodynamique mesuré en conditions isotoniques (vésicules sphériques). Le volume réduit ν est ajusté avec le gradient de concentration Δc utilisé pour appliquer le choc hypertonique (en vidant plus ou moins le milieu intravésiculaire pour atteindre l'équilibre des pressions osmotiques).

Les études sur des SUV de DODAB (dioctadecyldiméthylammonium bromide) et de DODAC (dioctadecyldiméthylammonium chloride) ont aussi montré que la nature du soluté utilisé pour faire le choc hypertonique peut avoir une influence sur la morphologie finale.^{128, 129} D'un côté, quand ces vésicules ont été soumises à une pression osmotique induite par une solution de CaCl_2 , les vésicules unilamellaires se sont dégonflées en forme de stomatocytes. Les interactions électrostatiques des têtes polaires (charges cationiques) qui couvrent l'extérieur de la bicouche ont été fortement écrantées par le sel divalent, et les bords de chaque stomatocyte se sont progressivement approchés jusqu'à ce qu'ils fusionnent pour former des vésicules bilamellaires (transformation non réversible, figure 1.31). D'un autre côté, quand une solution de sucrose a été utilisée pour faire le choc hypertonique, seules des formes de lentilles ont été obtenues car les prérequis permettant l'approche et la fusion des bords n'étaient pas remplis (écrantage des charges).

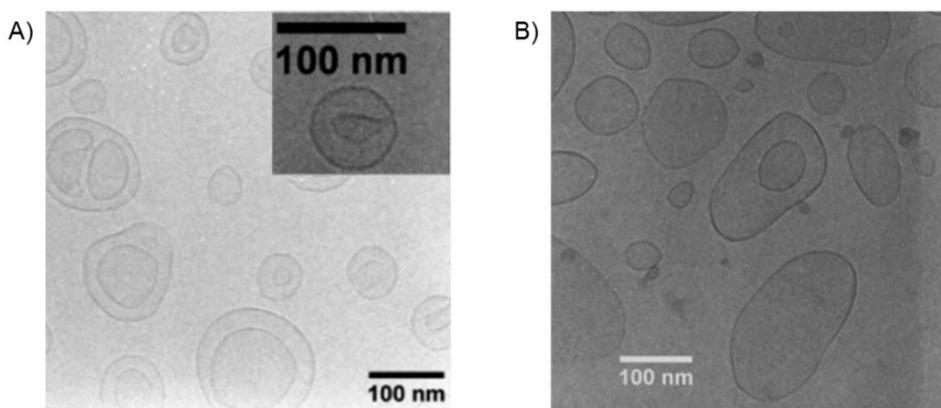


Figure 1.31. Image de cryo-TEM de vésicules de DODAC après un choc hypertonique avec A) une solution de CaCl_2 et B) une solution de sucrose. L'insertion en A correspond à une preuve de l'approche des bords du stomatocyte.¹²⁹

Des structures similaires ont été observées par B. Pitard *et al.*, qui ont étudié l'encapsulation d'ADN dans les liposomes (lipoplexes). Lors d'une expérience de contrôle, des liposomes

unilamellaires ont été soumis à une concentration hypertonique de NaCl ($C_{\text{ext}}-C_{\text{int}}=150$ mM), ce qui a conduit à la formation de vésicules bilamellaires.

Il y a peu de documents disponibles dans la littérature pour décrire le comportement de nano-polymersomes en conditions de choc hypertonique. Kim *et al.* ont étudié la transformation de forme de nano-vésicules de PS-*b*-PEO.¹³⁰ Ces polymersomes sont préparés par nanopréciipitation, en ajoutant 50% d'eau à une solution de polymère dans un mélange Dioxane/THF. Un ajout d'eau très rapide dans le milieu extérieur permet de figer la structure sous sa forme sphérique, mais un ajout d'eau lent (par dialyse) entraîne un changement de forme. En effet, la couche hydrophobe de la membrane est composée de PS. Elle est perméable au solvant organique tant qu'il y en a assez pour la plastifier, mais est imperméable à l'eau. En dialysant la solution de vésicules, un choc hypertonique est appliqué car la concentration en eau est plus élevée dans la phase extérieure (l'eau est le composé auquel la membrane est imperméable). Le milieu intravésiculaire se vide donc de son solvant organique jusqu'à ce qu'il n'y en ait plus assez pour gonfler le bloc de PS et qu'il se rigidifie, figeant ainsi la forme de stomatocyte. Ce changement de forme est en accord avec ce qui a été observé pour les membranes fluides de DODAB et de DODAC.

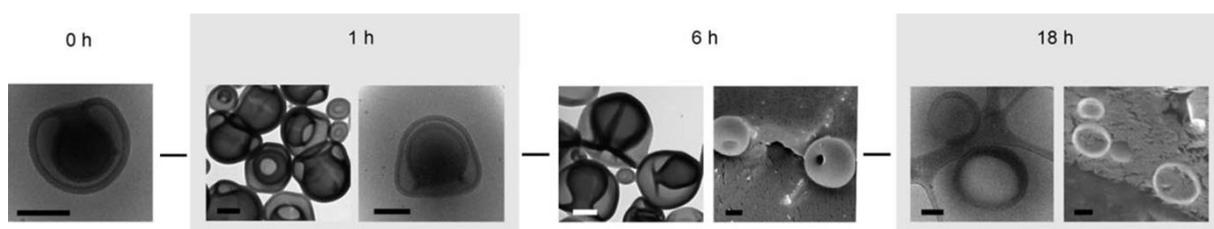


Figure 1.32. Evolution de forme de stomatocytes de PEO-*b*-PS dans le temps illustrée par des images de TEM (images de gauche à 1 h et 6 h), de cryo-TEM (0 h, image de droite à 1 h et image de gauche à 18 h) et de cryo-SEM (images de droite à 6 h et 18 h). Le mélange de solvant organique utilisé pour rendre sa flexibilité au bloc PS est 75 : 25 de THF : Dioxane. Les barres d'échelle représentent 200 nm.¹³¹

En remettant un excès de solvant organique il est possible de rendre son caractère flexible à la membrane de PS, et même de la rendre perméable à l'eau quand il y a une majorité de THF.¹³¹ Ce qui est surprenant est qu'en vidant entièrement le volume intravésiculaire de ces stomatocytes, ce ne sont pas des vésicules bilamellaires mais des structures effondrées sur elles-mêmes (appelées « kippa »)¹³² qui ont été obtenues (figure 1.32). Cette évolution de forme est plutôt associée au comportement d'une coquille élastique^{133, 134} qu'à celui d'une membrane fluide.

Il existe donc de nombreux changements de formes des systèmes vésiculaires en réponse à des conditions hypertoniques.

1.3.5.3 Modèles théoriques

1.3.5.3.1 Diagramme de phase d'un modèle minimaliste

Dans ce modèle, qui est le plus simple, on considère que l'énergie d'une vésicule est :

$$E_{Vésicule} = E_{Courbure} = \frac{k_c}{2} \oint dA(2H)^2 \quad (1.28)$$

Pour arriver à cette expression simplifiée, de nombreuses hypothèses sont nécessaires :

- La membrane est symétrique et son épaisseur est considérée comme négligeable devant le rayon de la vésicule : cela permet de considérer l'énergie de courbure introduite par Helfrich (équation 1.5).
- Il n'y a pas de changement de topologie : l'énergie de courbure Gaussienne est donc nulle.
- La membrane est dans un état fluide, est insoluble et incompressible : l'aire totale de la membrane A est fixée.
- Le volume est contrôlé par la pression osmotique : la pression osmotique est très grande devant l'énergie de courbure (voir partie 1.3.3.2.2), le volume interne de la vésicule s'ajuste donc de manière à ce que l'équilibre des pressions soit vérifié.

Les formes d'équilibre des structures vésiculaires sont obtenues en minimisant l'énergie de courbure de la vésicule. Ces formes dépendent d'un seul paramètre, le volume réduit v , qui dépend de la surface A de la membrane et du volume V qu'elle encapsule :

$$v = V / [(4\pi/3)(A/4\pi)^{3/2}] \quad (1.29)$$

En particulier, elles ne dépendent ni de la taille de la vésicule ni de la rigidité de courbure k_c de la membrane. Les minimas locaux obtenus, correspondant aux formes stationnaires axisymétriques, sont de trois sortes : les vésicules prolates ou en forme d'haltères, les vésicules oblates ou discocytes et les stomatocytes (figure 1.33).

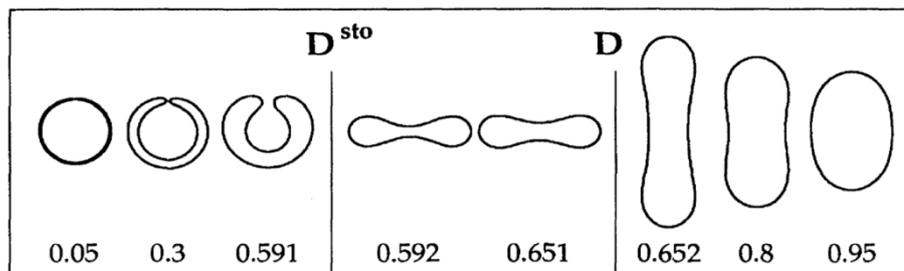


Figure 1.33. Formes d'énergie de courbure minimale pour différents volumes réduits v . Les formes de plus basse énergie sont des vésicules prolates pour $v > 0,65$, des vésicules oblates pour $0,65 > v > 0,59$ et des stomatocytes pour $v > 0,59$.¹³⁵

Ce modèle simple permet de décrire en grande partie les formes des vésicules, les morphologies prédites ayant été observées expérimentalement.¹²² Il n'est en revanche pas complet car certaines formes observées expérimentalement, comme les poires ou les étoiles de mer, n'ont pas été décrites.

1.3.5.3.2 Le modèle ADE (*Area Difference Elasticity*)

La principale lacune du modèle simplifié est qu'il ne tient pas compte de la structure en bicouche de la membrane (qui était considérée comme symétrique). Le modèle de « courbure spontanée », qui englobe la simplification décrite dans la partie 1.3.5.3.1, permet de prendre en compte une asymétrie locale entre les deux feuillet de même aire, ce qui entraîne une courbure spontanée locale c_0 .^{83, 135} Par ailleurs, le modèle de « couplage de la bicouche » considère une asymétrie globale entre les deux feuillet de la bicouche *via* une différence d'aire constante.¹³⁵⁻¹³⁷ Finalement, le modèle ADE réunit les deux principes, à savoir que l'aire de chaque monocouche peut varier globalement et localement.^{82, 138, 139}

Expérimentalement, les deux feuillet de la bicouche d'une vésicule ne possèdent pas la même quantité d'amphiphiles, et cette différence varie d'une vésicule à l'autre. A l'état relaxé, la différence d'aire est définie par le nombre d'amphiphiles que chaque monocouche contient (figure 1.34):

$$\Delta A_0 = A_{ext_0} - A_{int_0} = (N^+ - N^-)a_0 \quad (1.30)$$

avec N^+ le nombre de molécules qui composent la monocouche extérieure, N^- le nombre de molécules qui composent la monocouche interne de la bicouche et a_0 l'aire par molécule à l'équilibre.

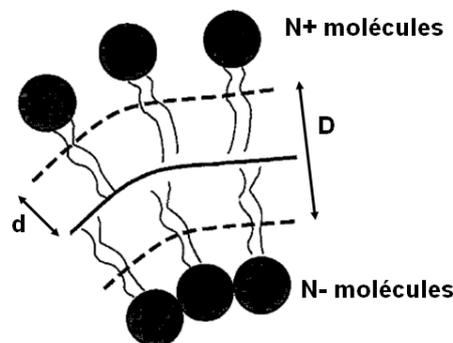


Figure 1.34. Schéma d'une bicouche membranaire d'épaisseur de membrane $D = 2d$.

Il est possible que cette différence d'aire change par transfert de lipides d'un feuillet à l'autre (flip-flop). On décrit donc la différence d'aire réelle entre les deux feuillet par :

$$\Delta A = A_{ext} - A_{int} = 2D \oint dAH \quad (1.31)$$

Les deux énergies prises en compte par le modèle ADE sont donc l'énergie de courbure de la membrane (équation 1.5) et un terme d'énergie de courbure non locale qui correspond à l'énergie qu'il faut fournir pour avoir une différence d'aire ΔA différente de ΔA_0 :

$$E_{ADE} = \frac{\alpha \pi k_c}{2D^2 A} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \quad (1.7)$$

Le paramètre α n'a pas de dimension et dépend du matériau. Il est défini comme suivant :

$$\alpha = \frac{2k^m d^2}{\pi k_c} \quad (1.32)$$

avec k^m le module de compression d'une monocouche, relié à la rigidité de courbure d'une monocouche k_c^m par la formule suivante :

$$k_c^m = \frac{k^m d^2}{3} \quad (1.33)$$

Quand les deux couches sont homogènes on a $k_c = 2 k_c^m$ et alors $\alpha = \frac{3}{\pi}$.

La minimisation de l'énergie de la membrane se fait en fonction de deux paramètres : le volume réduit v et la différence d'aire réduite m_0 qui tient compte de la différence d'aire entre les feuillet à l'état relaxé. La forme d'une vésicule change donc quand on modifie son volume interne ou le nombre d'amphiphiles contenus dans chaque feuillet. Chaque diagramme de phase est calculé pour une valeur définie du paramètre α . Le diagramme de phase obtenu pour $\alpha = 1,4$ est présenté en figure 1.35.

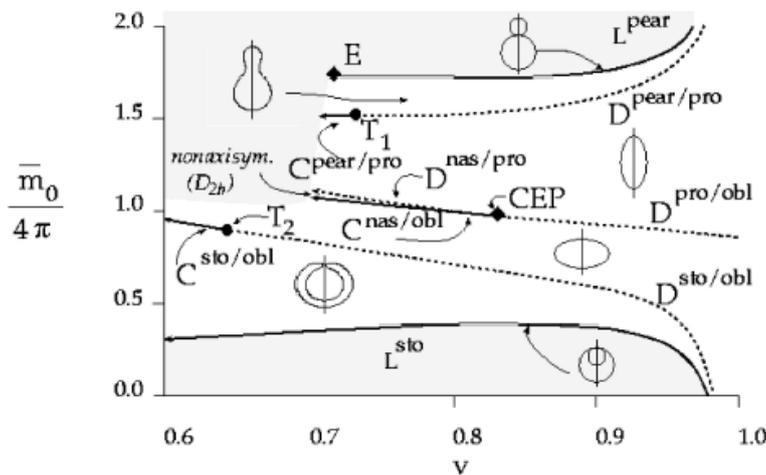


Figure 1.35. Diagramme de phase du modèle ADE obtenu pour $\alpha = 1,4$. Ce diagramme donne les formes de plus faible énergie en fonction de la différence d'aire à l'équilibre réduite $m_0 = \Delta A_0/2DR$ et du volume réduit v .⁸²

1.4 Modification des propriétés de membrane

Les polymersomes ont intrinsèquement une membrane dont les propriétés mécaniques sont plus modulables et souvent supérieures à celles des liposomes. Bien que cela soit un avantage au regard de leur stabilité, ils présentent en contrepartie une faible perméabilité aux petites molécules. Face aux nombreuses applications nécessitant une perméabilité spécifique ou un relargage complet des composés encapsulés (applications de vectorisation *in vivo*), de nouvelles stratégies ont été développées pour pouvoir contrôler les propriétés de la membrane. Dans la majorité des cas, les polymersomes sont formés avec des copolymères dont au moins un des blocs est sensible à un stimulus externe (pH, température, lumière, conditions redox) et leur membrane est déstabilisée afin de libérer les espèces encapsulées.^{5, 25, 26} Pour d'autres applications, telles que les nanoréacteurs, conserver la morphologie vésiculaire est préférable. Dans la partie suivante, des méthodes permettant de modifier les propriétés membranaires des polymersomes tout en maintenant l'intégrité des morphologies vésiculaires sont présentées.

1.4.1 Modification chimique de la membrane

Certains copolymères utilisés pour préparer des structures vésiculaires ont naturellement des groupements réactifs qui permettent la réticulation des membranes. Différentes équipes ont montré qu'il est possible de réticuler les doubles liaisons éthyléniques des blocs hydrophobes de polybutadiène pour augmenter la stabilité des polymersomes (PBut-*b*-PGA¹⁴⁰ et PBut-*b*-PEO¹⁴¹). Les nano-capsules ainsi obtenues sont capables de résister à l'exposition à des solvants organiques (bons solvants du copolymère amphiphile non réticulé) ou encore à des cycles de déshydratation / réhydratation sans perdre le contenu encapsulé dans la vésicule (figure 1.36). De plus, en mélangeant du PEE-*b*-PEO à la membrane de PBut-*b*-PEO avant de la faire réticuler, il est possible de contrôler précisément le module élastique effectif $K_{a\text{eff}}$ ainsi que la déformation maximale à la rupture α_c de la membrane post-réticulation.

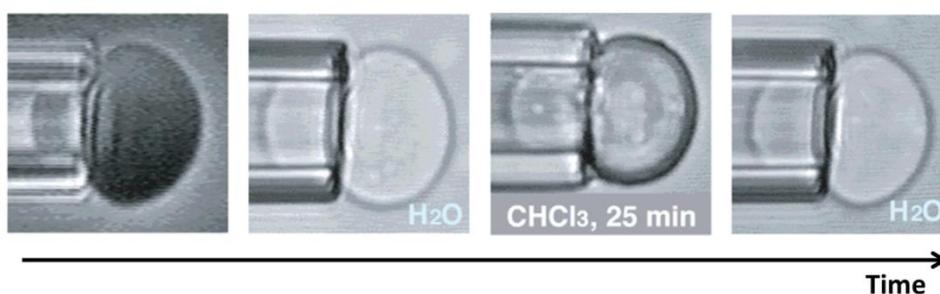


Figure 1.36. Preuve de la stabilité d'une vésicule réticulée de PBut-*b*-PEO suite à son transfert dans du chloroforme puis son retour dans une solution aqueuse (adapté de ¹⁴¹).

L'introduction de groupements latéraux réticulables sur des copolymères sensibles aux conditions extérieures permet d'améliorer les propriétés mécaniques tout en conservant les avantages d'un bloc stimuable. Gaitzsch *et al.* ont ainsi synthétisé des copolymères pH sensibles de PEO-*b*-PDEAEM-*stat*-PDMIBM (poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(diéthyl amino éthyle méthacrylate)-*stat*-poly(3,4-diméthyle maleic imidobutyl méthacrylate)) qui réticulent sous lumière UV.¹⁴² Au contraire des polymersomes avant irradiation UV, ceux dont la membrane a été réticulée peuvent garder un soluté encapsulé quand ils sont soumis à un cisaillement tant que le pH reste élevé (les chaînes de PDEAEM hydrophobes sont sous forme déprotonées à pH = 9). Ces polymersomes conservent également leur capacité à libérer les espèces encapsulées en conditions de pH acide. Dans un autre exemple, Du et Armes ont préparé des copolymères de PEO-*b*-P(DEA-*stat*-TMSPMA) (poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly[2-(diéthylamino)éthyl méthacrylate-*stat*-3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate] qui s'auto-assemblent sous forme de vésicules dans un mélange eau / THF. Le TMSPMA, qui forme la couche hydrophobe avec le PDEA, est ensuite réticulé *in situ* par réaction sol-gel. En se plaçant à un pH < 7 le PDEA passe sous forme protonée, ce qui crée des sites de « fuites » dans la couche hydrophobe de la membrane et augmente sa perméabilité.¹⁴³

Finalement, il est possible de directement ajouter des composés réactifs dans les membranes des polymersomes, sans que ceux-ci soient liés aux copolymères amphiphiles, et de les faire réagir pour modifier les propriétés de la membrane. Du et Armes ont ainsi stabilisé des membranes de PCL-*b*-PMPC (polycaprolactone-*b*-poly((2-méthacryloyloxy)éthyl phosphorylcholine)) en accumulant du TMOS (tetraméthyl orthosilicate), un précurseur de la silice, dans le cœur hydrophobe de PCL de la membrane avant de former une coquille hybride organique/inorganique par réaction sol-gel *in situ*.¹⁴⁴ Cette stratégie peut également être utilisée pour rendre des membranes semi-perméables. Spulber *et al.* ont montré qu'en ajoutant de la 2-hydroxy-4'-2-(hydroxyéthoxy)-2-méthylpropiophenone dans les membranes de polymersomes de PMOXA-*b*-PDMS-*b*-PMOXA et de PBut-*b*-PEO, puis en les exposant à une irradiation UV, ceux-ci deviennent perméables à de petites molécules organiques.¹⁴⁵ Cet effet a été confirmé en suivant la transformation de différents substrats ajoutés dans la solution de vésicules par de la peroxydase de raifort, une enzyme préalablement encapsulée dans les vésicules (figure 1.37).

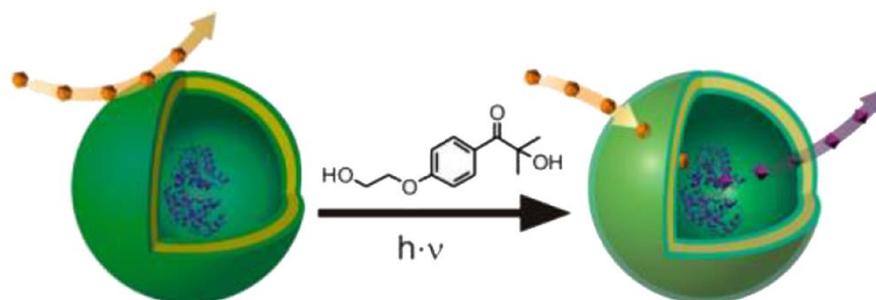


Figure 1.37. Représentation schématique de la perméabilisation de la membrane des polymersomes de PMOXA-*b*-PDMS-*b*-PMOXA et de PBut-*b*-PEO par de la 2-hydroxy-4'-2-(hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone.¹⁴⁵

1.4.2 Canaux membranaires

Un procédé élégant pour modifier les propriétés des polymersomes, particulièrement leur perméabilité, tout en conservant la morphologie vésiculaire est l'utilisation de composés qui vont permettre le passage de molécules à travers la membrane. Ce sont en général des protéines transmembranaires, qui sont présentes dans les membranes biologiques pour réguler les échanges avec le milieu extérieur ou assurer la communication cellulaire, ou de petites molécules lipophiles qui complexent les ions et leur font franchir les membranes.

1.4.2.1 Protéines transmembranaires

Les protéines transmembranaires s'insèrent dans les membranes et autorisent la diffusion de molécules *via* leurs pores. Certains canaux protéiques sont toujours ouverts (ces protéines sont appelées des porines) et la diffusion de molécules n'est pas spécifique. D'autres protéines ne s'ouvrent que sous l'application d'un stimulus extérieur (ions, température, tension) ou ne permettent le passage que de certaines molécules. Diverses protéines ont été reconstituées avec succès dans la membrane de polymersomes, les rendant ainsi semi-perméables (tableau 1.2).

| Copolymère | Protéine | Intérêt |
|---|-----------------------|--|
| PMOXA- <i>b</i> -PDMS- <i>b</i> -PMOXA ($M_w = 9000$ g/mol) | OmpF | Preuve de concept, ¹⁴⁶ transports de substrats enzymatiques, ¹⁴⁷ de protons ¹⁴⁸ et d'ampicilline ¹⁴⁹ |
| | Maltoporine | Preuve de concept ¹⁴⁶ |
| | Tsx | Transport de nucléosides et nucléotides ¹⁴⁷ |
| | LamB | Récepteur de bactériophages ¹⁵⁰ |
| | FhuA et FhuA modifiée | Transport de fluorophores, d'ADN ou de substrats enzymatiques ¹⁵¹ |
| | OmpF modifiée | Canaux pH sensibles ¹⁵² |
| PMOXA ₁₅ - <i>b</i> -PDMS ₁₁₀ - <i>b</i> -PMOXA ₁₅ | AquaporineZ | Augmente la perméabilité à l'eau ³⁰ |

| | | |
|--|------------------------------|--|
| PEtOz- <i>b</i> -PDMS- <i>b</i> -PEtOz ($M_n = 7800$ g/mol) | Bacteriorhodopsin | Pompe à protons sous illumination ¹⁵³ |
| PMOXA _m - <i>b</i> -PDMS _n - <i>b</i> -PMOXA _m (couples [m=21, n=69], [13, 62], [15, 60] et [13, 23]) | Complexe NADH :Ubiquinone | Transport d'électrons, oxydoréduction. Influence de la taille des blocs sur l'activité du complexe ¹⁵⁴ |
| PEO ₂₅ - <i>b</i> -PDMS ₄₀ - <i>b</i> -PMOXA ₁₁₀ PMOXA ₂₀ - <i>b</i> -PDMS ₇₅ - <i>b</i> -PMOXA ₂₀ PMOXA ₄₅ - <i>b</i> -PDMS ₄₀ - <i>b</i> -PEO ₆₇ | Aquaporine 0 | Orientation des protéines reconstituées dans des membranes asymétriques ¹⁵⁵ |
| PBut ₁₀ - <i>b</i> -PEO ₁₂ PBut ₁₄ - <i>b</i> -PEO ₂₂ PMOXA ₂₀ - <i>b</i> -PDMS ₄₂ - <i>b</i> -PMOXA ₂₀ PMOXA ₁₂ - <i>b</i> -PDMS ₅₅ - <i>b</i> -PMOXA ₁₂ | Aquaporine 0 | Augmente la perméabilité à l'eau ¹⁵⁶ |

Tableau 1.2. Systèmes de polymersomes dans lesquels des protéines ont été reconstituées sans dénaturer leur activité biologique.

Il est surprenant que ces protéines, optimisées par la nature pour s'insérer dans des membranes lipidiques, conservent leur fonctionnalité en dépit du fait que les membranes polymères soient généralement plus épaisses (~10 nm). Certaines conditions sont en réalité nécessaires, car il faut que la membrane adopte localement les dimensions de la protéine.¹⁵⁷ Principalement deux phénomènes entrent en jeu : la ségrégation locale des chaînes autour de la protéine (due à la polydispersité) et un profil de compression qui apparaît autour de la protéine (figure 1.38). C'est la raison pour laquelle la quasi-totalité des inclusions de protéines naturelles est faite sur des vésicules dont le cœur hydrophobe de la membrane est composé de PDMS : ce bloc hydrophobe extrêmement flexible permet à la membrane d'accepter les contraintes géométriques et dynamiques requises pour ne pas dénaturer la protéine transmembranaire sans que ce soit thermodynamiquement trop défavorable. Dans le seul exemple utilisant des membranes de PBut-*b*-PEO, plus élastiques, il n'est pas surprenant de voir que les dimensions des copolymères sont similaires à celles de lipides classiques.

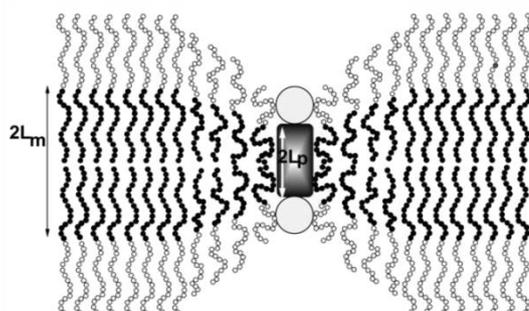


Figure 1.38. Conformation des chaînes polymères autour de l'inclusion d'une protéine transmembranaire dans une bicouche polymère. L'épaisseur de la bicouche plate est $2L_m$ et celle de l'inclusion est $2L_p$.¹⁵⁷

De plus, de nombreux pores transmembranaires ont une orientation directe, ce qui signifie que lors de leur reconstitution dans les membranes des polymersomes ils adoptent une orientation aléatoire qui bloque ainsi statistiquement environ 50% des canaux. En utilisant un copolymère tribloc asymétrique ABC il est possible de former des membranes avec le bloc A ou le bloc C à l'extérieur de la vésicule, formant ainsi une membrane asymétrique qui oriente les protéines lors de leur incorporation dans la membrane.¹⁵⁵

Une alternative à la reconstitution de protéines transmembranaires naturelles dans les membranes, qui apparaît comme étant très contraignante, est l'incorporation dans la membrane de canaux artificiels. Des dipeptides dendritiques et des esters dendritiques ont été introduits avec succès dans des membranes de PBut-*b*-PEO.¹⁵⁸ Ils s'auto-assemblent sous formes de pores hélicoïdaux dans les membranes de ces polymersomes et permettent ainsi d'augmenter la perméabilité des membranes aux protons. Cela a été montré en encapsulant un fluorophore sensible au pH dans les polymersomes et en modifiant le pH du milieu extravésiculaire : les polymersomes seuls sont imperméables aux protons, alors que cette perméabilité augmente proportionnellement à la quantité de pores dendritiques formés dans leurs membranes. Cet effet est plus prononcé avec les esters dendritiques car ils sont plus stables et plus solubles dans les membranes que les dipeptides. Il est intéressant de noter que les résultats sont mauvais avec des membranes de PMOXA-*b*-PDMS-*b*-PMOXA à cause de la mauvaise solubilité de ces composés dans ces membranes.¹⁵⁸

En plus de modifier la perméabilité des membranes aux protons, l'incorporation de ces composés dendritiques change les propriétés mécaniques de la membrane.¹⁵⁸ L'évolution du module élastique K_a dépend à la fois de la quantité et de la nature du composé ajouté. Pour l'ester dendritique, un ramollissement de la membrane est observé pour des quantités allant jusqu'à 11%mol et un léger durcissement pour des quantités plus élevées. En revanche, l'incorporation du dipeptide dendritique conduit à une baisse du module élastique K_a pour des quantités très faibles (1%) puis à une nette augmentation, même pour des quantités faibles (5%). Les auteurs suggèrent que le dipeptide s'agrège une fois sa limite de solubilité dans la membrane franchie, ce qui conduit à ce durcissement. Dans tous les cas la déformation maximale à la rupture α_c est très peu changée, ce qui confirme la stabilité de l'incorporation de ces composés dans les membranes de PBut-*b*-PEO.

1.4.2.2 Ionophores

Les ionophores sont des composés qui vont augmenter de manière sélective la perméabilité des membranes aux ions. Pour cette raison, ils peuvent être utilisés comme antibiotiques afin d'augmenter la perméabilité des membranes cellulaires aux cations alcalins d'importance physiologique. Certains ionophores, telle que l'Alaméthicine, sont des peptides qui forment des canaux perméables aux ions quand ils sont agrégés dans les membranes.¹⁵⁹ Une deuxième classe d'ionophores, communément appelée transporteurs d'ions, regroupe les molécules lipophiles qui permettent le passage des ions à travers les membranes hydrophobes en formant des complexes neutres. Plusieurs transporteurs d'ions présentent une très grande sélectivité, par exemple la valinomycine complexe majoritairement les cations monovalents alors que l'A23187 est beaucoup plus spécifique des cations divalents.¹⁶⁰

L'A23187 (figure 1.39), aussi appelée calcimycine, est un ionophore qui a un intérêt particulier dans le cadre de cette étude bibliographique car il a été utilisé dans divers systèmes impliquant des structures vésiculaires.^{4, 161} Le classement des affinités de cet ionophore avec les cations divalents a été établi par Pfeiffer *et al.*¹⁶⁰: $Mn^{2+} \gg Ca^{2+} \sim Mg^{2+} \gg Sr^{2+} > Ba^{2+}$. Le seul cation monovalent qui a un peu d'interactions avec la calcimycine est Li^+ mais dans tous les cas les liaisons formées sont beaucoup plus faibles qu'avec les ions divalents. En revanche, il a été montré que le transport de certains cations trivalents, particulièrement Nd^{3+} et La^{3+} , peut être aussi efficace que celui des ions calcium Ca^{2+} .¹⁶²

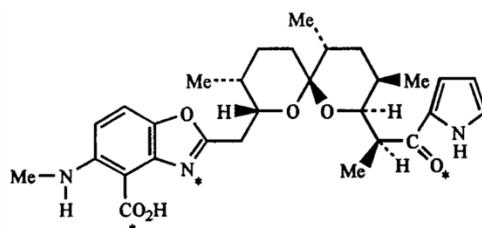


Figure 1.39. Structure chimique de la calcimycine.¹⁶²

Sous sa forme ionisée, cet ionophore ne peut pas passer à travers les membranes. C'est la formation d'un complexe neutre entre deux molécules de calcimycine et un ion métallique divalent qui permet de franchir la barrière hydrophobe. Chaque cation divalent est échangé contre deux protons pour maintenir l'électroneutralité à travers la membrane, il faut donc veiller à ce que le milieu qui s'enrichi en ions divalents contienne assez d'ions H^+ .¹⁶³ C'est d'autant plus important que l'efficacité du transfert de calcium est sensible au pH environnant mais également à un gradient de pH qui pourrait s'établir entre les milieux séparés par la membrane à cause du transfert de protons.

Les polymersomes sont intrinsèquement très peu perméables aux ions Ca^{2+} , et l'ajout de calcimycine dans leur membrane à un instant précis permet de brusquement accroître cette perméabilité. Picker *et al.* ont utilisé cet effet pour faire précipiter de manière contrôlée du carbonate de calcium CaCO_3 dans des vésicules de $\text{PDMS}_{22}\text{-g-PEO}_{12}$.⁴ Les vésicules ont été préparées avec une solution intravésiculaire contenant 4 mM de Na_2CO_3 et des ions Ca^{2+} ont été ajoutés dans la phase extérieure. L'ajout de calcimycine dans le milieu extravésiculaire permet de déclencher la perméabilité aux ions calcium, et en quelques minutes de nombreux précipités de carbonate de calcium amorphe apparaissent dans les polymersomes (figure 1.40).

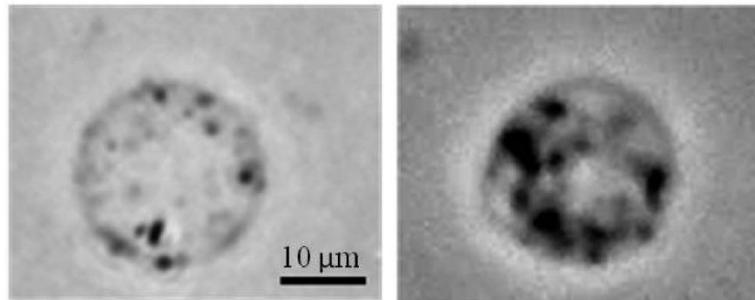


Figure 1.40. Vésicules de PDMS-g-PEO avec des précipités de carbonate de calcium intravésiculaires.⁴

Dans une autre optique, l'incorporation de calcimycine dans la membrane de liposomes encapsulant un agent chélatant ayant une forte affinité avec les cations divalents permet de faire des systèmes qui absorbent les cations métalliques (MSVs : Metal-Sorbing Vesicles).¹⁶¹ Ces structures peuvent servir dans des applications de dépollution, comme l'extraction d'ions métalliques toxiques ou radioactifs d'un milieu aqueux.

1.4.3 Formulation de la membrane : mélange d'amphiphiles

Une voie prometteuse est l'utilisation de plusieurs composés pour former les membranes des vésicules. Ce moyen, simple à mettre en œuvre, autorise de très nombreuses combinaisons entre les copolymères à blocs, les lipides et des particules qui s'insèrent dans la membrane. Les possibilités ainsi ouvertes sont nombreuses, allant de l'association de la grande robustesse des polymersomes à une perméabilité contrôlée - en mélangeant des copolymères neutres de fort poids moléculaire à des copolymères sensibles à un stimulus externe - jusqu'à la formation de structures membranaires sophistiquées, avec la création de « domaines » pouvant présenter des propriétés particulières dans les membranes. L'incorporation de particules n'est pas détaillée dans cette partie, le lecteur peut se référer à des revues spécialisées pour plus d'informations sur ce sujet.¹⁶⁴

1.4.3.1 Mélanges polymère / polymère

La première expérience utilisant ce principe a permis de modifier le profil de délivrance d'un composé encapsulé dans une vésicule en hydrolysant sélectivement un des composants de la membrane. Les vésicules ont été préparées en mélangeant à différentes compositions un copolymère avec un bloc hydrolysable, le PEO-*b*-PLA ou le PEO-*b*-PCL, et un copolymère non dégradabile, le PBut-*b*-PEO.¹⁶⁵ Les résultats montrent que plus la fraction de copolymère hydrolysable est élevée, plus le relargage est rapide. Au cours de l'hydrolyse, des pores hydrophiles se forment au sein d'une matrice PBut-*b*-PEO car la dégradation des blocs PLA ou PCL tend à les ségréger.

Il est possible de former des domaines à la surface des polymersomes grâce à la tendance naturelle de copolymères dissemblables à se séparer. LoPresti *et al.* ont montré que des polymersomes « tachetés » sont obtenus quand deux copolymères dont la nature chimique ou la taille du bloc hydrophobe n'est pas la même sont mélangés (le PEO₁₆-*b*-PBuO₂₂, $M_w = 1910\text{Da}$, et le poly((2-méthacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine)-*b*-poly(2-(diisopropylamino)ethyl méthacrylate) (PMPC₂₅-*b*-PDPA₇₀, $M_w = 21600\text{ Da}$)).¹⁶⁶ Ils observent que la phase continue est formée par le composé majoritaire et que la morphologie des domaines, qui dépend de la proportion de chaque copolymère utilisé, est la même aux échelles micro et nanométriques (figure 1.41). Au contraire des « rafts » lipidiques dans la membrane de liposomes où la séparation de phase se fait en quelques minutes, elle est très longue pour les mélanges de copolymères et la morphologie peut évoluer pendant environ un mois.

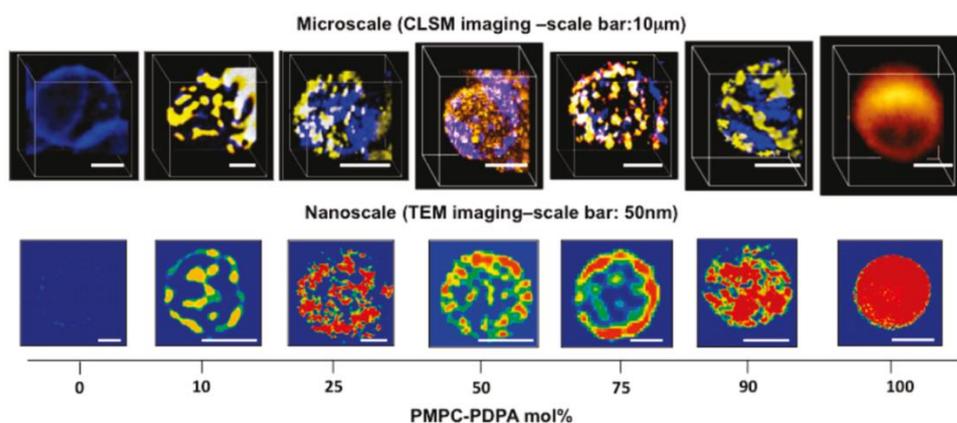


Figure 1.41. Polymersomes hybrides de PMPC₂₅-*b*-PDPA₇₀ / PEO₁₆-*b*-PBuO₂₂ préparés à différentes compositions. Haut : reconstruction 3D à partir d'images de microscopie confocale montrant la morphologie à l'échelle microscopique. Bas : images TEM filtrées par FFT obtenues par coloration sélective des polymersomes montrant la morphologie à l'échelle nanométrique.¹⁶⁶

La création de domaines sur la surface des polymersomes peut aussi être contrôlée par l'ajout de composants extérieurs. Christian *et al.* ont formé des domaines à la surface de polymersomes de PBut-*b*-PEO / PBut-*b*-PAA en ajoutant des cations divalents (calcium, cuivre et baryum) dans la solution de vésicules.¹⁶⁷ Cela crée des pontages électrostatiques entre les charges anioniques des chaînes de PAA, provoquant la ségrégation latérale des copolymères (figure 1.42). Un aspect particulièrement important de ces résultats est que les différentes phases présentent des propriétés distinctes et qu'il est possible de faire évoluer les propriétés d'une seule phase. Cela a été montré par des mesures d'élasticité apparente E_{app} par aspiration dans une micropipette, où il faut une pression de 70 Pa pour obtenir une aspiration de la phase de PBut-*b*-PEO et une pression de plus de 500 Pa pour la phase de PBut-*b*-PAA. Cette valeur varie pour les domaines de PBut-*b*-PAA en fonction du pH et de la concentration en calcium : plus le pH est élevé ($pH > pK_{a\ PAA} \sim 5$), plus la surface est chargée négativement et plus il y a de pontages par les ions calcium, donc plus la surface se rigidifie. Le même phénomène est observé quand la concentration en ions calcium augmente.¹⁶⁷ La taille des domaines peut être modifiée en rajoutant de la soude ou de l'EDTA dans la solution extérieure.¹⁶⁸

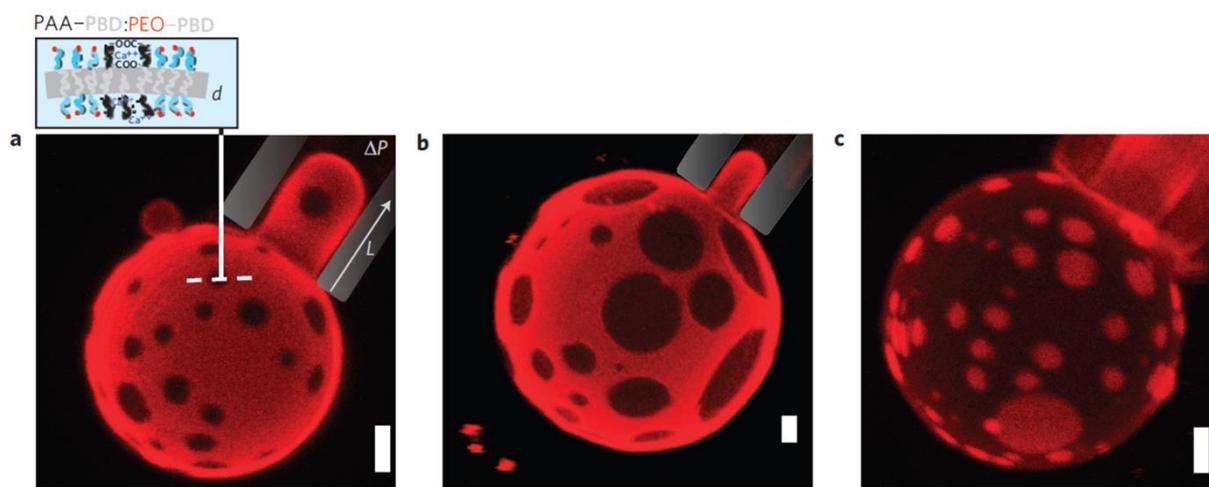


Figure 1.42. Ségrégation latérale induite par des cations dans la membrane de polymersomes hybrides de PBut-*b*-PAA / PBut-*b*-PEO* (avec marqueur fluorescent) préparés à $pH = 4$ avec 0,1 mM de calcium. Les compositions des membranes sont a) 25%, b) 50% et c) 75% en PBut-*b*-PAA.¹⁶⁷

Finalement, Nikova *et al.* ont montré qu'il est possible de modifier l'épaisseur de membrane de polymersomes formés par du PBA-*b*-PAA, et donc leurs propriétés mécaniques, en ajoutant des homopolymères hydrophobes de PBA dans les membranes de vésicules.¹⁶⁹

1.4.3.2 Mélanges polymère / lipide

Le bénéfice que pourrait apporter des structures hybrides polymère / lipide serait de présenter à la fois les avantages des liposomes et des polymersomes. La modulation des propriétés de membrane serait probablement liée à la structuration de la membrane hybride : une répartition statistique (homogène) des constituants pourrait permettre de directement contrôler les propriétés de membrane, et des structures hétérogènes combiner la robustesse d'une matrice polymère à la perméabilité de domaines lipidiques (nanométriques ou micrométriques). Dans une approche biomimétique, la formation de domaines lipidiques similaires aux 'rafts' dans les membranes améliorerait la biofonctionnalité de la surface, ceux-ci étant reliés à de nombreuses activités biologiques telle que la reconnaissance virale.

1.4.3.2.1 Formation de vésicules hybrides

Le premier système basé sur l'incorporation de lipides dans une membrane polymère a été publié en 2005. Ruyschaert *et al.* ont formé des vésicules hybrides mélangeant du PMOXA-*b*-PDMS-*b*-PMOXA ($M_w = 9000$ g/mol) et plusieurs lipides (EPC, Egg-phosphatidylethanolamine (EPE) et Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)) à différentes compositions.¹⁷⁰ Leurs résultats indiquent une répartition homogène dans les membranes à toutes les compositions, et ce pour des vésicules géantes et nanométriques. Depuis cette preuve de concept, divers systèmes ont été utilisés pour former des vésicules hybrides (tableau 1.3).

| Copolymère | Lipide | Membrane |
|---|---|---|
| PMOXA- <i>b</i> -PDMS- <i>b</i> -PMOXA ($M_w = 9000$ g/mol) | EPE / EPC | EPE/EPC : homogène ¹⁷⁰ |
| | DPPC | DPPC : homogène ¹⁷⁰ |
| PBut ₄₆ - <i>b</i> -PEO ₃₀ | 1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero phosphocholine (POPC) | DPPC : homogène ($T > T_m$) et hétérogène ($T < T_m$) ¹⁷¹ |
| | DPPC | POPC, DLPC et DC ₁₃ PC : homogènes sans cholestérol et hétérogènes avec cholestérol ¹⁷¹⁻¹⁷³ |
| | 1,2-di-lauryoyl- <i>sn</i> -glycero phosphocholine (DLPC) 2-ditridecanoyl- <i>sn</i> -glycero phosphocholine (DC ₁₃ PC) | |
| PBut ₂₂ - <i>b</i> -PEO ₁₃ | Hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC) | HSPC : homogène ¹⁷⁴ |
| | POPC | POPC : homogène ¹⁷⁵ |
| | | |

| | | |
|--|---|---|
| A : PIB ₈₇ - <i>b</i> -PEO ₁₇ B : PIB ₃₇ - <i>b</i> -PEO ₄₈ | DPPC | A : hétérogène pour 20-28% en copolymère sinon homogène ; membrane trouée jusqu'à 14% en copolymère ¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ B : homogènes avec une membrane trouée (<40%) |
| PDMS ₂₂ - <i>g</i> -PEO ₁₂ | DPPC POPC | DPPC : hétérogène jusqu'à 80% copolymère puis homogène ¹⁷⁹ POPC : homogène pour >50% polymère sinon séparation de phase ($\geq 60\%$) ¹⁷⁹ |
| PDMS ₆₀ - <i>b</i> -PMOXA ₂₁ | 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (DMPC) | Homogène ¹⁸⁰ |

Tableau 1.3. Différents copolymères et lipides utilisés pour formuler des vésicules hybrides, ainsi que la structuration de membrane obtenue.

Le paramètre de solubilité (δ) de la partie hydrophobe des lipides et des copolymères à blocs utilisés sont relativement proches : $\delta = 9,1 \text{ cal}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$ pour les chaînes aliphatiques des lipides, $\delta = 7,3 \text{ cal}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$ pour le PDMS, $\delta = 7,7 \text{ cal}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$ pour les chaînes de PIB (poly(isobutylène)) et $\delta = 8,32 \text{ cal}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$ pour le PBut.¹⁸¹⁻¹⁸³ De plus, les blocs hydrophobes des copolymères présentent tous une température de transition vitreuse basse : $T_g \text{ PDMS} = -127^\circ\text{C}$, $T_g \text{ PIB} = -78^\circ\text{C}$ et $T_g \text{ PBut} = -31^\circ\text{C}$. Ces valeurs suggèrent que la compatibilité chimique entre les composants ainsi que la fluidité de la matrice polymère sont des points clés pour la formation de telles vésicules hybrides.

La concordance de la taille des parties hydrophobes semble également être un paramètre important. La formation de vésicules hybrides géantes de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ / POPC a été observée pour une gamme de composition seulement.^{172, 173} Au-delà de 70% en polymère, des vésicules hybrides avec une répartition qui semble homogène dans la membrane ont été formées (il est toutefois possible d'avoir une séparation de phase plus petite que la résolution des microscopes optiques). En dessous de 35% en polymère, ils observent un mélange de liposomes et de vésicules hybrides, qui semblent toujours homogènes. En revanche, aucune vésicule géante n'est formée pour des compositions intermédiaires. L'utilisation d'un copolymère de plus faible masse molaire, le PBut₂₂-*b*-PEO₁₄, lève cette restriction car des vésicules géantes hybrides sont obtenues pour toutes les compositions.¹⁷⁵ Ces observations semblent aussi vraies pour la formation de vésicules hybrides à l'échelle nanométrique.

1.4.3.2 Structuration de la membrane

Bien que l'ensemble des phénomènes mis en jeu lors de la formation de ces structures ne soient pas encore complètement compris, certaines tendances peuvent être dégagées sur les conditions qui favorisent la formation de domaines dans la membrane des vésicules hybrides.

La fraction de chaque composant introduite dans le mélange est importante pour un couple polymère / lipide donné. Pour des compositions en PIB₈₇-*b*-PEO₁₇ allant de 10 à 18 % et de plus de 30%, Schulz *et al.* ont observé la formation de vésicules hybrides géantes de PIB₈₇-*b*-PEO₁₇ / DPPC avec une membrane homogène.¹⁷⁶ Seules les fractions en copolymère entre 20 et 28% permettent la formation de domaines. Chemin *et al.* ont montré que la gamme de composition qui permet de former des membranes hétérogènes stables est bien plus large pour les mélanges PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ / DPPC (figure 1.43), probablement grâce à la similarité des épaisseurs de membrane formées par les composés purs.¹⁷⁹ Ils ont également observé que pour des mélanges utilisant le POPC (un lipide fluide à température ambiante) comme composé majoritaire, des vésicules hybrides présentant des domaines sont obtenues et une séparation de phase complète s'opère en quelques heures. Cela met en avant l'importance de la fluidité de la phase lipidique sur au moins la stabilité de ces structures.

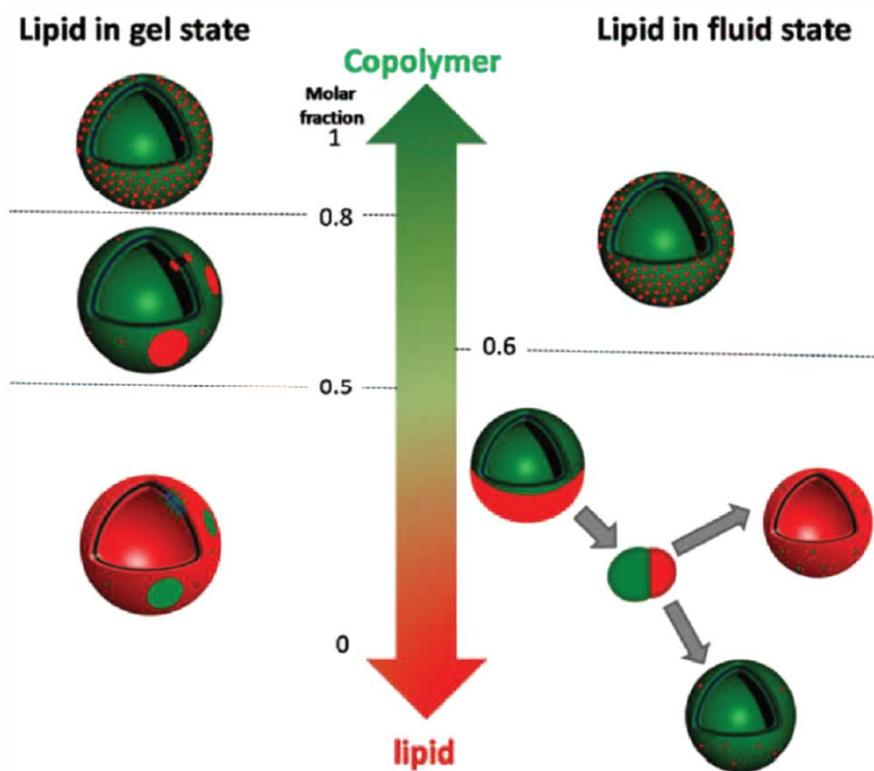


Figure 1.43. Schéma des différentes structures hybrides obtenues avec le copolymère PDMS-*g*-PEO en fonction de la composition du mélange et de la fluidité du lipide utilisé à température ambiante.¹⁷⁹

Il y a plusieurs moyens de déclencher la séparation de phase des composants d'une membrane homogène pour induire la formation de domaines. Le mélange 60% PBut_{46-b}-PEO₃₀ / 40% DPPC forme des membranes homogènes quand la température du système est supérieure à la température de transition coopérative T_m du DPPC et des membranes hétérogènes quand la température est inférieure.¹⁷¹ Lors de cette transition, parfaitement réversible, la vitesse de refroidissement autorise le contrôle de la taille des domaines : plus celle-ci est rapide plus les domaines formés sont petits. La morphologie des domaines lipidiques, en étoile pour le DPPC seul, peut aussi être modifiée en ajoutant du cholestérol dans le mélange copolymère / lipide. En effet, cela perturbe l'empilement des lipides et leur confère une plus grande mobilité, ce qui permet aux zones lipidiques d'adopter une forme circulaire pour minimiser la tension de ligne entre les différentes phases. L'ajout d'une fraction importante de cholestérol (>15%) dans des membranes de PBut_{46-b}-PEO₃₀ / POPC permet également de former des domaines, ces mélanges conduisant normalement à des membranes homogènes, car cela augmente l'ordre des phase lipidiques L_α désordonnées.¹⁷¹

La ségrégation des deux composés peut être forcée par la réticulation d'un des constituants de la membrane. Nam *et al.* ont utilisé ce principe pour forcer l'apparition de domaines dans des membranes de PBut_{46-b}-PEO₃₀ / POPC en greffant de la biotine sur le copolymère ou le lipide et en ajoutant de la NeutrAvidin dans le milieu extérieur.¹⁷²

1.4.3.2.3 Propriétés et fonctionnalité de ces systèmes

Chaque type de structure formée, *i.e.* homogène ou hétérogène, présente des avantages. Les mesures du module élastique K_a ou de la déformation maximale à la rupture α_c faites sur des vésicules hybrides géantes homogènes par micropipette indiquent des propriétés mécaniques intermédiaires à celles des vésicules formées par les composés purs.^{172, 174} Les mesures de coefficient de diffusion latérale confirment ces observations : l'ajout de POPC (fluide) dans les membranes de PBut_{46-b}-PEO₃₀ ou l'ajout de PIB_{87-b}-PEO₁₇ dans les membranes de DPPC (gel) permet d'augmenter la mobilité des différents composants dans les membranes.^{172, 178} Des résultats similaires ont été obtenus pour des vésicules à l'échelle nanométrique : plus il y a de lipide dans des vésicules hybrides de PBut_{22-b}-PEO₁₄ / POPC plus la délivrance d'un composé encapsulé (carboxyfluorescéine) est rapide (figure 1.44).¹⁷⁵ De plus, les propriétés mécaniques mesurées sur des vésicules hybrides nanométrique avec une membrane homogène sont elles aussi situées entre les valeurs obtenues pour les composés purs.¹⁸⁰

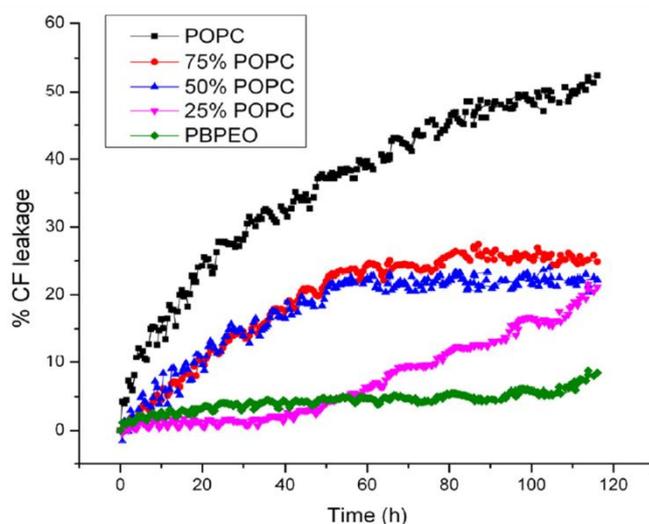


Figure 1.44. Profil de délivrance de carboxyfluorescéine encapsulée dans des vésicules hybrides de PBut₂₂-*b*-PEO₁₄ / POPC à différentes compositions.¹⁷⁵

La présence de domaines lipidiques présentant des propriétés autres que celles de la matrice polymère peut avantageusement être utilisée. Olubummo *et al.* ont incorporé des particules de CdSe recouvertes d'une couche de chaînes hydrophobes de PIB dans les membranes de vésicules hybrides DPPC / PIB₈₇-*b*-PEO₁₇.¹⁷⁷ Pour une composition de 84% en polymère, les membranes formées sont homogènes et les particules se répartissent dans l'intégralité de la membrane. En revanche, pour une composition de 80% en lipide, une séparation de phase est observée et les particules s'insèrent préférentiellement dans la phase riche en lipides. Dans un autre exemple, Nam *et al.* ont utilisé une enzyme qui digère les lipides (phospholipase A₂ – PLA₂) afin de dégrader les domaines de DPPC d'une membrane de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ / DPPC et ainsi permettre la libération d'un fluorophore encapsulé avant que la matrice de polymères ne se referme.¹⁷¹

1.5 Conclusion

L'auto-assemblage d'amphiphiles en solution permet de former de nombreuses structures organisées aux échelles nanométriques et micrométriques. Parmi elles, la morphologie vésiculaire rencontre un grand succès grâce à sa capacité à encapsuler un milieu différent de la solution extérieure, ce qui est nécessaire pour des applications allant de la vectorisation aux nanoréacteurs. Le contrôle des propriétés intrinsèques de la membrane s'effectue à de multiples niveaux. Les lipides forment des membranes perméables mais relativement fragiles, au contraire des copolymères amphiphiles qui conduisent à des vésicules beaucoup plus robustes mais peu perméables. Parmi les voies actuellement explorées pour moduler les propriétés des vésicules, la formulation de la membrane offre de remarquables opportunités. Il est par exemple possible d'augmenter la perméabilité spécifique de certaines espèces en utilisant des canaux membranaires spécifiques. Il serait également possible de combiner les forces des différentes natures de membranes, polymères et lipidiques, en formant des vésicules hybrides. Cependant, ces systèmes restent encore peu connus et les modifications de propriétés observées ne sont pas généralisables.

Dans ce contexte, nous avons préparés des systèmes de membranes modèles à partir de copolymères triblocs pour étudier l'influence de la masse molaire et de l'architecture du copolymère amphiphile sur l'utilisation de transporteurs ioniques et sur la formation de membranes hybrides polymère / lipide. La perméabilité à l'eau de certaines vésicules hybrides a également été caractérisée. Les propriétés de perméabilité des vésicules sont particulièrement importantes car elles conditionnent leur utilisation en tant que nano-/microréacteur ou en tant que vecteur médicamenteux.

Dans un second temps, les paramètres moléculaires qui gouvernent l'évolution de la forme des polymersomes nanométriques ont été étudiés. En effet, les vésicules ajustent leur volume interne par transfert d'eau pour retourner à l'équilibre quand elles sont soumises à des contraintes osmotiques, ce qui entraîne une évolution de la morphologie. Si les changements de forme sont connus pour les vésicules géantes, ils restent encore à explorer pour les nano-polymersomes. De plus, cela impacte directement les interactions avec les systèmes biologiques et donc l'efficacité des vésicules en tant que vecteur thérapeutique.

Chapitre 2 :

Matériel et méthodes

2 Matériel et méthodes

Sommaire Chapitre 2

| | | |
|---------|---|----|
| 2.1 | Produits chimiques..... | 73 |
| 2.1.1 | Réactifs..... | 74 |
| 2.1.1.1 | Poly(diméthylsiloxane) diaminés..... | 74 |
| 2.1.1.2 | N-Carboxy Anhydride de Benzyle-L-Glutamate..... | 75 |
| 2.1.1.3 | PEO-NHS..... | 75 |
| 2.1.2 | Amphiphiles commerciaux..... | 75 |
| 2.1.2.1 | Lipides..... | 75 |
| 2.1.2.2 | Dow Corning 5329..... | 76 |
| 2.1.2.3 | PBut46-b-PEO30..... | 76 |
| 2.1.3 | Fluorophores..... | 77 |
| 2.1.3.1 | Alexa Fluor 488 Dextran..... | 77 |
| 2.1.3.2 | Egg Liss Rhod PE..... | 78 |
| 2.2 | Techniques d'analyses chimiques..... | 78 |
| 2.2.1 | Résonance Magnétique Nucléaire..... | 78 |
| 2.2.2 | Chromatographie d'exclusion stérique..... | 78 |
| 2.2.3 | Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier..... | 79 |
| 2.2.4 | Calorimétrie différentielle à balayage..... | 79 |
| 2.3 | Caractérisation des vésicules..... | 80 |
| 2.3.1 | Préparation des échantillons pour les observations..... | 80 |
| 2.3.1.1 | Sonificateur..... | 80 |
| 2.3.1.2 | Mini-extrudeur..... | 80 |
| 2.3.1.3 | Puces microfluidiques..... | 81 |
| 2.3.2 | Techniques de diffusion..... | 85 |
| 2.3.2.1 | Diffusion dynamique de la lumière (DLS)..... | 87 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.3.2.2 | Diffusion de la lumière statique..... | 88 |
| 2.3.2.3 | Diffusion de neutrons aux petits angles..... | 88 |
| 2.3.3 | Techniques d'imagerie..... | 89 |
| 2.3.3.1 | Microscopie en contraste de phase..... | 89 |
| 2.3.3.2 | Microscopie en contraste interférentiel différentiel..... | 90 |
| 2.3.3.3 | Microscopie de fluorescence..... | 90 |
| 2.3.3.4 | Microscopie confocale..... | 90 |
| 2.3.3.5 | Cryo microscopie électronique à transmission (cryo-TEM)..... | 94 |

2.1 Produits chimiques

Le tableau suivant récapitule l'ensemble des produits chimiques qui ont été utilisés au cours de cette thèse. Les caractéristiques des réactifs, amphiphiles commerciaux et fluorophores sont détaillées par la suite.

| Produit | Formule | Masse molaire | Fournisseur |
|---|---|---------------------------|-----------------------------------|
| 1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero phosphocholine | C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P | 760,08 g/mol | Sigma-Aldrich |
| A-23187 free acid (Calcimycine) | C ₂₉ H ₃₇ N ₃ O ₆ | 523,63 g/mol | Life technologies (Invitrogen) |
| Alexa Fluor 488 Dextran | - | Dextran : 10 000 g/mol | Life technologies (Invitrogen) |
| Chloroforme | CHCl ₃ | 119,38 g/mol | Sigma-Aldrich |
| Chlorure de calcium (1M) | CaCl ₂ | 110,98 g/mol | Sigma-Aldrich |
| Dichlorométhane | CH ₂ Cl ₂ | 84,93 g/mol | Sigma-Aldrich |
| Diisopropyléthylamine | C ₈ H ₁₉ N | 129,25 g/mol | Acros Organics |
| Dipalmitoylphosphatidylcholine | C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P | 734,039 g/mol | Sigma-Aldrich |
| Dow Corning 5329 | PDMS _{22-g} -PEO ₁₂ | 3000 g/mol | Dow Corning |
| Glucose | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 180,16 g/mol | Sigma-Aldrich |
| HEPES (500 mM) | C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S | 238,30 g/mol | Sigma-Aldrich |
| Hydrogénocarbonate de sodium (100 mM) | NaHCO ₃ | 84 g/mol | Sigma-Aldrich |
| Hydroxide de potassium | KOH | 56.10 g/mol | Alfa Aesar |
| Egg Liss-Rhod PE | C ₆₆ H ₁₀₇ N ₄ O ₁₄ PS ₂ | 1275,678 g/mol | Avanti Polar Lipids |
| Méthanol | CH ₄ O | 32,04 g/mol | J.T.Baker |
| N-carboxy anhydride de benzyle- <i>L</i> -Glutamate | C ₁₃ H ₁₃ NO ₅ | 263,25 g/mol | Isochem |
| N-méthyl-2-pyrrolidone | C ₅ H ₉ NO | 99,13 g/mol | Alfa Aesar |
| Polybutadiène- <i>b</i> -poly(oxide d'éthylène) | PBut _{46-b} -PEO ₃₀ | 3800 g/mol | Polymer source |

| | | | |
|---|---|--|---------------|
| Poly(diméthylsiloxane) diaminé | H ₂ N-PDMS-NH ₂ | 950 g/mol. 3000 g/mol 5000 g/mol | ABCR |
| Poly(oxyde d'éthylène) N-hydroxysuccinimide | PEO-NHS | 750 g/mol | Rapp |
| Sucrose | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | 342,30 g/mol | Sigma-Aldrich |
| Tétrahydrofurane | C ₄ H ₈ O | 72,1 g/mol | Sigma-Aldrich |

Tableau 2.1. Principaux produits chimiques utilisés au cours de ces travaux de thèse.

2.1.1 Réactifs

2.1.1.1 Poly(diméthylsiloxane) diaminés

Trois α,ω -bis aminopropyl poly(diméthylsiloxane) (N°CAS : 106214-84-0) de masses molaires différentes (950, 3000 et 5000 g/mol) ont été achetés chez ABCR.

Le taux de fonctionnalisation en groupements amines terminaux a été vérifié par RMN ¹H avant leur utilisation, en se servant de l'intégration du signal relatif aux protons portés par les carbones en α des groupements amines (CH₂CH₂NH₂, ($t_{\text{fonc}} \times 4$)H, $\delta=2,6$ ppm) et de l'intégration du signal correspondant aux protons de la chaîne de PDMS (Si(CH₃)₂O, ($6 \times \text{DP}_{\text{PDMS}}$)H, $\delta=0$ ppm). Les degrés de polymérisation moyens des trois PDMS ont été estimés à partir des masses molaires indiquées par le fournisseur (tableau 2.2), il n'a pas été possible de les vérifier par GPC (l'indice de réfraction du PDMS est du même ordre de grandeur que celui du THF).

| Polymère | DP _{PDMS} estimé | t_{fonc} amine (%) |
|--|---------------------------|-----------------------------|
| H ₂ N-PDMS-NH ₂ (950 g/mol) | 11 | 52 % |
| H ₂ N-PDMS-NH ₂ (3000 g/mol) | 39 | 92 % |
| H ₂ N-PDMS-NH ₂ (5000 g/mol) | 66 | 95 % |

Tableau 2.2. Taux de fonctionnalisation des bouts de chaîne en groupements amines vérifié par RMN ¹H.

Le PDMS diaminé de masse molaire la plus faible n'a pas été gardé compte tenu du faible taux de fonctionnalisation en groupements amines mesuré par analyse RMN ¹H. Un dosage acido-basique des fonctions amines (par HBr dans l'acide acétique) a donné des résultats similaires pour les deux copolymères de plus forte masse molaire. Ils ont été utilisés au cours de cette thèse pour amorcer les polymérisations par ouverture de cycle des BLG-NCA ainsi que les réactions de couplage avec les PEO-NHS (voir chapitre 3).

2.1.1.2 N-Carboxy Anhydride de Benzyle-L-Glutamate

Ce sont les unités monomères permettant la polymérisation du PBLG par ouverture de cycle. Ces réactifs ont été achetés chez Isochem et ont été utilisés tels que reçu. Il est très important de les manipuler sous atmosphère inerte car la présence d'eau entraîne l'ouverture du cycle (retour sous forme d'acide aminé, non réactif).

2.1.1.3 PEO-NHS

Le groupement NHS porté par le PEO-NHS (α -methoxy- ω -N hydroxysuccinimide ester poly(oxyde d'éthylène)) permet un couplage sélectif avec les amines primaires. C'est la raison pour laquelle de la N,N-diisopropyléthylamine (DIPEA), qui permet de s'assurer que les amines primaires des H₂N-PDMS-NH₂ sont déprotonées, peut être introduite dans le milieu réactionnel pendant la réaction de couplage (voir partie 3.2.2).

Le degré de polymérisation moyen de la chaîne a été estimé à 17, en accord avec les informations données par le fournisseur et le rapport d'intégration entre les protons portés sur le groupement méthoxy en bout de chaîne (CH₃O, 3H, 3,3 ppm) et les protons portés par la chaîne de PEO (CH₂CH₂O, (4×DP_{PEO})H, δ = 3,6 ppm), mesuré par RMN ¹H. Le taux de fonctionnalisation a également été vérifié par RMN ¹H en faisant le rapport d'intégration des protons portés par la chaîne de PEO et des protons portés par le groupements NHS (C(O)CH₂CH₂C(O), (4×t_{fonc})H, δ = 2,6ppm). Le taux de fonctionnalisation estimé est t_{fonc} = 95%.

2.1.2 Amphiphiles commerciaux

En addition des copolymères synthétisés au cours de ces travaux de thèse, des lipides et des copolymères commerciaux connus pour former des vésicules en solution aqueuse ont été utilisés.

2.1.2.1 Lipides

Les deux lipides commerciaux utilisés au cours de ces travaux de thèse, le 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero phosphocholine (POPC) et le Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Ils ont permis de préparer des vésicules présentant des membranes hybrides polymère / lipide. Une différence importante entre ces deux composés est leur température de transition coopérative T_m , qui correspond à la température de transition d'une phase gel $L_{\beta'}$ vers une phase cristal-liquide désordonnée L_{α} (Tableau 2.3).

| Lipide | T_m (°C) | Phase lipidique à T_{amb} | P_f à T_{amb} (µm/s) |
|--------|------------|--|------------------------------------|
| POPC | - 4 | Cristal-liquide désordonnée (L_α) | 0,0042 (à 26,5°C) ⁽¹⁸⁴⁾ |
| DPPC | 41,5 | Gel (L_β') | 130 ⁽¹⁸⁵⁾ |

Tableau 2.3. Température de transition coopérative T_m des lipides et coefficient de perméabilité à l'eau P_f à température ambiante des liposomes qu'ils permettent de former.

La différence d'état des phases lipidiques à température ambiante explique l'écart très important observé sur la valeur du coefficient de perméabilité à l'eau P_f .

2.1.2.2 Dow Corning 5329

Ce copolymère greffé (figure 2.1), le PDMS₂₂-g-PEO₁₂, nous a été donné par la société Dow Corning. Les caractérisations menées au laboratoire sont en accord avec les données disponibles dans la littérature.^{179, 186, 187} Ce copolymère est composé d'une chaîne hydrophobe de 22 unités monomères (PDMS₂₂) sur laquelle on trouve statistiquement deux greffons de PEO₁₂. La fraction massique hydrophile est $f = 47\%$, la masse molaire moyenne viscosimétrique est 3000 g/mol et l'indice de dispersité mesurée par chromatographie d'exclusion stérique est 1,32. En solution aqueuse, ce copolymère forme des vésicules dont l'épaisseur de membrane est d'environ 5 nm.¹⁸⁸

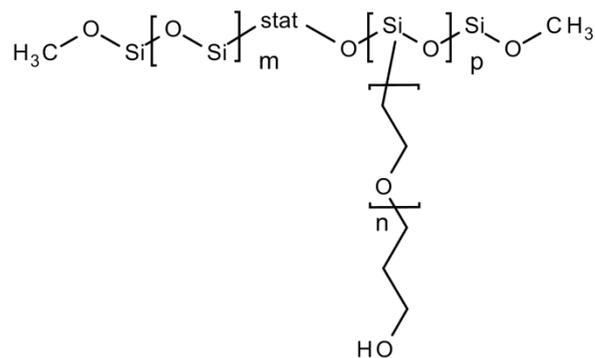


Figure 2.1. Structure chimique du copolymère PDMS₂₂-g-PEO₁₂, avec $m = 22$, $p = 2$ et $n = 12$.

Les deux groupements hydroxyles rendent ce copolymère fonctionnalisable.¹⁷⁹ L'ajout de groupements fluorescéines a permis son utilisation comme marqueur de membrane pour une phase polymère (à une concentration de 6375 nM).

2.1.2.3 PBut₄₆-b-PEO₃₀

Le polybutadiène₄₆-b-poly(oxyde d'éthylène)₃₀ est un copolymère dibloc acheté chez Polymer Source. Les masses moyennes en nombre des deux blocs sont $M_n \text{PBut} = 2500$ g/mol pour le bloc hydrophobe et $M_n \text{PEO} = 1300$ g/mol pour le bloc hydrophile, ce qui correspond à

une fraction massique hydrophile $f = 34\%$. La microstructure du bloc polybutadiène est principalement formée par des additions 1,2 (89%).

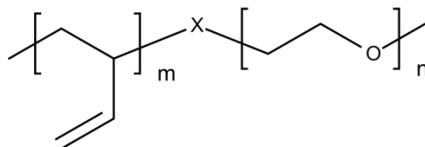


Figure 2.2. Structure chimique du PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ riche en microstructure 1,2, avec $m = 46$ et $n = 30$.

En solution, ce copolymère permet de former des vésicules ayant une épaisseur de membrane d'une dizaine de nanomètres.⁶⁵

2.1.3 Fluorophores

2.1.3.1 Alexa Fluor 488 Dextran

L'Alexa Fluor 488 Dextran est un fluorophore issu de la gamme des Alexa Fluor, des colorants de forte intensité de fluorescence et très photostables. Au cours de cette thèse, ce fluorophore a été encapsulé dans des vésicules géantes pour permettre leur observation en microscopie confocale et faire des reconstructions volumiques. Une chaîne de Dextran de 10 000 g/mol est liée au fluorophore afin que ce dernier ne puisse pas franchir les membranes hydrophobes des vésicules et reste encapsulé dans leurs milieux intravésiculaires. La longueur d'onde d'excitation de l'Alexa Fluor 488 Dextran est $\lambda_{ex} = 495$ nm (adapté pour les lasers à 488 nm) et la longueur d'onde d'émission est $\lambda_{em} = 519$ nm (figure 2.3).

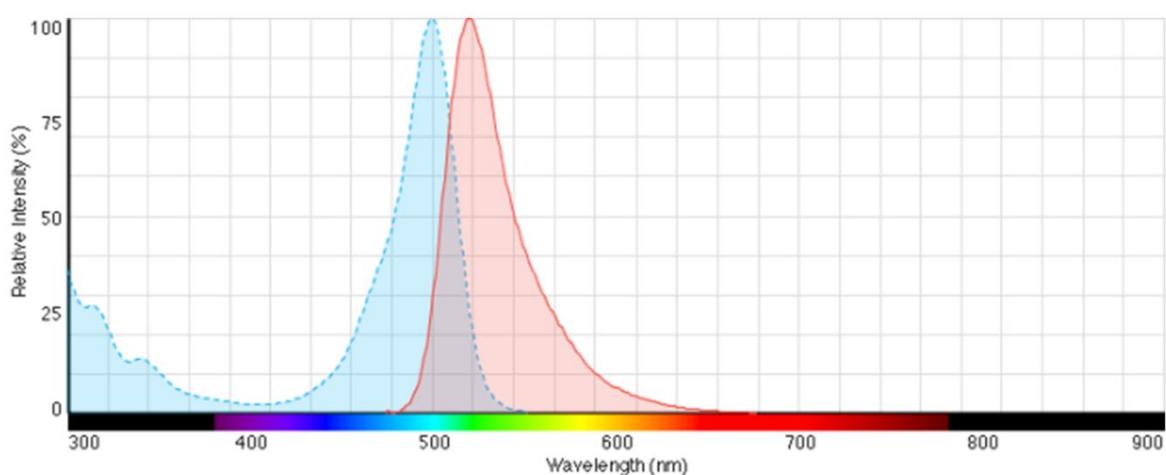


Figure 2.3. Spectres d'excitation (bleu) et d'émission de fluorescence (rouge) de l'Alexa Fluor 488 dans une solution tamponnée à pH 8.¹⁸⁹

Ces longueurs d'onde sont très proches de celles de la fluorescéine, c'est pour cette raison que dans les expériences de choc hypotonique sur les vésicules géantes hybrides polymère / lipide (voir partie 4.2.3) on n'utilise pas de PDMS₂₂-g-PEO₁₂-Fluorescéine pour faire un double marquage de membrane.

2.1.3.2 Egg Liss Rhod PE

Ce composé, la L- α -Phosphatidylethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Sel d'ammonium), est un lipide avec un fluorophore attaché à sa tête polaire. Il s'insère préférentiellement dans les phases lipidiques fluides, et a donc été utilisé comme marqueur des domaines lipidiques (à une concentration de 200 nM) lors de la formation de membranes hybrides polymère / lipide. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont $\lambda_{ex} = 560$ nm et $\lambda_{em} = 583$ nm, ce qui permet de l'utiliser en même temps que l'Alexa Fluor 488 Dextran ou le PDMS₂₂-g-PEO₁₂-Fluorescéine.¹⁹⁰

2.2 Techniques d'analyses chimiques

2.2.1 Résonance magnétique nucléaire

Les analyses par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ¹H) ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Avance AC 400 à température ambiante. Les échantillons ont été préparés à une concentration de 15 mg/mL dans des solvants deutérés achetés chez Eurisotop.

Pour solubiliser les copolymères triblocs PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG dans le DMSO-d₆, il faut passer les échantillons 30 minutes au bain à ultrason à 50°C juste avant de faire les analyses (voir partie 3.5.1.2).

2.2.2 Chromatographie d'exclusion stérique

Les analyses par chromatographie d'exclusion stérique ont été réalisées avec des appareils de mesures PL-GPC 50 Plus de Varian équipés de deux détecteurs intégrés : un détecteur UV et un détecteur par indice de réfraction.

Les mesures dans le THF ont été réalisées à 40°C, avec un débit d'élution de 1 mL/min et en utilisant le trichlorobenzène comme marqueur. Les colonnes montées sur l'appareil de mesure sont des colonnes TSKgel HXL TOSOH et la calibration est faite avec des standards de polystyrène de faible dispersité.

Les mesures dans le DMSO (+1 g/L de LiBr) ont été réalisées à 80°C, avec un débit d'élution de 0,6 mL/min et en utilisant le toluène comme marqueur. Les colonnes montées sur l'appareil de mesure sont des colonnes PLgel et la calibration est faite avec des standards de pullulane de faible dispersité.

2.2.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les spectres infrarouges ont été obtenus avec un spectromètre Thermoscientific Nicolet IS10 en utilisant la méthode de réflexion totale atténuée (ATR-IR). Les échantillons, sous forme de poudre, ont été analysés à température ambiante et les spectres ont été enregistrés entre 500 et 4000 cm^{-1} .

2.2.4 Calorimétrie différentielle à balayage

Les thermogrammes de calorimétrie différentielle à balayage ont été obtenus avec un appareil de mesure DSC Q100 de TA, fonctionnant sous flux continu d'hélium ou d'azote.

Les mesures sur les échantillons sous forme de poudre (PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG) ont été faites dans des capsules en aluminium scellées remplies avec une dizaine de milligrammes de produit. Les thermogrammes ont été enregistrés en imposant les cycles suivants : -150°C à +150°C à une vitesse de 10°C/min, +150 °C à -150°C à une vitesse de 10°C/min et -150°C à 150°C à une vitesse de 10°C/min.

Les échantillons liquides, qui sont des suspensions de vésicules hybrides, ont été préparés en déposant une solution de polymère / lipide dans le chloroforme à l'intérieur d'un creuset en aluminium (~ 120 μL) afin d'avoir 0,5 mg de lipide (quantité fixe). La concentration en polymère de la solution a été adaptée pour avoir le ratio molaire polymère / lipide désiré. Chaque échantillon a ensuite été séché pendant au moins 5 heures sous vide dynamique à 45°C puis réhydraté dans de l'eau MilliQ pendant toute une nuit (taux d'hydratation > 95%). Quand le lipide utilisé est le DPPC, au moins la première demi-heure de réhydratation a été faite à 50°C ($T > T_{m\text{DPPC}}$) pour que les lipides soient en phase fluide et ainsi faciliter la formation d'une suspension vésiculaire. La solution de réhydratation utilisée pour les échantillons contenant du POPC contient du sucrose pour ne pas avoir de recristallisation de l'eau à -10°C. Les analyses ont été réalisées en imposant des variations de température continues de 5°C/min lors des cycles de chauffe et de refroidissement. La température a été variée de 10°C à 50°C pour les échantillons contenant du DPPC et de -10°C à 12°C pour ceux qui contiennent du POPC, avec une isotherme de 2 minutes 30 secondes entre chaque cycle.

2.3 Caractérisation des vésicules

2.3.1 Préparation des échantillons pour les observations

2.3.1.1 Sonificateur

Un sonificateur haute intensité vibra cell™ (modèle 130W) a été utilisé pour préparer les échantillons de vésicules nanométriques par émulsion double – évaporation (voir partie 3.3.2.2). La sonde montée sur le sonificateur à une extrémité de section circulaire de 3 mm de diamètre.

Les caractéristiques des signaux appliqués lors des différentes étapes de la formation des vésicules nanométriques par émulsion double – évaporation sont les suivantes :

- Formation de l'émulsion W/O : 20 secondes de sonication à 60% de la puissance maximale, en appliquant des pulsations de 2 secondes entrecoupées de périodes de 1 seconde.
- Formation de la double-émulsion (W/O)/W: 2 minutes de sonication à 60% de la puissance maximale, en appliquant des pulsations de 2 secondes entrecoupées de périodes de 1 seconde.

2.3.1.2 Mini-extrudeur

Pour homogénéiser le diamètre des vésicules nanométriques formées par émulsion double – évaporation, celles-ci sont extrudées à travers des filtres en polycarbonates, dont la taille des pores est contrôlée, avec un mini-extrudeur à double seringue de chez Avanti Polar Lipids, Inc.

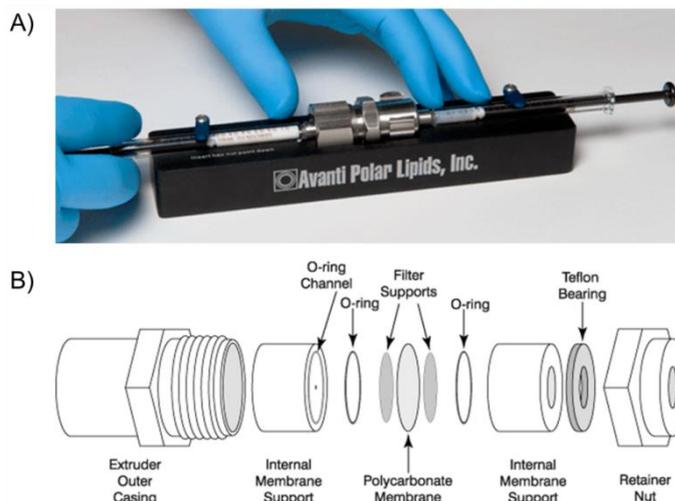


Figure 2.4. A) Mini-extrudeur à double seringue et B) montage de la partie centrale de l'extrudeur qui contient les membranes en polycarbonate.¹⁹¹

Les membranes en polycarbonate (pores de 100 nm) sont placées dans la partie centrale de l'extrudeur, qui est maintenue en place sur le bâti. Les deux seringues, une remplie avec la solution de vésicules à extruder et la deuxième vide, sont alors connectées à l'extrudeur. L'extrusion est ensuite réalisée en transférant la solution de vésicules d'une seringue à l'autre. Le nombre total d'extrusions (de passages à travers les membranes) est fixé à 19, de manière à ce que la solution de vésicule extrudée ne soit pas récupérée dans la même seringue qu'avant son extrusion (il peut y avoir un volume mort de solution non extrudée).

2.3.1.3 Puces microfluidiques

Des puces microfluidiques en PDMS, préparées par lithographie, sont utilisées pour piéger les vésicules sous un flux hydrodynamique. Cela permet de les maintenir dans un espace très localisé et ainsi de pouvoir suivre l'évolution de leur taille par microscopie confocale suite à un choc osmotique.

2.3.1.3.1 Principe des pièges

Les puces microfluidiques en PDMS consistent en une série de pièges hydrodynamiques qui sont des jonctions identiques.¹⁹² A chaque jonction, l'écoulement est séparé en deux : une première partie passe à travers la zone du piège, et la seconde est déviée par un contournement (figure 2.5). Ces pièges ont été conçus pour que la résistance hydrodynamique soit plus élevée dans la zone du piège que dans le contournement afin de limiter le cisaillement ressenti par les objets piégés et ainsi pouvoir étudier des objets déformables.

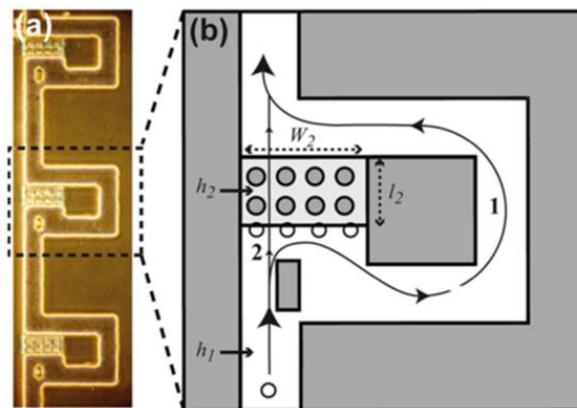


Figure 2.5. a) Image de microscopie en contraste de phase d'une série de trois pièges et b) représentation schématique d'un piège microfluidique.

Le flux de solution passant à travers la zone du piège créé une force d'aspiration, dont l'intensité dépend du débit d'injection de la solution dans la puce. Il en résulte une sélection de la taille des objets en fonction du débit : la taille minimale correspond à la taille des objets qui ne sont pas assez déformés par le cisaillement pour passer au travers du piège (elle augmente avec le

débit) et la taille maximale aux plus gros objets suffisamment aspirés pour ne pas être entraînés dans le contournement.

2.3.1.3.2 Préparation

Le procédé de fabrication des puces microfluidiques à partir de différents moules (négatifs des canaux qui composeront les pièges) est le suivant (figure 2.6).

- A) Préparer une solution de PDMS qui va servir à remplir le moule. Pour 10 grammes de PDMS non réticulé (voir partie 2.3.1.3.3) ajouter 1 gramme d'agent réticulant et mélanger généreusement le tout. Dégazer sous vide dynamique pour retirer toutes les bulles d'air car elles risquent de perturber l'étape de collage.
- B) Remplir le moule avec le PDMS non réticulé et le remettre à dégazer. Le placer ensuite dans une étuve à 70°C pendant au moins une nuit pour faire réticuler le PDMS.
- C) Peler gentiment les puces en PDMS réticulé pour les retirer du moule.
- D) Coller les lignes de pièges hydrodynamiques sur des lamelles recouvertes de PDMS réticulé pour former les canaux de morphologie souhaitée. Il faut pour cela exposer les surfaces qui vont être collées ensemble à un plasma d'oxygène sous vide. Des groupements silanols Si-OH sont ainsi créés, ce qui permet de lier chimiquement les différentes surfaces *via* une réaction de condensation ($2 \text{ Si-OH} \rightarrow \text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O}$).

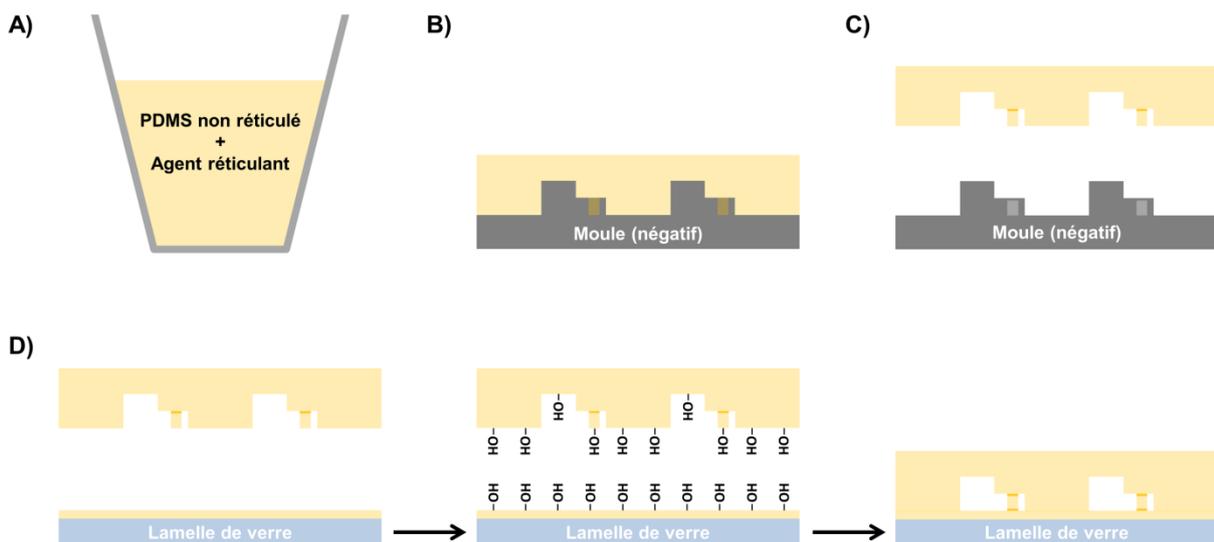


Figure 2.6. Préparation des lignes de pièges hydrodynamiques. Les différentes étapes sont A) la préparation du PDMS qui va faire le corps des puces microfluidiques, B) la préparation des puces grâce au moule, C) le démoulage et D) le collage sur une lamelle recouverte de PDMS.

2.3.1.3.3 Poly(diméthylsiloxane) réticulable : Sylguard 184

La préparation pour faire du PDMS est vendue par Dow Corning sous la forme de deux produits à mélanger : une base et un agent réticulant. Ces deux produits contiennent des chaînes de PDMS avec des groupements vinyles terminaux, la base contient également un catalyseur (Pt) et l'agent réticulant des chaînes de PDMS portant des groupements hydrogénosilanes (Si-H).

En mélangeant les deux produits, des réactions d'hydrosilylation consistant en l'ajout des fonctions hydrogénosilanes (agent réticulant) sur les groupements vinyles permet de former un réseau réticulé (figure 2.7).

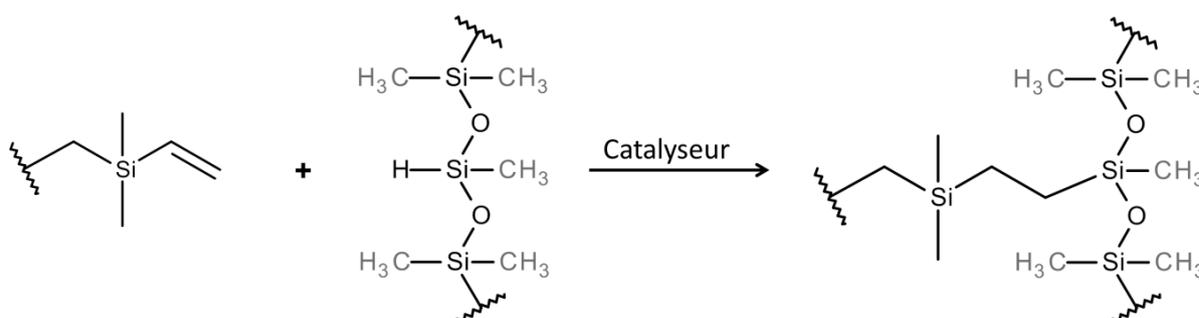


Figure 2.7. Réaction d'hydrosilylation entre les fonctions hydrogénosilanes et les groupements vinyles.

La quantité d'agent réticulant introduite détermine la rigidité du composé final. Un des avantages qui fait que le PDMS est utilisé pour la fabrication des puces microfluidiques est sa transparence, qui autorise les observations en microscopie optique.

2.3.1.3.4 Utilisation : chocs osmotiques suivis par microscopie confocale

Un pousse-seringues piloté informatiquement est utilisé pour contrôler précisément le volume injecté ainsi que le débit d'injection (neMESYS-Cetoni). Pour appliquer des chocs osmotiques sur les vésicules piégées sans pour autant les perdre il faut pouvoir injecter les deux solutions, *i.e.* la solution de vésicules et la solution d'osmolarité différente, d'affilée afin de toujours les maintenir sous flux aqueux. Un montage microfluidique a été préparé pour connecter les deux seringues d'injection à l'entrée de la puce microfluidique. Cependant, certaines précautions sont nécessaires pour éviter la présence de bulles dans les capillaires car une bulle qui passe dans une ligne de pièges hydrodynamiques détruit l'ensemble des vésicules piégées (arrêt de l'expérience en cours). Une procédure de purge du système a été développée au LIONS pour retirer toutes les bulles avant de commencer les manipulations de choc osmotique en puce microfluidique sous microscope confocal (figure 2.8).

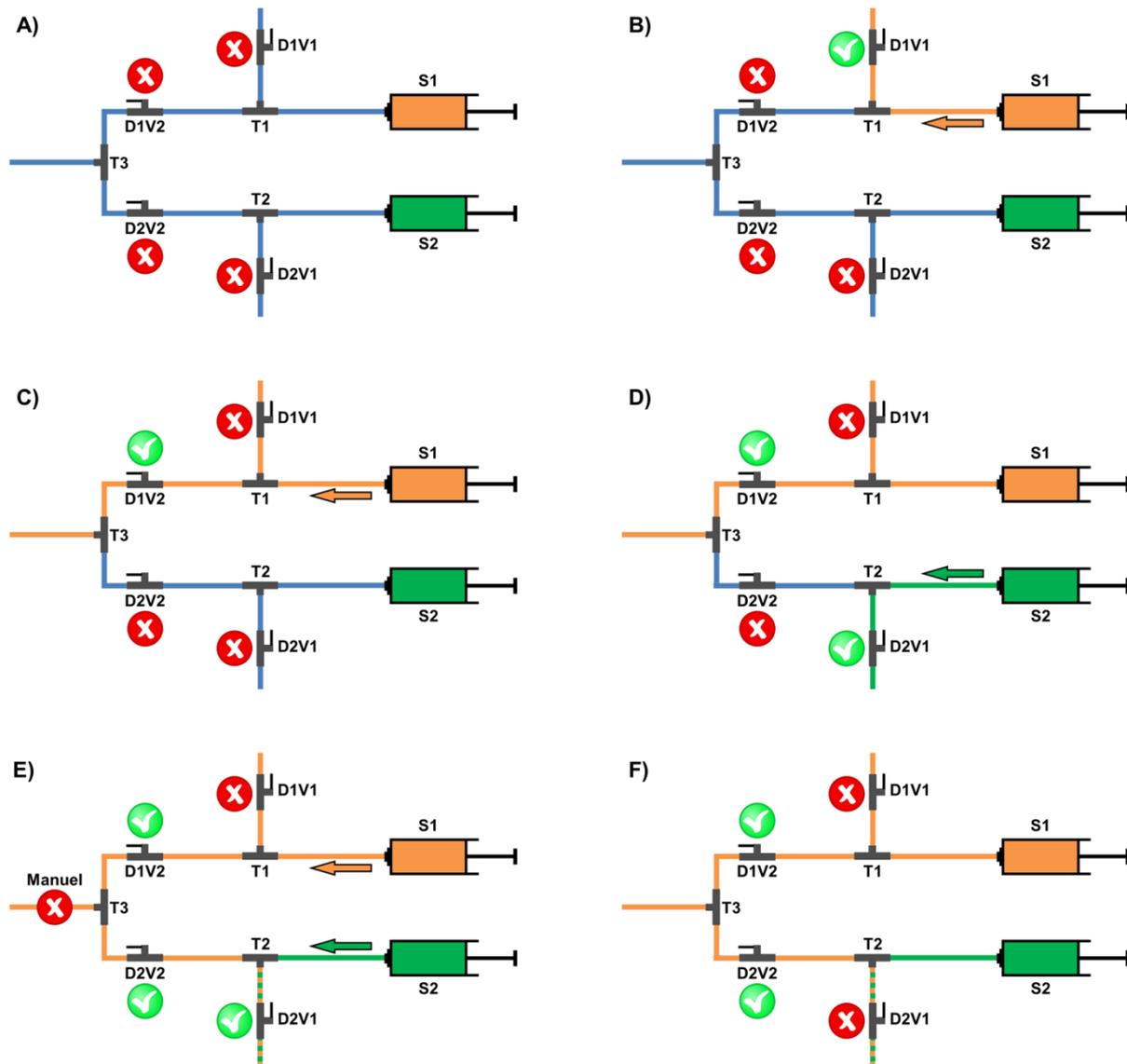


Figure 2.8. Représentation schématique des différentes étapes pour purger le montage microfluidique qui permet de connecter deux seringues d’injection à une ligne de pièges hydrodynamiques.

La première précaution à prendre est de s’assurer qu’il n’y a pas de bulles dans les seringues d’injection avant de les connecter. Les différentes étapes de la purge sont les suivantes :

- A) Installer correctement les seringues d’injection sur le pousse-seringues. Le système est actuellement rempli d’eau (et éventuellement de bulles) et toutes les dérivations sont fermées.
- B) Ouvrir la dérivation D1V1, injecter successivement 10 μL à 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 10 μL à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ depuis la seringue S1.
- C) Fermer la dérivation D1V1 et ouvrir la dérivation D1V2. Injecter 50 μL à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ depuis la seringue S1.

- D) Ouvrir la dérivation D2V1, injecter successivement 10 μL à 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 10 μL à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ depuis la seringue S2.
- E) Ouvrir la dérivation D2V2 et boucher manuellement la sortie du système microfluidique. Injecter 10 μL à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ depuis les deux seringues d'injection.
- F) Fermer la dérivation D2V1. Le système est maintenant prêt à être connecté à la ligne de pièges hydrodynamiques, il n'y a plus de bulles dedans. La solution 1 se trouve dans l'ensemble du système, excepté dans le capillaire reliant T2 à la seringue S2.

Le cas de figure généralement utilisé est de connecter la seringue contenant les vésicules en position S1 et la seringue contenant la solution d'osmolarité différente en position S2. Pour changer la phase extérieure une fois des vésicules piégées, il suffit d'arrêter l'injection de la seringue 1 et démarrer simultanément l'injection de la seringue 2 au même débit (le faire progressivement si les débits d'injection étaient de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ou plus).

En utilisant une résistance hydrodynamique connectée en sortie de la ligne de pièges, il est possible de changer une des seringues d'injection en cours d'expérience pour utiliser une troisième solution. Si la solution en cours d'injection provient de S2 (S1 à 0 $\mu\text{L}/\text{min}$), fermer la dérivation D1V2 et ouvrir la dérivation D1V1, déconnecter S1 et connecter S3 à la place. Pour enlever les bulles qui arrivent lors de cette connexion, injecter successivement 10 μL à 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 10 μL à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ depuis la seringue S3. Pour purger la solution S1 qu'il reste entre les connecteurs T1 et T3 avec la solution S2, fixer S3 à un débit d'injection inférieur à celui de S2 et ouvrir la dérivation D1V2 (D1V1 est toujours ouverte). C'est lors de cette étape que la résistance est nécessaire, car il faut que la majorité de la solution 2 passe par T1/T3 mais qu'une partie maintienne les vésicules sous flux hydrodynamique. Une fois cette étape réalisée, fermer D1V1 et remettre à zéro le débit de S3. La seringue est maintenant prête.

2.3.2 Techniques de diffusion

Les techniques expérimentales basées sur les phénomènes de diffusion permettent d'accéder aux paramètres structuraux de la matière aux très petites échelles. Elles sont par conséquent très utilisées en science des polymères pour caractériser les macromolécules ou les structures auto-assemblées en solutions. Il y a plusieurs techniques de diffusion, dont la source de rayonnement diffère :

- Diffusion de la lumière : $4000 \text{ \AA} < \lambda_i < 7000 \text{ \AA}$
- Diffusion des neutrons : $1 \text{ \AA} < \lambda_i < 20 \text{ \AA}$
- Diffusion des rayons X : $0,2 \text{ \AA} < \lambda_i < 2 \text{ \AA}$

Au cours d'une expérience de diffusion, un faisceau incident monochromatique de longueur d'onde λ_i et de vecteur d'onde \vec{k}_i est envoyé sur l'échantillon étudié. Celui diffuse dans toutes les directions de l'espace, et les ondes diffusées (λ_d, \vec{k}_d) sont analysées à différents angles d'observation θ (figure 2.9).

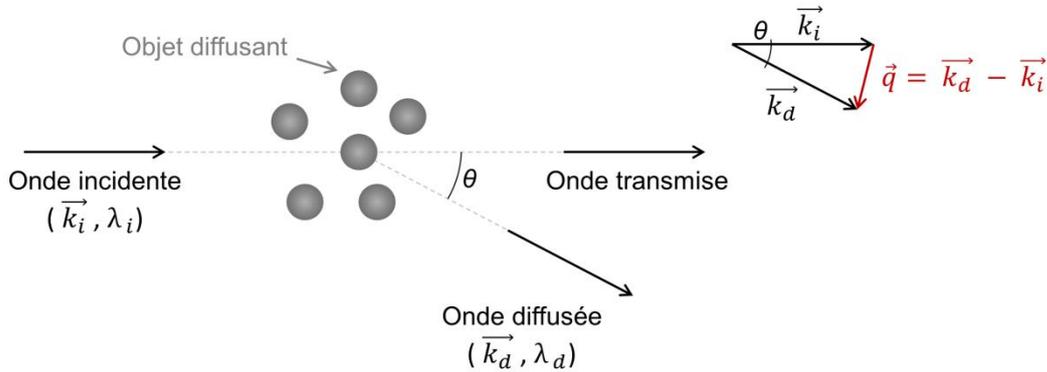


Figure 2.9. Principe d'une expérience de diffusion.

Les modules des vecteurs d'onde incident \vec{k}_i et diffusé \vec{k}_d sont définis par les relations :

$$|\vec{k}_i| = \frac{2\pi n}{\lambda_i} \qquad |\vec{k}_d| = \frac{2\pi n}{\lambda_d}$$

avec λ_i la longueur d'onde du rayon incident dans le vide, λ_d la longueur d'onde du rayon diffusé dans le vide et n l'indice de réfraction du milieu.

Pour chaque direction de l'espace, définie par un angle θ , on peut définir un vecteur d'onde de transfert $\vec{q} = \vec{k}_d - \vec{k}_i$. Dans le cas d'une diffusion élastique, quand il n'y a pas de transfert d'énergie du rayonnement au matériau, les modules des vecteurs d'onde $|\vec{k}_i|$ et $|\vec{k}_d|$ sont égaux. Pour chaque direction d'observation, la norme du vecteur d'onde \vec{q} est alors :

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi n}{\lambda_i} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

La dimension caractéristique de la matière sondée lors de la diffusion d'un rayonnement est inversement proportionnelle au module du vecteur d'onde de transfert (q^{-1}). La longueur d'onde incidente variant d'une technique de diffusion à l'autre, une large gamme de vecteurs d'onde q peut être couverte, ce qui permet d'obtenir de nombreuses informations sur l'échantillon étudié :

- Diffusion de la lumière : $5.10^{-5} \text{ \AA}^{-1} < q < 3.10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$
- Diffusion des neutrons et rayons X : $2.10^{-4} \text{ \AA}^{-1} < q < 5.10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$

L'intensité diffusée, mesurée au cours de l'expérience de diffusion, peut être simplifiée à l'expression suivante :

$$I_{th}(q) = \text{Contraste} \times P(q) \times S(q)$$

avec le contraste une grandeur qui représente la différence de pouvoir diffusant entre l'objet étudié et son environnement, $P(q)$ le facteur de forme des particules (taille, géométrie) et $S(q)$ le facteur de structure (interactions particule – particule). Quand on travaille sur des objets dilués, le facteur de structure $S(q)$ est égal à 1 car on néglige les interactions entre les particules. C'est donc la forme de la courbe $I(q)$ qui permet de remonter aux différents paramètres géométriques des particules étudiées, *via* le facteur de forme $P(q)$.

2.3.2.1 Diffusion dynamique de la lumière

Cette technique permet de mesurer le rayon hydrodynamique moyen R_H des particules en solution ainsi que leur indice de dispersité (PDI). Le principe de la diffusion dynamique de la lumière (DLS) ne se base pas sur l'évolution de l'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde, $I(q)$, mais sur la variation temporelle de l'intensité diffusée à un vecteur d'onde fixé, $I(q, t)$. Ces fluctuations sont dues au mouvement brownien des particules en solution, et donnent des informations sur la dynamique des particules diffusantes.

L'évolution temporelle de l'intensité est représentée par une fonction d'autocorrélation, décroissante, qui correspond à la corrélation entre l'intensité diffusée au début de la mesure et un instant t :

$$g^2(q, t) = \frac{\langle I(q, 0) I(q, t) \rangle}{\langle I(q, 0) \rangle^2}$$

Plusieurs méthodes de traitement des fonctions d'autocorrélation, par exemple les cumulants (une population polydisperse) ou CONTIN (plusieurs populations), permettent de déterminer la ou les fréquences de relaxation Γ associées au mouvement des particules. Il est alors possible de calculer, pour un mouvement purement diffusif, le coefficient de diffusion des particules D grâce à la loi de Fick :

$$D = \frac{\Gamma}{q^2}$$

Le rayon hydrodynamique apparent R_H des objets en solution (assimilés à des sphères) est alors obtenu en utilisant la relation de Stokes-Einstein :

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

avec $k_B T$ le facteur d'énergie de Boltzman et η la viscosité du solvant.

Les mesures de DLS ont été faites en utilisant un Malvern Zetasizer Nano ZS-90 (source laser hélium-néon (632,8 nm), mesure de l'intensité diffusée à 90°). Les échantillons ont été préparés à une concentration d'environ 0,1 mg/mL, et pour chaque échantillon au moins trois mesures ont été réalisées pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

2.3.2.2 Diffusion de la lumière statique

Au cours de ce type de mesure, l'intensité de diffusion $I(q)$ est mesurée pour différents angles (différents vecteurs d'onde q). La pente de la représentation $\ln(I(q))$ vs. q^2 permet, dans le domaine de Guinier, de calculer le rayon de giration R_g des particules en solution :

$$Pente = - \frac{R_g^2}{3}$$

Ces analyses ont été effectuées avec un goniomètre ALV5000 Laser de ALV équipé d'un corrélateur ALV-5000/EPP Multiple Tau Digital possédant un temps d'échantillonnage initial de 125 ns. La source du rayonnement est un laser hélium-néon (22 mW) de longueur d'onde 632,8 nm. Les mesures ont été effectuées à des angles θ variant de 40° à 150° et sur une période de 30 secondes par angle. Le programme utilisé pour le traitement des données est le logiciel d'acquisition et de contrôle de l'ALV : ALV-5000E.

2.3.2.3 Diffusion de neutrons aux petits angles

Cette technique permet d'observer les dimensions caractéristiques des échantillons, y compris la structure interne des particules, variant entre 5 et 500 Å. L'expression de l'intensité diffusée par une solution de particules diluées (pas d'interactions entre les particules) est :

$$I(q) = \Phi (\Delta\rho)^2 V_p P(q)$$

avec Φ la fraction volumique en particules dans l'échantillon, $\Delta\rho$ le facteur de contraste qui correspond à la différence de densité de longueur de diffusion entre l'objet diffusant et le solvant (provient de la différence de longueur de diffusion cohérente entre les atomes), V_p le volume d'une particule et $P(q)$ le facteur de forme. Pour déterminer les paramètres du facteur de forme, et ainsi mesurer les paramètres géométriques des objets en solution, il faut ajuster le facteur de forme correspondant à la morphologie des particules à la courbe expérimentale.

Les expériences de diffusion de neutrons ont été réalisées au Laboratoire Léon Brillouin (CEA-Saclay), en collaboration avec Annie Brûlet, sur les spectromètres PACE (petits angles) et TPA (très petits angles). Différentes configurations des spectromètres ont été utilisées (λ = longueur d'onde du faisceau de neutrons et D = distance échantillon – détecteur) afin de couvrir une gamme de vecteurs d'onde q la plus large possible :

- Très petits q (TPA) : $\lambda = 6 \text{ \AA}$, $D = 6 \text{ m}$ ($1.10^{-3} \text{ \AA}^{-1} < q < 1,1.10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$)
- Petits q (PACE) : $\lambda = 17 \text{ \AA}$, $D = 4,7 \text{ m}$ ($2,4.10^{-3} \text{ \AA}^{-1} < q < 2,6.10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$)
- Moyens q (PACE) : $\lambda = 6 \text{ \AA}$, $D = 3 \text{ m}$ ($1,1.10^{-2} \text{ \AA}^{-1} < q < 1,1.10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$)
- Grands q (PACE) : $\lambda = 6 \text{ \AA}$, $D = 1 \text{ m}$ ($3,6.10^{-2} \text{ \AA}^{-1} < q < 3,7.10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$)

La concentration théorique en polymère des échantillons est initialement de 10 mg/mL (avant les dilutions pour appliquer les chocs hypertoniques), et les solutions de glucose utilisées pour les chocs ont été préparées avec 75 % de glucose deutéré et 25 % de glucose hydrogéné afin d'obtenir la même densité de longueur de diffusion que le D₂O. Les mesures ont été réalisées à température ambiante en utilisant des cellules en quartz Hellma de 1 mm d'épaisseur.

Remarque : l'intensité brute mesurée par les détecteurs n'est pas uniquement due à l'intensité diffusée par les particules contenues dans l'échantillon. A cela s'ajoute plusieurs termes provenant du solvant, de la cellule, le bruit de fond... Il est donc nécessaire de faire des mesures de référence (cellule vide, transmission, eau légère et eau lourde pour les échantillons en solution aqueuse) et de traiter les données (programme PAsinet – LLB) pour obtenir le signal de diffusion cohérente en intensité absolue.

2.3.3 Techniques d'imagerie

Les vésicules sont des objets transparents difficiles à observer en microscopie en fond clair. Différentes méthodes permettant d'augmenter le contraste, et ainsi les visualiser aisément, ont été utilisées au cours de cette thèse.

2.3.3.1 Microscopie en contraste de phase

C'est la technique de microscopie qui a été la plus utilisée au cours de cette thèse. Elle permet de convertir une différence de phase en contraste observable (différence d'intensité). Cette technique exploite le fait que certains échantillons n'absorbent pas la lumière mais retardent la phase de la lumière diffractée d'un quart de longueur d'onde. En utilisant un anneau circulaire dans le condenseur, un cône de lumière non diffractée (de référence) est produit. Ce cône est superposé à un anneau de phase de taille similaire dans l'objectif, ce qui accélère la phase d'un quart de longueur d'onde. La différence de phase entre la lumière diffractée et la lumière non diffractée est alors d'une demi-longueur d'onde, résultant en des interférences destructives qui augmentent le contraste entre un échantillon foncé et un fond clair.

Le microscope optique utilisé pour ces observations est un microscope droit BX61WI de chez Olympus, avec un objectif à contraste de phase (grossissement $\times 20$). Les photographies ont été prises avec un appareil photo numérique Canon EOS 60D.

2.3.3.2 Microscopie en contraste interférentiel différentiel

Une partie des observations a été faite en utilisant la microscopie en contraste interférentiel différentiel (DIC), dans laquelle un système optique (prisme de Wollaston) dédouble le faisceau lumineux avant la traversée de l'échantillon et un système symétrique recompose les deux faisceaux en les faisant interférer. Cela donne des images où les structures apparaissent bordées de blanc d'un côté et de noir de l'autre, induisant une fausse impression de relief.

Le microscope utilisé pour ces observations est un microscope inversé Axiovert 40 de la marque Zeiss équipé d'une caméra Gigabit Ethernet (VG-2M Vieworks). Les observations ont été menées avec des objectifs $\times 40 / 0,7$ ou $\times 100 / 1,3$ (grossissement / ouverture numérique).

2.3.3.3 Microscopie de fluorescence

Les observations en microscopie de fluorescence (ou épifluorescence) ont été possibles en ajoutant des espèces fluorescentes dans la membrane des vésicules ou dans leur milieu intravésiculaire.

Le microscope utilisé pour ces observations est un microscope inversé Axiovert 40 de la marque Zeiss équipé d'une caméra Gigabit Ethernet (VG-2M Vieworks). Les observations ont été réalisées avec des objectifs $\times 40 / 0,7$ ou $\times 100 / 1,3$ (grossissement / ouverture numérique). La source lumineuse est une lampe à mercure, et différents filtres ont été utilisés pour détecter le signal de la fluorescéine (FITC-3540B de chez Semrock, Em 513-560), de la Rhodamine (Em 573-637) ou des deux signaux à la fois (filtre triple bande : Em 448-478 ; Em 512-552 ; Em 600-663).

2.3.3.4 Microscopie confocale

Un des inconvénients de la microscopie à champ large est qu'il faut que l'objet observé soit dans le plan focal pour avoir une image nette. Les objets épais sont par conséquent souvent flous, car la lumière émise par le plan focal est superposée à celle émise par les plans adjacents.

Le principe sur lequel est basée la microscopie confocale permet de résoudre ce problème. L'échantillon n'est plus éclairé dans sa totalité par une lumière blanche, mais par un faisceau laser focalisé sur un volume de taille réduite. Aussi, un sténopé positionné devant le détecteur, dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif (plans confocaux), permet de ne laisser passer que les photons provenant du plan focal. La combinaison de ces deux principes permet d'obtenir une coupe optique nette, correspondant uniquement au plan focal, d'une zone très localisée de l'échantillon (un voxel).

La section optique de l'échantillon, qui est une image de l'échantillon de faible profondeur de champ et à une hauteur donnée, est obtenue en déplaçant le point de focalisation de la lumière d'excitation dans le plan (système de balayage). Le déplacement vertical de l'objectif permet quant à lui d'obtenir les sections optiques à différents niveaux dans l'épaisseur de l'échantillon, et ainsi de faire une observation tridimensionnelle. L'objet n'est donc pas directement observé par l'utilisateur ; celui-ci voit une image recomposée par ordinateur.

2.3.3.4.1 Matériel utilisé

Ces observations ont été réalisées avec un microscope inversé IX81 de la marque Olympus équipé d'une tête confocale Olympus Fluoview 1000. Les lasers utilisés comme sources lumineuses sont, en fonction du fluorophore, un laser He-Ne (1 mW) avec une longueur d'onde de 543 nm ou un laser Argon multiligne (40 mW) qui permet des rayonnements de longueur d'onde 458, 488 ou 515 nm. Tous les lasers sont de la marque Melles Griot.

2.3.3.4.2 Empilement d'images

La microscopie confocale permet de réaliser un empilement d'images correspondant à des sections optiques de faible profondeur de champ à différentes hauteurs selon l'axe z. Au cours de ces travaux, un objectif à immersion d'huile ayant un grossissement $\times 60$ (résolution en z $\sim 0,844 \mu\text{m}$, résolution en x-y $0,176 \mu\text{m}$ et $\text{NA} = 1,42$) a été utilisé pour enregistrer l'évolution de taille des vésicules au cours du temps. De nombreux empilements sont enregistrés lors du suivi temporel de l'évolution de la taille d'une vésicule suite à un choc osmotique. Chacun d'entre eux est exporté au format Tiff puis traité avec le logiciel ImageJ afin de déterminer le volume de la vésicule observée.

L'utilisation d'un outil de représentation 3D des vésicules (3D-Viewer) permet de mettre en évidence un défaut de reconstruction des vésicules : elles apparaissent étirées selon l'axe vertical (figure 2.10.A). De plus, une partie de ces vésicules sont déformées à cause de l'aspiration dans les pièges microfluidiques.

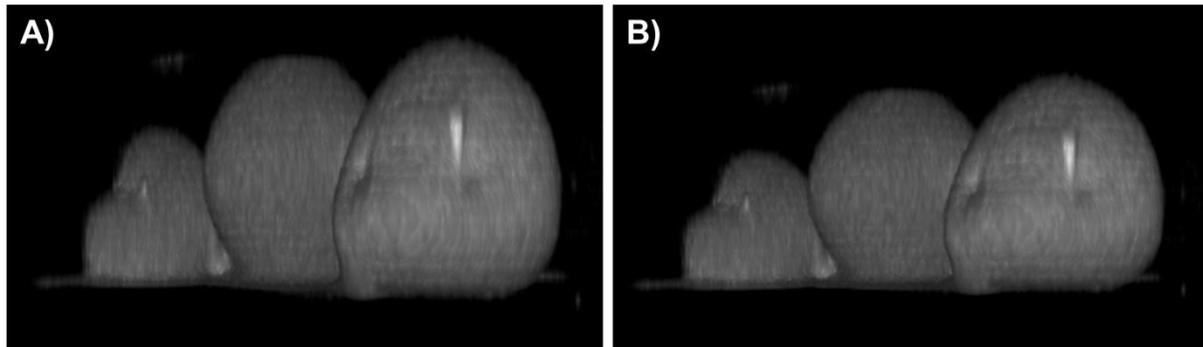


Figure 2.10. Reconstructions volumiques (ImageJ - 3D Viewer) de vésicules de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ encapsulant de l’Alexa Fluor 488 Dextran bloquées dans un piège hydrodynamique. La distance entre chaque section optique est fixée A) sans facteur correctif et B) avec correction par un facteur 0,8524 (facteur ASF).

L’étirement des vésicules selon l’axe vertical sur la figure 2.10.A est dû à la différence d’indice de réfraction n entre le milieu d’immersion de l’objectif (huile d’indice de réfraction $n_{\text{huile}} = 1,518$) et la solution qui contient les vésicules (milieu aqueux, $n_{\text{eau}} = 1,33$). Cela crée une réfraction au niveau de la lamelle de verre qui résulte en un étirement apparent des objets scannés.¹⁹³ Il est possible de corriger ce défaut en multipliant la distance entre chaque section optique par un facteur correctif « Axial scaling factor » (ASF) calculé à partir des caractéristiques de l’objectif (figure 2.10.B). Dans notre cas, la valeur du facteur ASF calculée, sans tenir compte de la couche de PDMS qui couvre la lamelle de verre, est 0,8524. Il faut également multiplier la distance imposée entre les différentes sections optiques ($0,37 \mu\text{m}$ afin d’avoir un bon échantillonnage) par ce facteur pour avoir une estimation correcte du volume d’une vésicule quand on le calcule à partir d’un empilement.

2.3.3.4.3 Traitement des empilements d’images : calcul du volume 3D vs. 2D

Pour extraire la valeur du volume d’un empilement de sections optiques il faut déterminer les contours de la vésicule sur chaque image. Cela a été fait en utilisant l’outil d’analyse de particules du logiciel ImageJ (Analyse → Analyse Particles). Toutes les images de l’empilement ont préalablement été binarisées en utilisant un seuil d’intensité déterminé comme suivant :

- L’intensité de fluorescence extravésiculaire (I_{ext} , σ_{Iext}) est mesurée sur la section optique la plus haute de chaque empilement.
- L’intensité de fluorescence intravésiculaire (I_{int} , σ_{Iint}) est mesurée à l’intérieur de la vésicule sur une des tranches située au milieu de l’empilement.
- La valeur du seuil utilisée pour chaque empilement est calculée en utilisant la formule :

$$Seuil = \frac{(I_{int} - 2\sigma_{I_{int}}) + (I_{ext} + 2\sigma_{I_{ext}})}{2}$$

La procédure suivante a été établie pour standardiser la reconnaissance de contours car l'intensité de fluorescence varie au cours de l'expérience (photoblanchiment) et par conséquent n'est pas la même sur tous les empilements (on ne tient pas compte du photoblanchiment au cours d'un même empilement d'images).

Il y a deux méthodes pour déterminer le volume d'une vésicule après avoir fait la reconnaissance de contours, qui permet en fait de mesurer l'aire de la tranche d'une vésicule sur l'ensemble des sections optiques (figure 2.11).

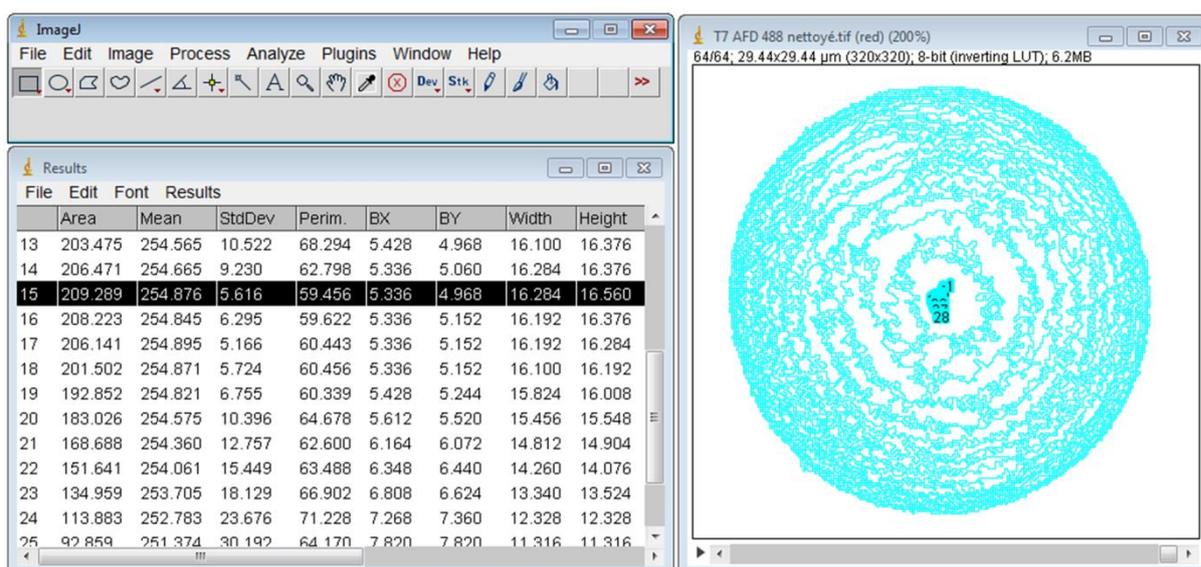


Figure 2.11. Résultats obtenus suite à la reconnaissance de contours faite avec ImageJ sur une vésicule de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / POPC (75% / 25%).

Pour les reconstructions dites « 3D », il faut multiplier la somme des aires mesurées pour tout l'empilement par la distance séparant les sections optiques (avec la correction du facteur ASF). Pour les reconstructions dites « 2D », le volume de la vésicule est extrapolé à partir de l'aire maximale mesurée pour l'empilement. En effet, l'aire est supposée être maximale au centre de la vésicule, ce qui permet de mesurer son rayon et donc son volume. Pour pouvoir faire cette approximation, il faut s'assurer que la vésicule est bien sphérique.

Les mesures « 2D » sont intéressantes car il n'est pas nécessaire de faire le suivi sur toute la vésicule mais seulement sur la zone centrale, ce qui permet d'améliorer la résolution temporelle de la courbe volume / temps (l'empilement est fait plus rapidement). Il faut malgré tout faire attention, il y a une légère dérive en *z* du microscope confocal en fonction du temps. De plus il arrive que la lamelle sur laquelle la puce microfluidique est collée bouge très légèrement entre

la fin d'un empilement et le début du suivant (au moment où l'objectif se repositionne, l'huile entre l'objectif et la lamelle entraîne cette dernière qui n'est pas parfaitement tenue par le support « home-made » qui s'adapte à la platine).

2.3.3.5 Cryo microscopie électronique à transmission

Cette technique permet l'observation directe de vésicules en solution à l'échelle nanométrique. Les échantillons ont été préparés comme suivant : 5 μ L de solution à 10 mg/mL ont été déposés sur une grille (400 Cu) fraîchement déchargée et couverte d'un film de carbone troué. Cette grille a ensuite rapidement été plongée dans l'éthane liquide refroidi par un réfrigérant à l'azote liquide conçu à l'ICS (Strasbourg). L'échantillon a ensuite été placé dans un support réfrigéré Gatan 626 et transféré dans un cryo microscope électronique à transmission FEI-Tecnaï G2. Les observations ont été réalisées sous faible irradiation et les photographies prises avec une caméra CDD à balayage lent Eagle 2k2k.

Chapitre 3 :
Synthèse et auto-assemblage de
copolymères triblocs

3 Synthèse et auto-assemblage de copolymères triblocs

Sommaire Chapitre 3

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.1 | Introduction – Etat de l’art..... | 97 |
| 3.2 | Synthèse des copolymères triblocs | 103 |
| 3.2.1 | PGA- <i>b</i> -PDMS- <i>b</i> -PGA..... | 103 |
| 3.2.2 | PEO- <i>b</i> -PDMS- <i>b</i> -PEO..... | 106 |
| 3.3 | Etude de l’auto-assemblage | 107 |
| 3.3.1 | PGA- <i>b</i> -PDMS- <i>b</i> -PGA..... | 107 |
| 3.3.1.1 | Solubilisation directe..... | 107 |
| 3.3.1.2 | Electroformation | 108 |
| 3.3.2 | PEO- <i>b</i> -PDMS- <i>b</i> -PEO..... | 111 |
| 3.3.2.1 | Formation de vésicules géantes..... | 111 |
| 3.3.2.2 | Formation de vésicules nanométriques | 112 |
| 3.3.3 | Autres copolymères | 114 |
| 3.4 | Conclusion | 115 |
| 3.5 | Annexes | 116 |
| 3.5.1 | Synthèse des PGA- <i>b</i> -PDMS- <i>b</i> -PGA | 116 |
| 3.5.1.1 | Protocole de synthèse | 116 |
| 3.5.1.2 | Caractérisation des copolymères PBLG- <i>b</i> -PDMS- <i>b</i> -PBLG | 117 |
| 3.5.1.3 | Caractérisation des copolymères PGA- <i>b</i> -PDMS- <i>b</i> -PGA..... | 118 |
| 3.5.2 | Synthèse des PEO- <i>b</i> -PDMS- <i>b</i> -PEO | 119 |
| 3.5.2.1 | Protocole de synthèse | 119 |
| 3.5.2.2 | Caractérisation des copolymères..... | 120 |

3.1 Introduction – Etat de l’art

L’auto-assemblage de copolymères amphiphiles en solution aqueuse conduit à de nombreuses structures (voir partie 1.1). Parmi elles, les morphologies de type micellaire et vésiculaire présentent un fort potentiel pour les applications de vectorisation, et de membranes modèles qui imitent les systèmes biologiques dans le cas des vésicules.¹⁹⁴ L’utilisation de copolymères amphiphiles dont au moins un des blocs est un polypeptide apporte des degrés de fonctionnalité supplémentaires. En effet, au contraire des polymères synthétiques plus conventionnels qui présentent souvent une conformation de chaîne flexible, les polypeptides peuvent adopter des conformations secondaires telles que les hélices- α ou les feuillets- β (figure 3.1).¹⁹⁵ Certains polypeptides ont également des propriétés biofonctionnelles, comme la polyarginine qui facilite l’internalisation cellulaire.¹⁹⁶

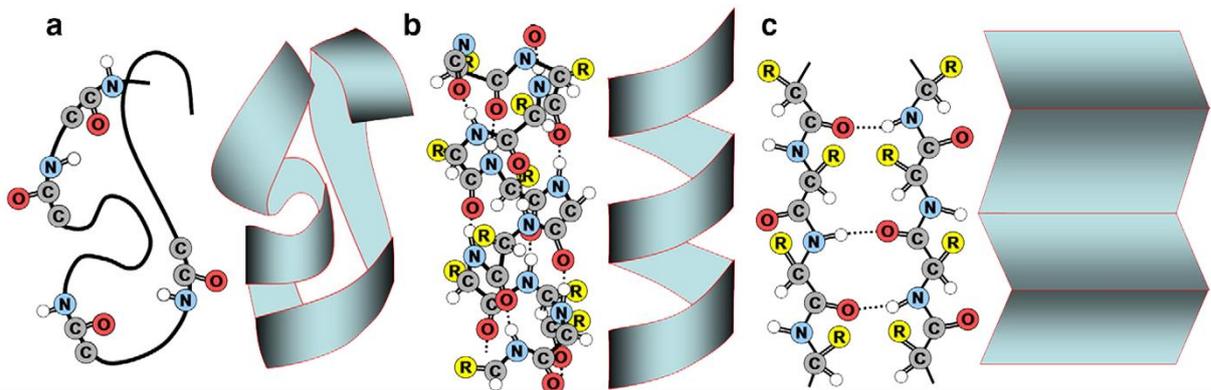


Figure 3.1. Représentation schématique des structures secondaires communément adoptées par les polypeptides : a) chaîne Gaussienne, b) hélice- α , et c) feuillet- β antiparallèle.¹⁹⁵

Ces conformations secondaires confèrent un caractère rigide au bloc peptidique, induisant une forte anisotropie conformationnelle qui accentue l’incompatibilité entre les deux blocs de l’amphiphile. Cela modifie la séparation de phase de ces copolymères. Effectivement, à l’effet hydrophobe s’ajoute la tendance des blocs rigides à s’aligner en un empilement compact¹⁹⁷ proche d’une phase cristal-liquide, stabilisée par des interactions intermoléculaires telles que des liaisons hydrogènes ou du π -stacking. Ces interactions ont été modélisées par Renders *et al.* à l’aide d’une interaction attractive de Maier-Saupe.¹⁹⁸

La structure secondaire des polypeptides dépend de leur environnement, ce qui donne un caractère stimuable aux structures auto-assemblées et donc la capacité d’interagir avec des milieux biologiques. Les polypeptides possédant un groupement ionisable, tels que le poly(acide-L-glutamique) (PGA)¹⁹⁹ ou la poly(L-Lysine) (PLys),²⁰⁰ sont sensibles au pH et changent de conformation secondaire autour de leur pKa. En plus d’être sensible au pH, la PLys change de conformation secondaire en réponse à un changement de température : sous sa forme

neutre, une transition d'une hélice- α à un feuillet- β est observée quand on augmente la température.^{201, 202} La modification de polypeptides pour les rendre photosensibles ou réactifs aux conditions d'oxydo-réduction a également été réalisée.²⁰³

Le poly(acide-L-glutamique) est un polypeptide qui, en plus d'être biocompatible, change de conformation secondaire en réponse à une variation de pH. Sous sa forme chargée ($\text{pH} > \text{pK}_a \text{ PGA} \sim 4,1$) le polyélectrolyte est hydrophile et sa conformation varie d'une chaîne étirée dans un milieu de faible salinité à une conformation de chaîne gaussienne quand les charges des groupements carboxyliques sont écrantées. En revanche, sous sa forme neutre ($\text{pH} < \text{pK}_a \text{ PGA}$) le PGA adopte une conformation en hélice- α rigide.¹⁹⁹

Cette transition de la conformation secondaire autour du pK_a a permis de créer de nombreuses structures pH stimulables. Couplé avec des polymères hydrophobes, il permet de former des copolymères amphiphiles qui s'assemblent en vésicules ou micelles à $\text{pH} > \text{pK}_a \text{ PGA}$ (forme chargée du PGA) en fonction du ratio entre les blocs hydrophiles / hydrophobes. Kukula *et al.*²⁰⁴ ont ainsi montré qu'à $\text{pH} = 6$ le PBut₂₇-*b*-PGA₆₄ forme des micelles, et que le PBut₈₅-*b*-PGA₅₅ et le PBut₁₁₉-*b*-PGA₂₄ forment des vésicules. Ces morphologies sont conservées même après la diminution du pH et la transitions des chaînes de PGA vers des hélices- α .¹⁹⁹ Une autre étude publiée sur ces copolymères a montré une diminution importante du rayon des vésicules formées avec le PBut₄₀-*b*-PGA₁₀₀ lors du changement de conformation secondaire du polypeptide vers une hélice- α .²⁰⁵ Cette manipulation de la taille des vésicules est possible indépendamment de la force ionique du milieu, même quand les charges du polyélectrolyte sont complètement écrantées, et ce de manière parfaitement réversible. Des études supplémentaires ont montré que la stabilité de ces assemblages peut être augmentée en réticulant partiellement le bloc hydrophobe de PBut (*via* les doubles liaisons éthyléniques)¹⁴⁰ ou la couronne hydrophile de PGA (utilisation des groupements acide carboxyliques)²⁰⁶ et qu'il est possible de réaliser ces assemblages avec d'autres blocs hydrophobes comme le poly(triméthylène carbonate) (PTMC)²⁰⁷, qui est biodégradable, ou le polystyrène (PS).²⁰⁸

Ce type de système peut donc être adapté pour servir de vecteur et délivrer des principes actifs *in vivo*. Dans cette optique, Lin *et al.*²⁰⁹ ont décrit la préparation par co-micellisation de micelles avec un cœur hydrophobe de poly(oxyde de propylène) (PPO) et une couronne de PEO et de PGA mélangés. En conditions extérieures acides, les chaînes de PGA passent sous forme d'hélice- α , entraînant une micro-séparation de phase dans la couronne des micelles et la formation de canaux de PEO (figure 3.2). Ces derniers, qui relient le cœur hydrophobe de PPO

au milieu extérieur, accélèrent la libération des agents thérapeutiques encapsulés dans la micelle.

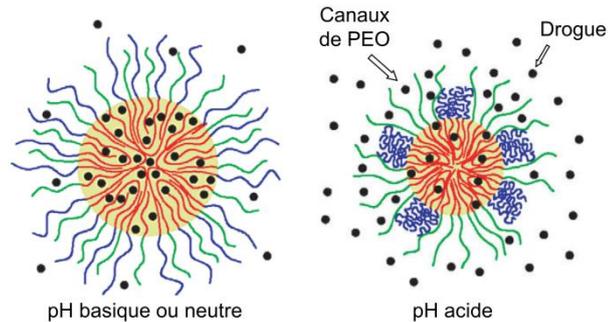


Figure 3.2. Représentation schématique des structures supposées pour les micelles hybrides de PGA-*b*-PPO-*b*-PGA/PEO-*b*-PPO en fonction du pH (adapté de ²⁰⁹).

Une stratégie pour améliorer le caractère stimuable des structures formées par auto-assemblage est de coupler au PGA un second bloc lui aussi sensible à un stimulus externe. Le copolypeptide PGA-*b*-PLys,¹⁴ dont chaque bloc peut changer de conformation secondaire en fonction du pH, permet de former des vésicules à pH acides et basiques mais est soluble à pH neutre (figure 3.3). En effet, à $\text{pH} < \text{pKa}_{\text{PGA}}$ le bloc PLys est un polyélectrolyte cationique soluble et le bloc PGA est en hélice- α ; à $\text{pH} > (\text{pKa}_{\text{PLys}} \sim 10,4)$ la conformation des blocs est inversée ; et à pH neutre le copolypeptide est zwitterionique, les deux blocs sont des chaînes libres solubles. Dans ce système, qui est dit « schizophrénique », le changement de conformation secondaire des blocs peptidiques est la force motrice de l'auto-assemblage.

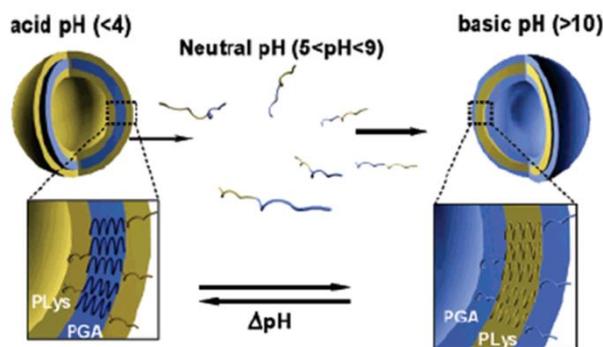


Figure 3.3. Représentation schématique de l'auto-assemblage en vésicules du PGA₁₅-*b*-PLys₁₅ en fonction du pH.¹⁴

Un comportement similaire, mais dans les gammes de pH inverses, a été obtenu en couplant le PGA à un bloc PDMAEMA.²¹⁰ Des structures vésiculaires sont obtenues à $\text{pKa}_{\text{PGA}} < \text{pH} < \text{pKa}_{\text{PDMAEMA}}$ grâce aux interactions électrostatiques entre les deux blocs, et le retour sous une forme non chargée d'un des deux blocs entraîne la destruction des vésicules.

Le couplage avec un bloc sensible à la température, tel que la jeffamine (poly[(oxyde d'éthylène)-*stat*-(oxyde de propylène)], P(EO₆-*stat*-PO₂₉)) ou le PPO, permet de former des agrégats sensibles à la fois au pH et à la température.^{101, 211} Des micelles schizophréniques de PNIPAM₆₅-*b*-PGA₁₁₀ et PNIPAM₅₅-*b*-PGA₃₅ ont également été étudiées par différentes équipes.^{42, 212} Ces copolymères, qui sont solubles dans l'eau à température ambiante et pH élevé, forment des micelles ayant un cœur de PNIPAM et une couronne de PGA quand la température du milieu dépasse la température limite de solubilité (LCST : Lower Critical Solubility Temperature) du bloc PNIPAM (~ 32 – 38°C). Cela est dû à la transition de la chaîne PNIPAM de l'état hydraté vers l'état déshydraté. Au contraire, en conditions acides (pH < pK_a PGA) et de température faible (T < LCST_{PNIPAM}), le système s'auto-assemble sous forme de micelles ayant un cœur de PGA et une couronne de PNIPAM.

En plus de l'intérêt évident que pourrait avoir de nouvelles vésicules utilisant le PGA comme bloc hydrophile pour des applications de libération contrôlée de principe actifs,² ce type de système serait particulièrement adapté pour améliorer la compréhension des phénomènes impliqués dans les processus de biominéralisation. Les biominéraux sont des matériaux produits par une précipitation minérale au contact de matières organiques. Il est suspecté que dans beaucoup de cas la phase inorganique, sous forme amorphe ou non précipitée, est transportée jusqu'au site de minéralisation par des vésicules lipidiques.^{213, 214} En particulier, lors de la minéralisation de la nacre, le carbonate de calcium pourrait précipiter en premier comme phase amorphe dans des vésicules intracellulaires avant de cristalliser à proximité ou en contact d'une matrice organique extracellulaire. Il est également possible que cette minéralisation se produise *via* la précipitation du carbonate de calcium directement dans les compartiments délimités par cet échafaudage organique (figure 3.4).²¹⁵

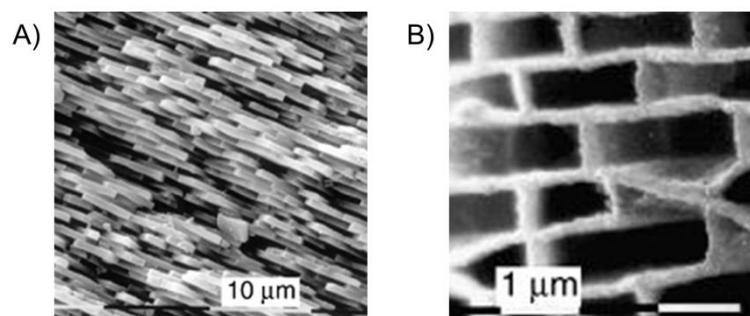


Figure 3.4. A) Fracture verticale de la nacre montrant les tablettes d'aragonite insérées dans la matrice organique. B) Matrice organique après dissolution des tablettes.²¹⁵

Les structures vésiculaires peuvent apporter ce confinement et servir de réacteur de minéralisation (figure 3.5), comme cela a été prouvé lors d'expériences de précipitation de

phosphate de calcium dans des vésicules de PMOXA-*b*-PDMS-*b*-PMOXA⁽¹⁵⁹⁾ et de carbonate de calcium dans des vésicules de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂.⁽⁴⁾

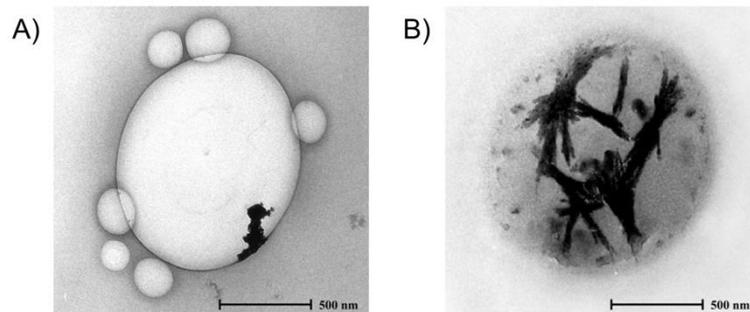


Figure 3.5. Images de microscopie électronique à transmission d'une vésicule de PMOXA-*b*-PDMS-*b*-PMOXA encapsulant du phosphate après A) une heure et B) 24 heures d'incubation dans une solution de CaCl₂ en présence de l'ionophore U22324.¹⁵⁹

L'utilisation de vésicules polymères pourrait également permettre d'étudier le rôle de la matrice organique comme partenaire de nucléation, les surfaces des matrices organiques dans les biominéraux étant souvent recouvertes de macromolécules acides.^{216,217} Les groupements acide carboxylique du PGA présents en surface des vésicules pourraient ainsi intervenir dans les processus de nucléation.⁸

Le poly(acide-L-glutamique) a donc été choisi en tant que bloc hydrophile pour la synthèse de nouveaux copolymères amphiphiles car il permettrait, sous réserve de former des morphologies vésiculaires par auto-assemblage, des utilisations en tant que micro- ou nano-réacteur de minéralisation ou en tant que vecteur pH-sensible pour des applications de vectorisation de principes actifs.

Le PEO a également été sélectionné pour former des structures équivalentes dont la charge de surface est neutre et ainsi permettre d'étudier l'influence des charges de surface apportées par les groupements carboxyliques sur les diverses applications. De plus, bien que ce polymère hydrophile ne soit pas présent dans la nature, il est très peu toxique et est largement utilisé dans les applications de vectorisation. La PEGylation des liposomes, *i.e.* le recouvrement de leur surface par des chaînes de poly(éthylène glycol) (de même nature chimique que le PEO mais obtenues par une voie de synthèse différente), améliore leur temps de circulation dans le sang.²¹⁸ En effet, cela forme une couche hydratée autour de ces vecteurs qui diminue les interactions non spécifiques avec les composants du sang (opsonisation) et leur permet ainsi d'échapper au système immunitaire.⁷ Ces propriétés « furtives », qui augmentent le temps de demi-vie des particules, améliorent la probabilité que le principe actif atteigne son site d'action avant d'être reconnu comme étant un corps étranger et évacué du système sanguin. Par exemple, la

PEGylation de liposomes encapsulant la drogue anti-tumorale Doxorubicine entraîne un temps de demi-vie huit fois plus élevée que pour des liposomes classiques.²¹⁹ Une conséquence directe est la diminution de la fréquence d'administration du traitement, ce qui améliore la qualité de vie des patients et diminue les coûts du traitement. Il existe aussi des systèmes basés sur l'auto-assemblage de copolymères amphiphiles utilisant un bloc hydrophile de PEG.²²⁰ Ce sont principalement des structures micellaires avec un cœur qui joue le rôle de réservoir pour l'encapsulation, et une couronne dont la fonctionnalité chimique permet de contrôler le profil pharmacocinétique et / ou conférer des propriétés de ciblage.²²¹

Le bloc hydrophobe retenu pour former les membranes est le PDMS car il est très fluide à température ambiante (sa température de transition vitreuse est $T_g \sim -129^\circ\text{C}$). En effet, les polymersomes sont en général très peu perméables et il est nécessaire de contrôler la perméabilité aux molécules d'intérêt pour les applications de minéralisation et de vectorisation. L'incorporation de protéines transmembranaires dans la membrane des polymersomes¹⁴⁶ ou l'utilisation de transporteurs ioniques sont des moyens d'y parvenir.⁴ Cela nécessite un bloc hydrophobe extrêmement flexible capable d'accepter les contraintes géométriques et dynamiques qui vont de pair avec leur inclusion pour ne pas inhiber leur activité biologique (voir partie 1.4.2.1). De plus, pour favoriser l'auto-assemblage sous forme lamellaire et être en mesure de comparer les résultats à ceux obtenus avec un copolymère commercial (PDMS₂₂-g-PEO₁₂), l'architecture choisie pour la synthèse des copolymères est celle de copolymères triblocs.

3.2 Synthèse des copolymères triblocs

3.2.1 PGA-*b*-PDMS-*b*-PGA

Les PGA-*b*-PDMS-*b*-PGA ont été obtenus suite à la déprotection des groupements benzyles de copolymères triblocs PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG préparés *via* la polymérisation de BLG-NCA par ouverture de cycle à partir d'un macro-amorceur H₂N-PDMS-NH₂ commercial. L'utilisation d'amines primaires pour amorcer cette réaction est connue depuis longtemps et permet de former des polypeptides de fort poids moléculaire.²²² De plus, conduire cette polymérisation dans un milieu réactionnel qui contient peu d'impuretés permet de palier au faible contrôle généralement observé et ainsi obtenir des copolymères ayant une bonne définition.²²³ La stratégie de synthèse est représentée sur le schéma 3.1.

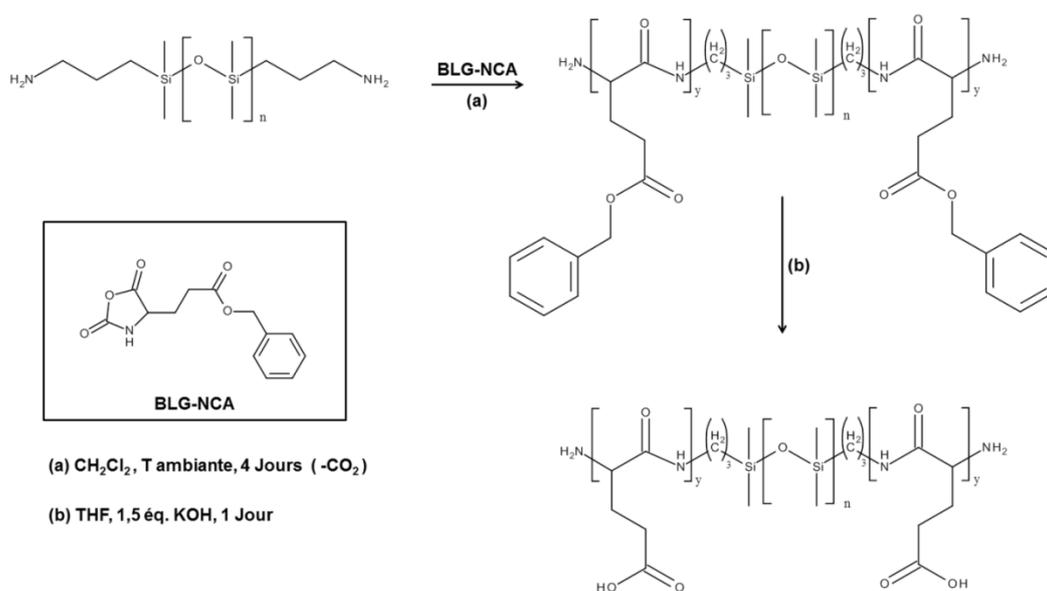


Schéma 3.1. Schéma réactionnel de la synthèse des PGA-*b*-PDMS-*b*-PGA. L'étape (a) est la polymérisation par ouverture de cycle des BLG-NCA et l'étape (b) la déprotection des groupements benzyles par hydrolyse basique.

Le protocole expérimental suivi, décrit dans l'annexe 3.5.1.1, a été adapté à partir de celui décrit dans la publication de Sanson *et al.*⁶¹ pour la préparation des PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG et du protocole de Rodriguez-Hernandez *et al.*¹⁴ pour l'étape de clivage des groupements benzyles.

Les copolymères obtenus suite à la polymérisation des BLG-NCA ont été caractérisés en utilisant diverses méthodes d'analyses (des résultats sont présentés en annexe 3.5.1.2). Malgré des difficultés pour solubiliser les copolymères, différentes RMN ¹H ont mis en évidence des signaux caractéristiques de chaque bloc. Le spectre obtenu en menant cette analyse dans le DMSO-d₆, qui est un bon solvant des blocs PBLG mais pas du PDMS, révèle un signal

caractéristique du bloc hydrophobe ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}$, $(6 \times \text{DP}_{\text{PDMS}})\text{H}$, $\delta=0$ ppm) et des signaux caractéristiques des groupements benzyles portés par les polypeptides ($(\text{C}_6\text{H}_5$, $(5 \times \text{DP}_{\text{PBLG}})\text{H}$, $\delta=7,3$ ppm) et $(\text{Bz}-\text{CH}_2-\text{O}$, $(2 \times \text{DP}_{\text{PBLG}})\text{H}$, $\delta=5$ ppm)). Une seconde analyse réalisée dans le chloroforme-d, qui est un bon solvant du PDMS mais pas du PBLG, révèle les mêmes signaux caractéristiques. Le degré de polymérisation DP total du PBLG, qui correspond au nombre de monomères ayant réagi par macro-amorceur (deux fonctions amines), est calculé en utilisant l'intégration des signaux caractéristiques du PBLG et du signal des protons de la chaîne de PDMS. L'intégration du signal ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}$, $\delta=0$ ppm) est fixée à $(6 \times \text{DP}_{\text{PDMS}})\text{H}$ et trois valeurs de DP_{PBLG} sont calculées à partir de l'intégration des autres signaux : les groupements benzyles (C_6H_5 , $(5 \times \text{DP}_{\text{PBLG}})\text{H}$, $\delta=7,3$ ppm)_{DMSO-d6} et les protons portés par les carbones en α des groupements benzyles ($\text{Bz}-\text{CH}_2-\text{O}$, $(2 \times \text{DP}_{\text{PBLG}})\text{H}$, $\delta=5$ ppm)_{DMSO-d6} et $\text{CHCl}_3\text{-d}$. Le DP total retenu est la moyenne de ces trois valeurs. Les résultats obtenus sont en bon accord avec les rapports $\text{H}_2\text{N-PDMS-NH}_2 / \text{BLG-NCA}$ introduits dans les milieux réactionnels (tableau 3.1).

| Polymère synthétisé | DP _{macro-amorceur} | DP _{PBLG total th} | DP _{PBLG total exp} ^(a) | Rendement massique ^(b) |
|--|------------------------------|-----------------------------|---|-----------------------------------|
| PBLG ₁₂ - <i>b</i> -PDMS ₃₉ - <i>b</i> -PBLG ₁₂ | 39 | 24 | 23,5 | 88,8 % |
| PBLG ₉ - <i>b</i> -PDMS ₃₉ - <i>b</i> -PBLG ₉ | 39 | 18 | 17,9 | 81,1 % |
| PBLG ₁₉ - <i>b</i> -PDMS ₃₉ - <i>b</i> -PBLG ₁₉ | 39 | 40 | 38,4 | 92,8 % |
| PBLG ₁₅ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PBLG ₁₅ | 66 | 30 | 29,1 | 88,5 % |
| PBLG ₁₁ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PBLG ₁₁ | 66 | 20 | 22,9 | 80,7 % |
| PBLG ₉ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PBLG ₉ | 66 | 14 | 18,6 | 69,3 % |
| PBLG ₂₀ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ | 66 | 40 | 40,3 | 56,2 % |

Tableau 3.1. Caractéristiques des synthèses des copolymères triblocs PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG.

^(a) Le degré de polymérisation DP total est calculé à partir des spectres obtenus par RMN ¹H.

^(b) Le rendement massique correspond au rapport masse expérimentale / masse théorique suite à l'étape de polymérisation.

Les copolymères triblocs ont ensuite été caractérisés par chromatographie d'exclusion stérique dans le DMSO. Les résultats montrent des distributions monomodales dont le temps de rétention est plus court que celui mesuré pour des chaînes d'homo-PBLG, ce qui semble indiquer que la polymérisation des BLG-NCA par ouverture de cycle a bien été initiée par les fonctions amines terminales des chaînes de PDMS. Il faut cependant être prudent car il n'y a pas eu de séparation des différents copolymères en fonction de leur masse car la gamme de séparation de la colonne n'est pas adaptée (il n'a pas été possible de faire les analyses dans le DMF ou le THF suite à des problèmes de solubilité).

Des analyses complémentaires par calorimétrie différentielle à balayage ont permis de confirmer la structure de copolymère à blocs car les températures de transition vitreuses T_g correspondant aux blocs PBLG ($T_g \text{ PBLG} \sim 25^\circ\text{C}$) et PDMS ($T_g \text{ PDMS} \sim -129^\circ\text{C}$) ont pu être identifiées sur les thermogrammes.

Des difficultés expérimentales ont été rencontrées pour l'étape de déprotection des groupements benzyles. Au cours de l'hydrolyse basique le copolymère perd sa solubilité, ce qui peut compliquer la déprotection des groupements benzyles encore présents le long des chaînes de PGA-*co*-PBLG. De plus, les rendements massiques obtenus ont toujours été faibles (tableau 3.2) car le copolymère obtenu suite à l'étape déprotection est très collant. Beaucoup de produit est perdu dans le ballon qui a servi pour l'hydrolyse et dans le boudin de dialyse.

| Polymère hydrolysé | Rendement massique | $f_{\text{hydrophile}}$ (wt.%) | BLG résiduels ^(a) |
|--|--------------------|--------------------------------|------------------------------|
| PGA ₁₂ - <i>b</i> -PDMS ₃₉ - <i>b</i> -PGA ₁₂ | 29,3 % | 51,8 % | Non |
| PGA ₉ - <i>b</i> -PDMS ₃₉ - <i>b</i> -PGA ₉ | 24,1 % | 44,6 % | Non |
| PGA ₁₉ - <i>b</i> -PDMS ₃₉ - <i>b</i> -PGA ₁₉ | 36,3 % | 62,9 % | Non |
| PGA ₁₅ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PGA ₁₅ | 29,5 % | 44,2 % | Oui |
| PGA ₁₁ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PGA ₁₁ | 21,0 % | 36,8 % | Oui |
| PGA ₉ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PGA ₉ | 8,5 % | 32,2 % | Oui |
| PGA ₂₀ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PGA ₂₀ | 30,5 % | 51,4 % | Oui |

Tableau 3.2. Rendements massiques des étapes de déprotection des groupements benzyles par hydrolyse basique. ^(a)La présence de groupements benzyles résiduels est mise en avant par un épaulement correspondant aux bandes de transitions vibrationnelles des esters ($\nu \text{ C=O}$, 1731 cm^{-1}) sur les courbes de FTIR.

L'autre solution envisagée pour cette étape a été l'hydrogénation catalytique, comme décrit dans le protocole de Sanson *et al.*⁶¹ Les meilleurs rendements massiques obtenus étaient du même ordre de grandeur qu'avec l'hydrolyse basique mais il n'a pas été possible de complètement retirer le catalyseur de la fraction de copolymère récupérée (coloration foncée). La grande différence de solubilité entre les deux types de blocs constitutifs de ce copolymère n'a pas permis de mesurer directement le degré de polymérisation des blocs de PGA. On se base donc sur les résultats obtenus pour les PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG avant déprotection. Les spectres d'absorption infra-rouge (annexe 3.5.1.3) montrent la disparition des bandes de transitions vibrationnelles des esters à 1731 cm^{-1} ($\nu \text{ C=O}$) et à 1163 cm^{-1} ($\nu \text{ C-O}$) ainsi que l'apparition d'une bande carboxylate à 1405 cm^{-1} ($\nu \text{ COO}^-$). Ces résultats suggèrent que la majorité des groupements benzyles ont été clivés lors de l'hydrolyse basique (il reste parfois un épaulement à 1731 cm^{-1}).

3.2.2 PEO-*b*-PDMS-*b*-PEO

Ces copolymères ont été préparés par couplage entre les PDMS diamminés et des chaînes de PEO fonctionnalisées NHS (le protocole expérimental est décrit en annexe 3.5.2.1). La stratégie de synthèse est présentée sur le schéma 3.2.

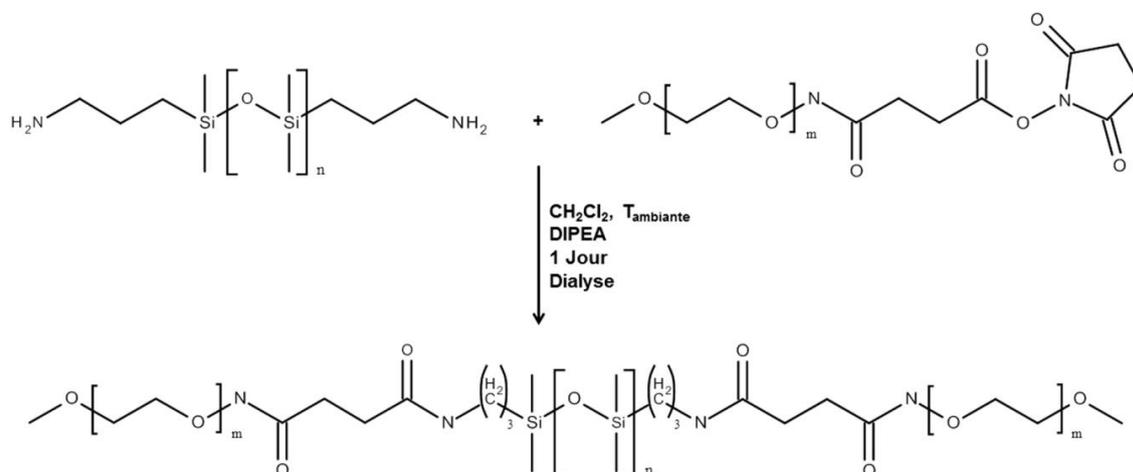


Schéma 3.2. Schéma réactionnel du couplage entre un PDMS diamminé et les blocs de PEO-NHS pour former les copolymères triblocs PEO-*b*-PDMS-*b*-PEO.

Les spectres obtenus par RMN ^1H dans le chloroforme-*d* sur les copolymères après couplage montrent des signaux caractéristiques des deux blocs, associés aux protons de la chaîne de PEO ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $(4 \times \text{DP}_{\text{PEO}})\text{H}$, $\delta = 3,6$ ppm) et à ceux de la chaîne de PDMS ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}$, $(6 \times \text{DP}_{\text{PDMS}})\text{H}$, $\delta = 0$ ppm), et des signaux qui sont apparus pendant le couplage, comme celui correspondant aux protons portés par les carbones en α des atomes d'azote qui participent aux liaisons amides entre les blocs ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$, 4H , $\delta = 3,12$ ppm, annexe 3.5.2.2). L'apparition de ce signal est due à la transformation des groupements amines du PDMS diamminé en groupements amides lors du couplage ; ces protons sont ceux qui étaient portés par le carbone en α des groupements amines ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, 4H , $\delta = 2,6$ ppm) avant le couplage. La disparition complète du signal des amines couplé à la présence des signaux relatifs aux deux blocs indique que toutes les fonctions amines ont réagi avec un PEO-NHS. Les analyses par GPC dans le THF mettent en évidence une seule population, tous les réactifs non consommés ont donc été éliminés lors de la dialyse. Deux copolymères, avec un bloc hydrophobe de masse différente, ont été préparés (Tableau 3.3).

| Polymère | Rendement massique | M_n ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) | PDI ^(a) | $f_{\text{hydrophile}}$ (wt.%) |
|--|--------------------|--|--------------------|--------------------------------|
| PEO ₁₇ - <i>b</i> -PDMS ₃₉ - <i>b</i> -PEO ₁₇ | 93,7 % | 4740 | 1,24 | 34,1 % |
| PEO ₁₇ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PEO ₁₇ | 83,8 % | 6740 | 1,26 | 23,4 % |

Tableau 3.3. Caractéristiques des synthèses et des copolymères triblocs PEO-*b*-PDMS-*b*-PEO.
^(a)L'indice de polydispersité des copolymères a été extrait des résultats de GPC.

3.3 Etude de l'auto-assemblage

Les copolymères désirés ayant été préparés avec succès, l'objectif a été de former des vésicules unilamellaires à différentes échelles, et ce de façon quantitative et reproductible. Différentes méthodes ont ainsi été employées, les résultats obtenus sont présentés dans la partie suivante.

3.3.1 PGA-*b*-PDMS-*b*-PGA

Les structures formées par ces copolymères devant entre autre servir de réacteur de minéralisation, nous avons cherché à former des polymersomes géants pour permettre les observations directes en microscopie optique.

3.3.1.1 Solubilisation directe

Les premiers essais de formation ont été faits par solubilisation directe de ces copolymères dans une solution aqueuse à $\text{pH} = 11$ afin que les groupements acides carboxyliques des chaînes de PGA soient déprotonés. Les analyses par diffusion dynamique de la lumière n'ont pas montré de particules en solution pour les copolymères triblocs formés avec le PDMS de poids moléculaire le plus élevé, bien qu'ils présentent les fractions hydrophiles *f* les plus adaptées selon les prédictions de morphologie obtenues par auto-assemblage.⁹ Il est possible que ces copolymères, très collants, ne se soient pas bien dispersés dans la solution et aient adhéré aux parois des flacons utilisés pour les essais. Le PGA₁₂-*b*-PDMS₃₉-*b*-PGA₁₂, dont le bloc hydrophobe à une masse molaire plus faible, a permis de former de nombreux agrégats en solution aqueuse à $\text{pH} = 11$.

La dissolution directe suivie d'une heure d'agitation à T_{ambiante} conduit à la formation de deux populations : des objets d'environ 200 nm de diamètre et de grosses particules. Une fraction de la solution, filtrée à 450 μm et sprayée sur une grille de TEM, a révélé de petits objets qui ressemblent à des structures vésiculaires (figure 3.6.A). Cependant, les tailles observées sont plus petites que ce qu'indiquent les résultats de DLS.

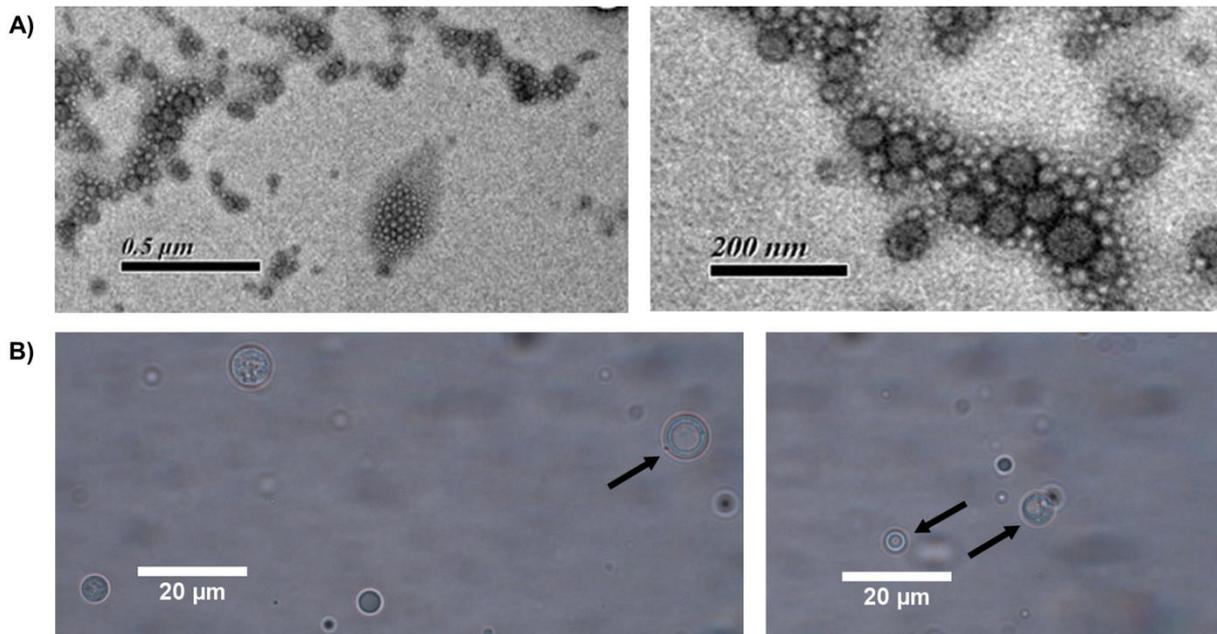


Figure 3.6. Objets obtenus par solubilisation directe du $\text{PGA}_{12}\text{-}b\text{-PDMS}_{39}\text{-}b\text{-PGA}_{12}$ dans une solution aqueuse à $\text{pH} = 11$. A) Images de TEM obtenues sur un échantillon filtré à $450\ \mu\text{m}$. B) Photographies de microscopie optique en mode DIC (les flèches noires pointent vers des vésicules vraisemblablement multilamellaires).

La solution non filtrée a été observée en microscopie optique pour déterminer la structure des agrégats de grande taille. Les images figure 3.6.B) ont été prises en mode DIC qui permet de visualiser le gradient de contraste de phase, dans le cas présent la membrane des vésicules. La majeure partie des agrégats observés sont des objets pleins, mais il y a également quelques vésicules (semblent multilamellaires). Bien que cela prouve que le $\text{PGA}_{12}\text{-}b\text{-PDMS}_{39}\text{-}b\text{-PGA}_{12}$ permet de former des membranes, cette méthode n'est pas adaptée pour former des vésicules unilamellaires géantes en grande quantité et de manière reproductible.

3.3.1.2 Electroformation

Avant d'utiliser cette technique, qui favorise la formation de vésicules géantes unilamellaires (voir partie 1.2.3.1), la principale difficulté rencontrée pour tous les $\text{PGA}\text{-}b\text{-PDMS}\text{-}b\text{-PGA}$ a été leur solubilisation. En effet, les deux types de blocs de ces copolymères présentent des solubilités très différentes et il est difficile de trouver un solvant commun. Leur solubilisation est une étape obligatoire car ce procédé de formation nécessite une solution de copolymère comme point de départ pour former des films.

De nombreux solvants et mélanges de solvants ont été utilisés pour essayer de solubiliser ces copolymères : DMSO, THF, Butanone, Diméthylacétamide, Dioxane, Toluène, N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP), THF/MeOH (différentes proportions). Seul un mélange NMP / Ethanol / Chloroforme (3/1/1), la NMP permettant de solubiliser de nombreux polypeptides et le

chloroforme le PDMS, a permis de solubiliser les $\text{PGA}_{12}\text{-}b\text{-PDMS}_{39}\text{-}b\text{-PGA}_{12}$ et $\text{PGA}_9\text{-}b\text{-PDMS}_{39}\text{-}b\text{-PGA}_9$. Par conséquent, seuls ces deux copolymères ont pu être utilisés pour ces expériences.

Le montage expérimental utilisé a été développé au LIONS. Les électrodes utilisées, sur lesquelles les films de polymère sont déposés, sont deux lames de verre recouvertes d'une couche transparente et conductrice d'ITO (Indium Tin Oxide, $\text{In}_2\text{O}_3/\text{SnO}_2$). L'étanchéité de la cellule d'électroformation, qui permet d'éviter tous les problèmes d'évaporation de solvant quand la procédure d'électroformation est longue, est assurée par un joint en PDMS d'environ 1 mm d'épaisseur placé entre les deux électrodes. Ce même joint permet de créer la chambre d'électroformation. L'ensemble est maintenu en place sur un bâti qui s'adapte à la platine d'un microscope droit (figure 3.7.A), permettant ainsi l'observation de la croissance des vésicules pendant la procédure d'électroformation. Une fois la chambre d'électroformation scellée, la solution d'électroformation est injectée à l'intérieur à l'aide d'une seringue et d'une aiguille. Le générateur est connecté aux lames d'ITO à l'aide de pinces crocodiles (figure 3.7.B).

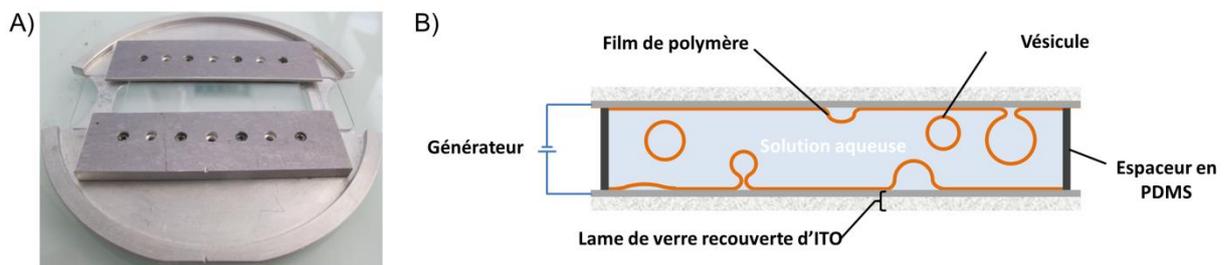


Figure 3.7. A) Montage expérimental permettant de faire l'électroformation. B) Schéma de principe d'une expérience d'électroformation.

Les films de copolymère sont préparés sur les faces ITO des électrodes avant de sceller la chambre d'électroformation. La technique la plus couramment utilisée est le Spin-coating afin d'obtenir un film le plus homogène possible.⁴⁹ Cependant, elle nécessite une quantité de solution relativement importante pour couvrir l'ensemble de la surface et les essais réalisés n'ont pas donné de bons résultats (uniquement quelques marques sur les lames). La méthode retenue pour faire les films de $\text{PGA}\text{-}b\text{-PDMS}\text{-}b\text{-PGA}$ est le dépôt de gouttes : 50 μL de solution sont déposés sur chaque lame et étalés en utilisant l'aiguille de la seringue. Le mélange de solvants contenant une majorité de NMP, très peu volatile (température d'ébullition de 202 – 204 °C), il faut ensuite laisser sécher pendant au moins 24 heures sous vide dynamique.



Figure 3.8. Films de $\text{PGA}_9\text{-}b\text{-PDMS}_{39}\text{-}b\text{-PGA}_9$ préparé par dépôt de gouttes et séchage sous vide dynamique pendant 24 heures.

Les films obtenus (figure 3.8) ne semblent pas avoir une épaisseur homogène mais après de nombreuses électroformations, il apparaît que cela facilite parfois la formation de vésicules. La cellule d'électroformation a été remplie avec une solution de soude à $\text{pH} = 11$ et le signal appliqué pour ces systèmes est, typiquement, un signal sinusoïdal d'amplitude 3 V et de fréquence 10 Hz (il ne faut pas dépasser 4 V sous peine de dégrader la couche d'ITO).

Pour les deux polymères solubilisés, on observe la présence de quelques vésicules après 24 heures d'électroformation. Elles apparaissent très souvent le long de rayures sur le film de polymère, confirmant que la présence de défauts facilite la formation (figure 3.9). Il n'y a pas de bénéfices à laisser l'électroformation se poursuivre plus longtemps, il y a toujours peu de vésicules après une journée supplémentaire.



Figure 3.9. Photographie (contraste de phase, grossissement x20) de vésicules de $\text{PGA}_{12}\text{-}b\text{-PDMS}_{39}\text{-}b\text{-PGA}_{12}$ après 24 heures d'électroformation.

L'obstacle rencontré a été de récupérer ces vésicules. En effet, il y en a très peu et elles semblent encore attachées au film de polymère pendant leur croissance. Bien que les précautions usuelles aient été prises pour faciliter leur détachement (appliquer un signal carré de faible fréquence pendant une demi-heure, faire circuler très doucement des petites bulles piégées dans la chambre d'électroformation le long des lames, récupérer la solution avec une aiguille aussi grosse que possible sur une petite seringue pour minimiser le cisaillement), il n'a pas été possible de retrouver des vésicules en solution suite à la récupération de la solution d'électroformation.

Les deux méthodes utilisées ont permis de prouver qu'une partie des $\text{PGA}\text{-}b\text{-PDMS}\text{-}b\text{-PGA}$ synthétisés permettent de former des vésicules géantes, mais se sont révélées inadaptées

pour les former sélectivement et en grande quantité. D'autres solutions existent, telle que la microfluidique, mais n'ont pas pu être explorées au cours de ce travail.

3.3.2 PEO-*b*-PDMS-*b*-PEO

Des vésicules de deux échelles de taille ont été formées avec ces copolymères. Le premier objectif était de former des vésicules géantes pour être en mesure de les observer en microscopie optique. Le second objectif était d'obtenir des vésicules à l'échelle nanométrique pour étudier l'influence de la taille sur leur comportement en conditions de choc osmotique.

3.3.2.1 Formation de vésicules géantes

La procédure d'électroformation a été retenue pour la formation de vésicules géantes afin de maximiser les chances d'obtenir des membranes unilamellaires.⁴⁶ La formation des films sur les lames d'ITO est une étape importante. Ils sont formés de la même manière que les films de PGA-*b*-PDMS-*b*-PGA (dépôt de gouttes), à partir d'une solution à 1mg/mL dans un mélange 80 % chloroforme / 20 % méthanol. Bien que cette méthode ait un caractère plus aléatoire concernant la qualité des films préparés, il n'a pas été possible de trouver des conditions de spin-coating qui, à terme, soient plus favorables à la formation de vésicules géantes. De plus, les défauts dans le film semblent faciliter leur apparition. La formation de vésicules est inhibée quand il n'y a pas de méthanol dans le mélange de solvants car les films obtenus sont de mauvaise qualité (démouillage de la solution sur les lames d'ITO).

Pour les électroformations dans les milieux aqueux sans espèces chargées (sucrose/glucose), l'apparition de vésicules se fait aux alentours d'une dizaine de minutes après le début de la formation (signal sinusoïdal, 10 Hz, 2 V pour le PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / 4 V pour le PEO₁₇-*b*-PDMS₃₉-*b*-PEO₁₇). Il n'y a des vésicules que sur certaines zones des lames d'ITO (inhomogénéité des films due à la méthode de préparation) et leur taille, qui augmente généralement pendant deux heures, peut aller jusqu'à 80 μm (figure 3.10).

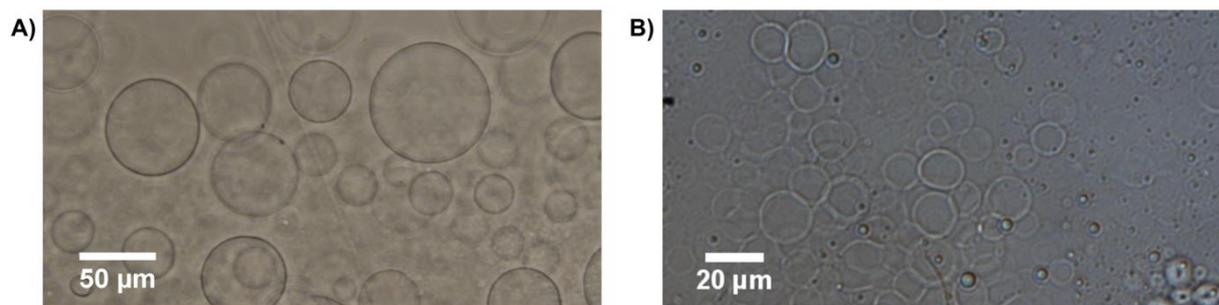


Figure 3.10. Electroformation dans une solution de glucose 0,1 M pour A) le PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ (contraste de phase) et B) le PEO₁₇-*b*-PDMS₃₉-*b*-PEO₁₇ (DIC).

Il est beaucoup plus difficile de former et récupérer des vésicules géantes avec le copolymère ayant le bloc hydrophobe le plus court. Il s'est avéré que c'est en réalité lié à sa fraction hydrophile f qui n'est pas bien adaptée à la formation de membranes. En revanche, les vésicules géantes de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ sont assez facilement récupérées.

L'électroformation en présence de sels, réputée plus difficile, a seulement nécessité des temps de formation plus longs (~17h – 20h) avec une amplitude du signal légèrement plus élevée (3V). Cependant, on trouve plus de vésicules multilamellaires dans ce type de milieu de formation (figure 3.11.B).

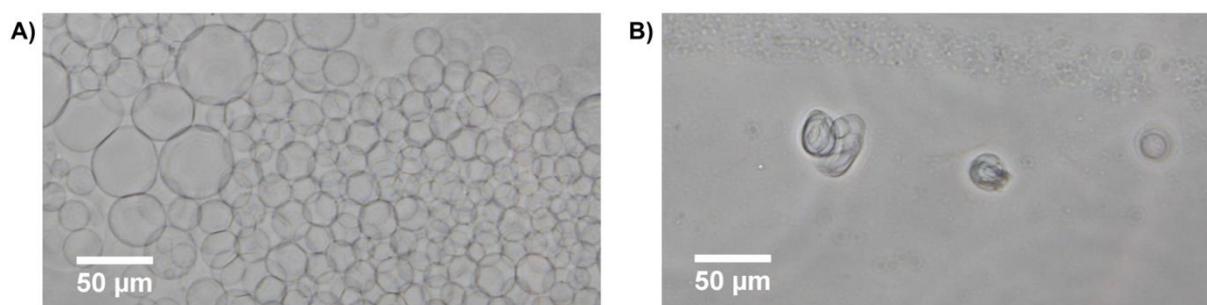


Figure 3.11. Electroformation de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ dans une solution de NaHCO₃ à 20 mM. Vésicules A) unilamellaires et B) multilamellaires détachées des lames d'ITO après 21h30 d'électroformation.

La formation à température élevée (45°C), avec des lipides dont la température de transition coopérative T_m est supérieure à T_{ambiante} , a elle aussi bien fonctionné pour ce copolymère.

3.3.2.2 Formation de vésicules nanométriques

Les essais de formation avec les méthodes de solubilisation directe, de réhydratation de film et de nanopréciipitation ont conduit à des objets d'une vingtaine de nanomètres de diamètre, vraisemblablement des micelles au vu de leur taille. Les vésicules nanométriques de PEO-*b*-PDMS-*b*-PEO ont pu être préparées *via* un procédé d'émulsion double - évaporation (figure 3.12).⁵¹ De manière concrète, ce protocole se décompose en trois étapes qui sont les suivantes :

- A) une émulsion W/O (eau dans huile), stabilisée par le copolymère tribloc, est préparée à l'aide d'une sonde à ultrason (20 μL de solution aqueuse dans 200 μL de solution de polymère à 46 mg/mL dans le chloroforme).
- B) cette émulsion, qui n'est pas stable, est immédiatement transférée dans un grand volume de solution aqueuse (900 μL, dans un Eppendorf).
- C) le mélange est remis sous ultrasons pour former une émulsion double (W/O)/W. Le volume total étant faible, sa température augmente rapidement. Cela permet au chloroforme de s'évaporer et entraîne l'apparition de structures vésiculaires (D).

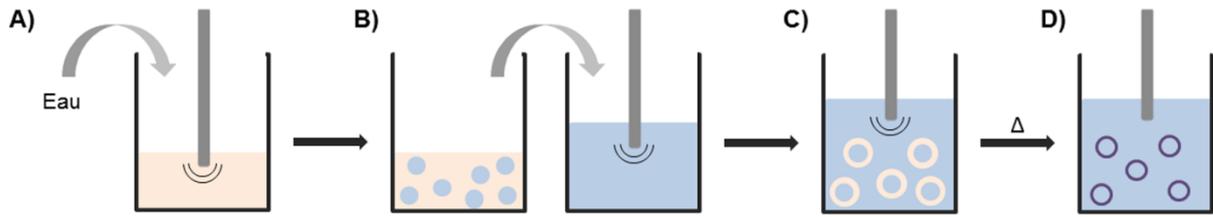


Figure 3.12. Représentation schématique de la méthode de double émulsion – évaporation : A) formation de l'émulsion directe et B) introduction de cette émulsion dans un volume d'eau pour C) former l'émulsion double. D) L'évaporation du chloroforme entraîne la formation de vésicules.

Les vésicules obtenues suite à ce procédé sont potentiellement multilamellaires. L'étape d'extrusion à travers deux membranes en polycarbonate dont la taille des pores est de 100 nm (19 passages) permet d'homogénéiser la taille des vésicules mais également de s'assurer qu'une grande majorité d'entre elles deviennent unilamellaires.²²⁴

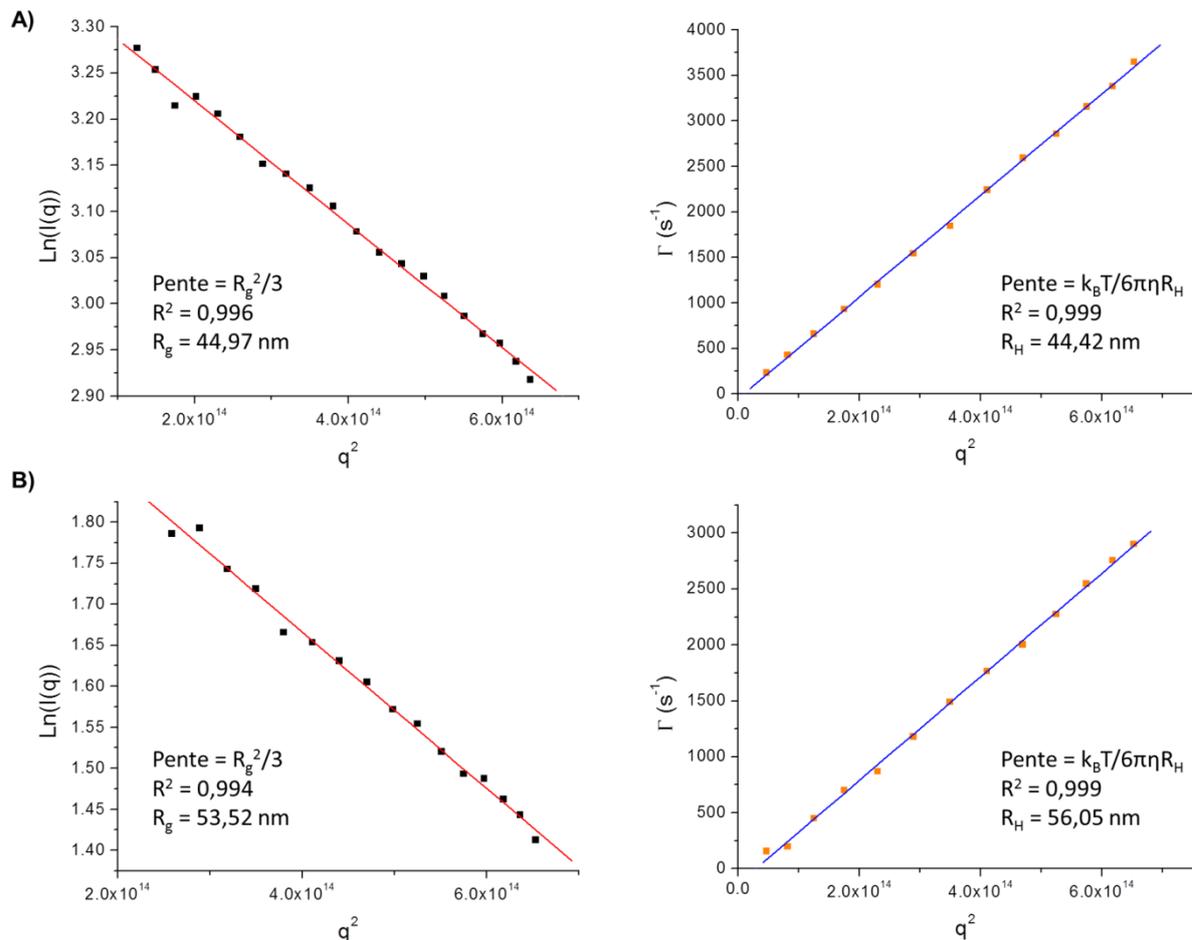


Figure 3.13. Analyse par diffusion de la lumière multi-angles des agrégats obtenus par émulsion double – évaporation et extrusion en utilisant A) le $\text{PEO}_{17}\text{-}b\text{-PDMS}_{39}\text{-}b\text{-PEO}_{17}$ et B) le $\text{PEO}_{17}\text{-}b\text{-PDMS}_{66}\text{-}b\text{-PEO}_{17}$. Les graphes de gauche sont les représentations de Guinier qui permettent de déterminer le rayon de giration R_g . Les graphes de droite représentent l'évolution du taux de décroissance en fonction du vecteur d'onde au carré, ce qui permet de calculer la valeur du rayon hydrodynamique R_H .

Les structures ainsi formées ont été caractérisées par diffusion statique et dynamique de la lumière afin d'avoir une première validation de leur morphologie : les mesures des rayons hydrodynamiques et de giration de ces objets permettent de calculer les rapports R_g/R_H (figure 3.13). Les valeurs obtenues sont proches de 1, ce qui est caractéristique de sphères creuses et suggère des morphologies vésiculaires.²²⁵

Une étude complémentaire par diffusion dynamique de la lumière a été menée sur les structures formées avec le $\text{PEO}_{17}\text{-}b\text{-PDMS}_{39}\text{-}b\text{-PEO}_{17}$ pour déterminer la stabilité des nano-vésicules dans le temps (figure 3.14). Il apparaît qu'à température ambiante ces objets ne sont pas stables, leur rayon hydrodynamique augmentant rapidement deux jours après l'extrusion. Il est possible de garder des tailles stables sur plus d'une semaine en les stockant au réfrigérateur, ce qui est suffisant pour mener diverses séries d'expériences sur ces nano-vésicules.

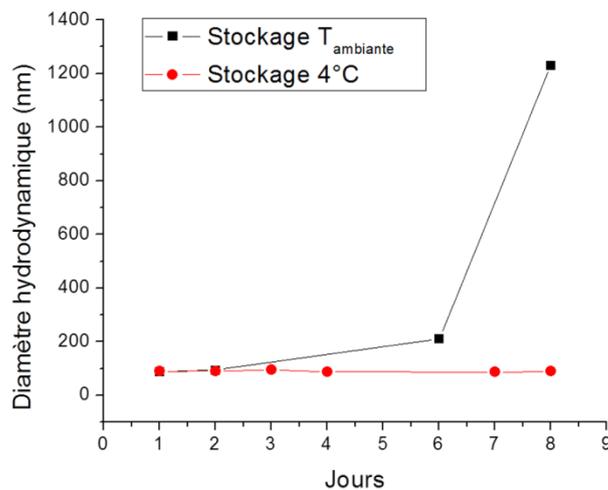


Figure 3.14. Stabilité des objets formés avec le $\text{PEO}_{17}\text{-}b\text{-PDMS}_{39}\text{-}b\text{-PEO}_{17}$ dans le temps.

3.3.3 Autres copolymères

Deux copolymères commerciaux ont également été utilisés au cours de ces travaux de thèse : le $\text{PDMS}_{22}\text{-}g\text{-PEO}_{12}$ (comportant statistiquement deux greffons de PEO) et le $\text{PBut}_{46}\text{-}b\text{-PEO}_{30}$. Le protocole d'électroformation utilisé pour la formation de vésicules géantes unilamellaires est le même que celui décrit pour le $\text{PEO}_{17}\text{-}b\text{-PDMS}_{66}\text{-}b\text{-PEO}_{17}$ et a permis d'avoir de nombreuses vésicules sur l'ensemble des lames d'ITO. Des vésicules nanométriques de $\text{PBut}_{46}\text{-}b\text{-PEO}_{30}$ ont été obtenues avec la technique d'émulsion double - évaporation décrite partie 3.3.2.2 et les vésicules de $\text{PDMS}_{22}\text{-}g\text{-PEO}_{12}$ se forment spontanément en mélangeant le copolymère avec une solution aqueuse sous agitation (2 heures à 250 tour/minute). Ces vésicules ont également été extrudées 19 fois à travers des membranes de 0,1 μm .

3.4 Conclusion

Les différents copolymères amphiphiles triblocs avec des polypeptides poly(acide-L-glutamique) comme composants hydrophiles ont été synthétisés avec succès. Les caractérisations, menées sur les intermédiaires PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG, confirment que les degrés de polymérisation visés ont été atteints. Bien que les rendements massiques des hydrolyses basiques soient faibles, les analyses en FTIR prouvent le succès de la déprotection des groupements benzyles.

La mise en œuvre de ces copolymères s'est avérée difficile. Seul deux d'entre eux ont pu être solubilisés dans un mélange NMP / Chloroforme / Ethanol (3/1/1), ce qui a permis de préparer des films pour tester le protocole d'électroformation. Des vésicules géantes en formation ont bien été observées, cependant il n'a pas été possible de les sortir indemnes de la cellule d'électroformation.

D'autres méthodes, telles que la microfluidique, devraient permettre de former des vésicules géantes unilamellaires en s'affranchissant des problèmes liés à leur récupération. En effet, la solution de formation est récupérée en continu en sortie de la puce dans laquelle les vésicules sont assemblées. Il n'a malheureusement pas été possible d'essayer cette méthode au cours de ces travaux.

Les synthèses des PEO-*b*-PDMS-*b*-PEO ont très bien marché. La méthode privilégiée pour former des vésicules géantes avec ce système est l'électroformation, les films ayant été préparés par dépôt de gouttes sur les électrodes d'ITO. Il s'est avéré difficile d'obtenir des vésicules géantes unilamellaires avec le copolymère dont la fraction hydrophile f est proche de 34 % (bloc hydrophobe de faible masse molaire). En revanche, cette technique donne de bons résultats avec le PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇, même en présence de sels dans la solution d'électroformation.

Des assemblages de taille nanométrique ont également été préparés en utilisant une méthode d'émulsion double – évaporation / extrusion. Les caractérisations par diffusion de la lumière multi-angles semblent indiquer que les objets en solution sont de morphologie vésiculaire.

Finalement, des vésicules géantes et nanométriques de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ et de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ ont été préparées. Les méthodes utilisées pour les copolymères triblocs de PEO-*b*-PDMS-*b*-PEO se sont avérées parfaitement efficaces pour former des assemblages supramoléculaires avec ces copolymères commerciaux.

3.5 Annexes

3.5.1 Synthèse des PGA-*b*-PDMS-*b*-PGA

3.5.1.1 Protocole de synthèse

La quantité de BLG-NCA utilisée par rapport à la quantité de macro-amorceur permet de contrôler la longueur finale des chaînes de PBLG. La polymérisation est faite dans du dichlorométhane cryo-distillé pour éviter au maximum les impuretés et toute la verrerie utilisée lors de la réaction est préalablement flammée et sous vide.

Préparation des macro-amorceurs par extraction liquide-liquide :

Mélanger une solution de H₂N-PDMS-NH₂ dans le cyclohexane (1mg/20mL) à un volume équivalent de solution d'hydrogencarbonate de sodium NaHCO₃ 0,1 M dans une bouteille Schott (bouchon PP) toute la nuit à 250 tr/min. Récupérer la phase organique, la sécher sur MgSO₄ puis la filtrer. Retirer autant de cyclohexane que possible à l'évaporateur rotatif puis sous vide. Transférer le macro-amorceur dans un ballon bicol (fermé par un bouchon rotaflo et un septum) et le lyophiliser pour retirer les dernières traces de solvant et d'eau.

Polymérisation des BLG-NCA par ouverture de cycle :

Mettre la quantité de monomère nécessaire dans un second ballon bicol, également fermé avec un bouchon rotaflo et un septum. Ajouter le CH₂Cl₂ dans les ballons contenant le macro-amorceur (6 mL pour 1g) et le monomère (20 mL pour 1,2g) après avoir mis la connexion sous vide et l'avoir flammée. Laisser sous agitation jusqu'à ce que tout soit solubilisé. Transférer la solution de BLG-NCA dans le ballon contenant l'amorceur à l'aide d'une canule (pousser gentiment avec de l'azote) puis remettre le ballon contenant le milieu réactionnel sous vide statique (retirer l'azote). Laisser sous agitation pendant 4 jours. Pour récupérer le copolymère formé, faire évaporer la majeure partie du solvant sous flux d'azote puis faire précipiter goutte à goutte la solution de copolymère concentrée dans du diéther froid (sous agitation). Récupérer et laver plusieurs fois le copolymère avec du diéther propre. Faire sécher sous vide dynamique à 40°C toute une nuit.

Déprotection des groupements benzyles par hydrolyse basique :

Solubiliser le copolymère dans du THF à 20 mg/mL (passer au bain à ultrasons). Ajouter de la potasse à 5M de manière à avoir 1,5 équivalent par groupement BLG et laisser sous agitation à température ambiante pour la nuit. Faire évaporer autant de THF que possible à l'évaporateur rotatif, ajouter un petit peu d'eau MilliQ puis acidifier le milieu jusqu'à pH = 3 en utilisant une

solution d'acide chlorhydrique à 0,1M. Laisser s'équilibrer pendant un quart d'heure environ avant de transférer dans un boudin de dialyse (MWCO 3500 Da). Après deux jours de dialyse, récupérer la solution et la lyophiliser pour enlever toute l'eau.

3.5.1.2 Caractérisation des copolymères PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG

Le degré de polymérisation DP des chaînes de PBLG a été calculé à partir de l'intégration des signaux de RMN ^1H en utilisant le bloc hydrophobe comme référence (figure 3.15). Les analyses ont été faites à 15 mg/mL dans deux solvants différents : le DMSO- d_6 qui est un bon solvant des blocs PBLG (mais pas du PDMS, il faut passer l'échantillon 30 min au bain à ultrason à 50°C juste avant l'analyse) et le chloroforme- d qui est un bon solvant du PDMS (mais pas du PBLG, normalement du TFA est ajouté pour désagréger l'hélice- α mais cela hydrolyse le PDMS).

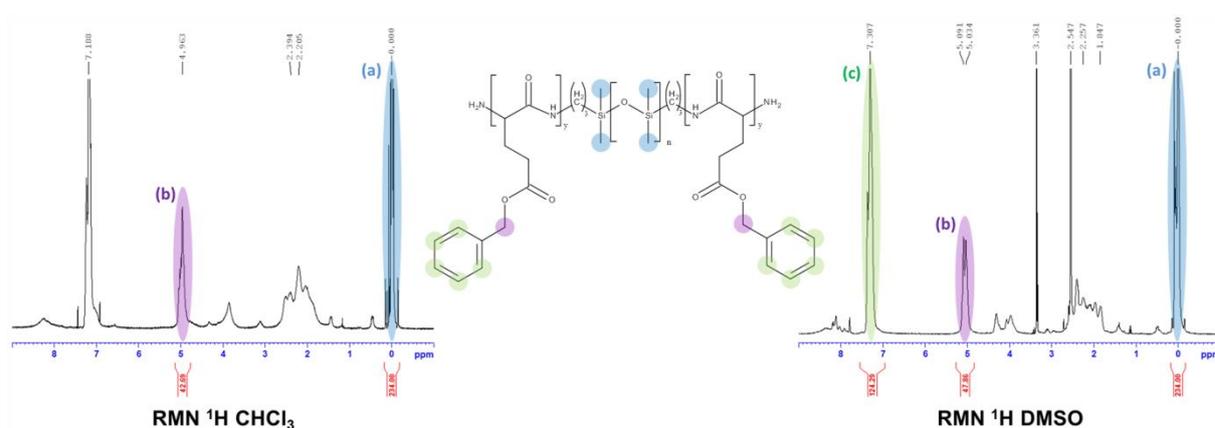


Figure 3.15. Spectres RMN ^1H du PBLG₁₂-*b*-PDMS₃₉-*b*-PBLG₁₂ dans le chloroforme- d et le DMSO- d_6 . Les signaux surlignés sont ceux dont l'intégration est utilisée pour calculer le degré de polymérisation du PBLG.

Le degré de polymérisation total est calculé à partir de l'intégration des signaux caractéristiques des groupements benzyles : $DP_{tot} = \left(\frac{H_{bCHCl_3}}{2} + \frac{H_{bDMSO}}{2} + \frac{H_{cDMSO}}{5} \right) / 3$ en ayant fixé $H_a = 6 DP_{PDMS}$. On ne peut pas utiliser le signal des groupements benzyles quand l'analyse est faite dans le chloroforme- d car il est confondu avec le signal du solvant.

Les analyses GPC ont été faites à 10 mg/mL dans le DMSO à chaud en utilisant du toluène comme flow marqueur. Les échantillons sont passés une demi-heure au bain à ultrasons à 50°C juste avant l'injection. Les distributions obtenues sont monomodales, il ne semble y avoir qu'une seule population (figure 3.16).

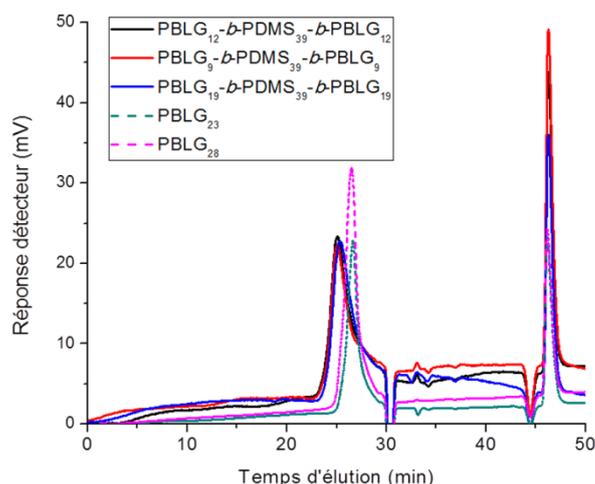


Figure 3.16. Courbes GPC (DMSO) obtenues pour trois copolymères PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG (lignes) ainsi que pour deux homopolymères PBLG (pointillés).

Le temps de rétention est le même pour les trois copolymères PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG car la gamme de séparation de la colonne n'est pas adaptée. Le même phénomène est observé pour des homo-PBLG, il n'y a pas de séparation entre les deux polymères.

La structure de copolymère à blocs a été confirmée par les analyses en DSC : on mesure les deux températures de transition vitreuse T_g caractéristiques de chaque bloc sur les thermogrammes (figure 3.17). De plus, on peut observer un pic endothermique à 84°C qui correspond à la transition d'une structure en hélice- α 7/2 à une hélice- α 18/5.²²⁶

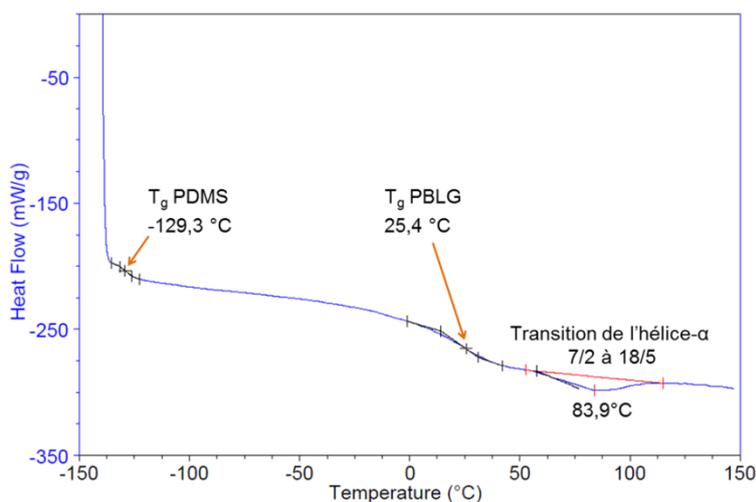


Figure 3.17. Thermogramme du PBLG₁₂-*b*-PDMS₃₉-*b*-PBLG₁₂ mesuré lors de la seconde chauffe.

3.5.1.3 Caractérisation des copolymères PGA-*b*-PDMS-*b*-PGA

L'efficacité de l'hydrolyse basique pour cliver les groupements benzyles a été vérifiée en suivant la disparition des bandes de transitions vibrationnelles des esters à 1731 cm^{-1} ($\nu \text{C=O}$)

et à 1163 cm^{-1} ($\nu\text{ C-O}$). On constate également l'apparition d'une bande carboxylate à 1405 cm^{-1} ($\nu\text{ COO}^-$) qui confirme le succès de la déprotection (figure 3.18).

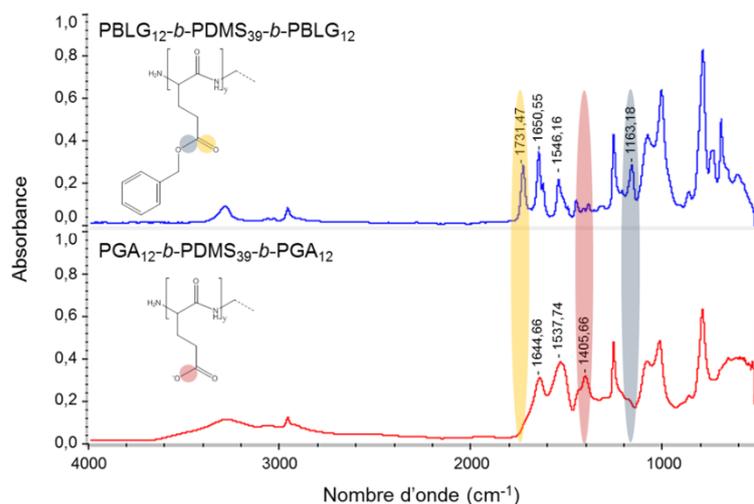


Figure 3.18. FTIR du $\text{PGA}_{12}\text{-}b\text{-PDMS}_{39}\text{-}b\text{-PGA}_{12}$ avant et après hydrolyse basique pour le clivage des groupements benzyles.

Cependant, il y a un épaulement sur les courbes de FTIR des copolymères préparés avec le bloc hydrophobe de 5000 g/mol (non montrées). Il reste probablement quelques groupements benzyles sur les chaînes de PGA.

3.5.2 Synthèse des $\text{PEO}\text{-}b\text{-PDMS}\text{-}b\text{-PEO}$

3.5.2.1 Protocole de synthèse

Préparer le ballon contenant le $\text{H}_2\text{N-PDMS-NH}_2$ comme décrit dans le protocole de synthèse des $\text{PGA}\text{-}b\text{-PDMS}\text{-}b\text{-PGA}$, excepté pour la concentration massique qui est ici 100 mg/mL . Mettre la quantité de PEO-NHS nécessaire (1,2 équivalent par fonction amine du PDMS diaminé) dans un second ballon bicol fermé par un bouchon rotaflo et un septum. Pour solubiliser les PEO-NHS, préparer une solution de DIPEA avec le CH_2Cl_2 cryo-distillé de façon à avoir 1 équivalent DIPEA pour chaque fonction amine du PDMS diaminé. Introduire la solution de DIPEA dans le ballon qui contient les PEO-NHS à l'aide d'une seringue et laisser sous agitation le temps que les réactifs soient solubilisés. Transférer la solution de PEO-NHS dans le ballon contenant le $\text{H}_2\text{N-PDMS-NH}_2$ à l'aide d'une canule ou d'une seringue (en fonction du volume). Laisser sous agitation 24 heures. Pour récupérer le copolymère formé, faire évaporer autant de solvant que possible sous flux d'azote puis ajouter de l'eau MilliQ dans le ballon. Une fois le polymère re-dispersé dans l'eau, transférer le contenu du ballon dans un boudin de dialyse (MWCO 50 kDa). Après deux jours de dialyse, récupérer la solution et la lyophiliser pour enlever toute l'eau.

3.5.2.2 Caractérisation des copolymères

Le succès du couplage entre les deux blocs a été vérifié par RMN ^1H (figure 3.19).

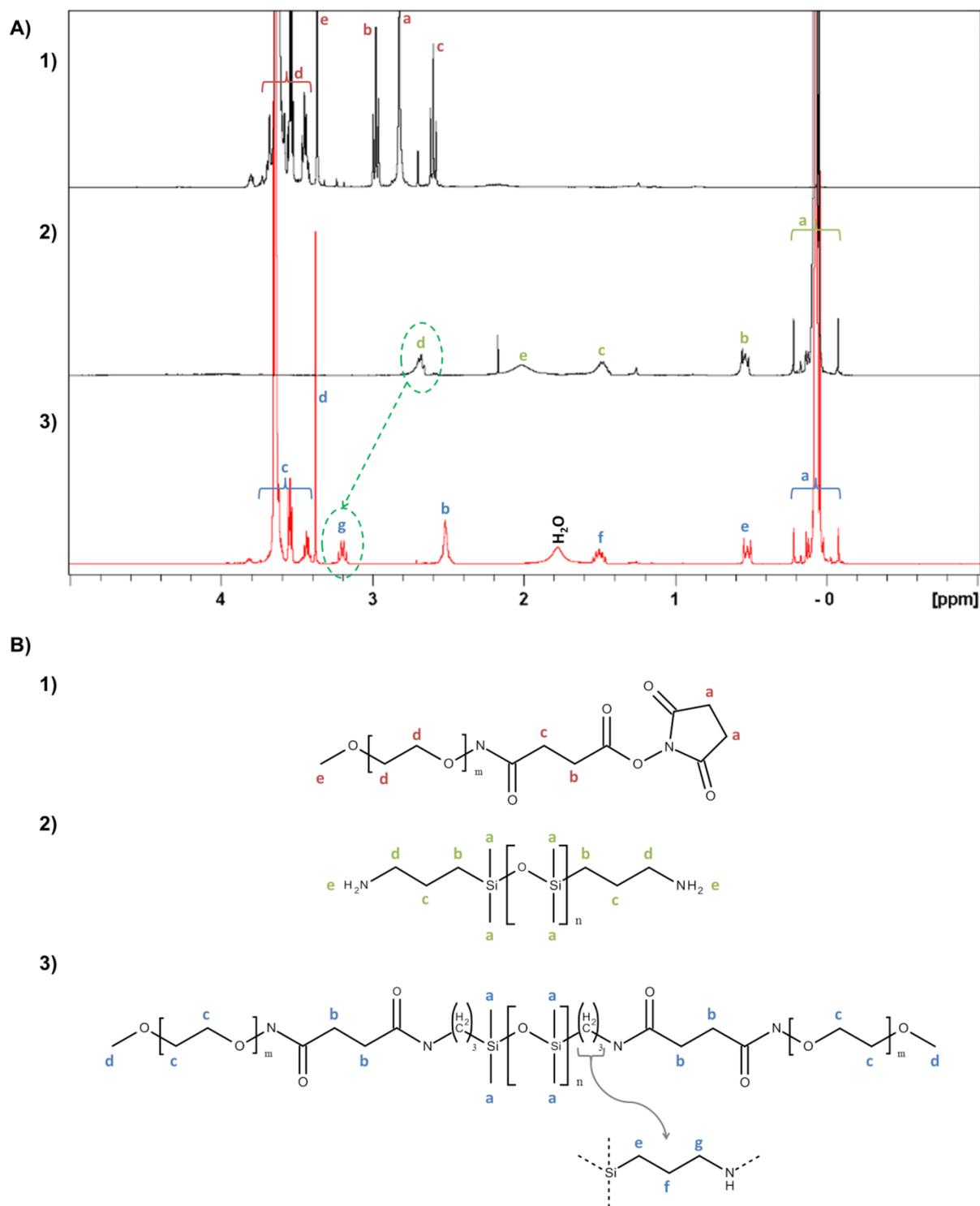


Figure 3.19. A) Spectres RMN ^1H du (1) PEO₁₇-NHS, (2) du H₂N-PDMS₃₉-NH₂ et (3) du PEO₁₇-*b*-PDMS₃₉-*b*-PEO₁₇ récupéré après dialyse. Les pointillés verts montrent la disparition du signal correspondant aux protons portés par le carbone en α des groupements amines et l'apparition d'un signal correspondant aux protons portés par le carbone en position α des groupements amides. B) Molécules correspondantes avec l'attribution des signaux observés sur les spectres RMN ^1H .

Le signal correspondant aux protons portés par les carbones en α des groupements amines a été décalé car les amines sont transformées en amides au cours de la réaction. Tous les groupements amines ont donc été consommés au cours de la réaction.

Les analyses par chromatographie d'exclusion stérique dans le THF prouvent qu'il ne reste pas de blocs PEO-NHS n'ayant pas réagi (figure 3.20), l'étape de dialyse a permis de les éliminer. L'indice de polymolécularité des copolymères synthétisés a été déterminé par cette technique.

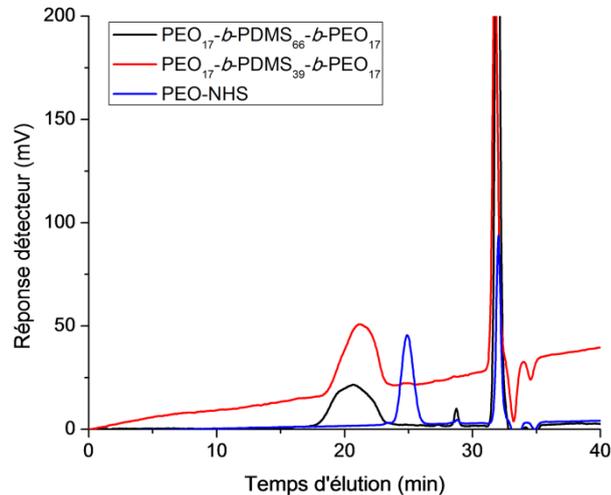


Figure 3.20. Courbes GPC (THF) obtenues pour les deux PEO-*b*-PDMS-*b*-PEO ainsi que pour le PEO-NHS.

Il n'a pas été possible d'obtenir le signal caractéristique des PDMS diamminés avant réaction car l'indice de réfraction du PDMS est très proche de celui du THF, on ne le détecte donc en sortie de colonne.

Chapitre 4 :
Modification de la perméabilité des
vésicules

4 Modification de la perméabilité des vésicules

Sommaire Chapitre 4

| | | |
|---------|--|-----|
| 4.1 | Formation de vésicules hybrides polymère / lipide | 126 |
| 4.1.1 | PEO ₁₇ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PEO ₁₇ / DPPC..... | 126 |
| 4.1.2 | PEO ₁₇ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PEO ₁₇ / POPC..... | 132 |
| 4.2 | Mesures du coefficient de perméabilité à l'eau | 135 |
| 4.2.1 | Principe de la mesure..... | 135 |
| 4.2.2 | Validation du protocole expérimental | 137 |
| 4.2.2.1 | Suivi temporel de l'évolution d'une vésicule..... | 137 |
| 4.2.2.2 | Détermination du coefficient de perméabilité à l'eau lors du gonflement | 140 |
| 4.2.2.3 | Détermination du coefficient de perméabilité à l'eau lors du retour à la taille initiale | 143 |
| 4.2.3 | Perméabilité à l'eau des vésicules hybrides | 144 |
| 4.2.3.1 | Vésicules de PEO ₁₇ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PEO ₁₇ | 144 |
| 4.2.3.2 | Vésicules hybrides 75% PEO ₁₇ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PEO ₁₇ / 25% DPPC | 146 |
| 4.2.3.3 | Vésicules hybrides PEO ₁₇ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PEO ₁₇ / POPC | 148 |
| 4.3 | Expérience de minéralisation..... | 150 |
| 4.3.1 | Précipitation intravésiculaire de CaCO ₃ | 150 |
| 4.3.2 | Perméabilité naturelle de la membrane aux espèces ioniques..... | 151 |
| 4.3.3 | Ajout d'ionophore <i>via</i> la solution d'ions calcium | 152 |
| 4.3.4 | Incorporation d'ionophore dans les membranes lors de la formation | 154 |
| 4.4 | Conclusion | 158 |
| 4.5 | Annexes | 159 |
| 4.5.1 | Hybrides PEO ₁₇ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PEO ₁₇ / DPPC..... | 159 |
| 4.5.2 | Hybrides PEO ₁₇ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PEO ₁₇ / POPC | 160 |
| 4.5.3 | Reconstruction volumique « 2D » vs. « 3D »..... | 161 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.5.4 | Forces élastiques | 162 |
| 4.5.5 | Calcul de la perméabilité avec les forces élastiques | 163 |
| 4.5.6 | Défauts de préparation des vésicules | 164 |
| 4.5.7 | Perméabilité aux espèces ioniques – expérience qualitative..... | 165 |
| 4.5.8 | Incorporation de calcimycine dans les membranes..... | 166 |

Le contrôle des propriétés des membranes vésiculaires est un domaine de recherche étendu, de nombreuses applications nécessitant à la fois une membrane mécaniquement résistante et des perméabilités élevées à des composés spécifiques. L'utilisation d'un bloc sensible à un stimulus externe (pH, température, lumière, conditions redox) permet de libérer le contenu encapsulé dans les vésicules en déstabilisant leurs membranes, mais conduit souvent à une perte de la morphologie.^{5, 25, 26} Différentes stratégies ont été développées pour conserver l'intégrité de la structure vésiculaire. Il est par exemple possible de créer des sites de fuite dans des membranes réticulées^{142, 143} ou de reconstituer des protéines transmembranaires, qui vont former des canaux, dans la membrane des vésicules.^{30, 146} Une alternative est la formulation de la membrane, qui peut être formée à partir de mélanges de plusieurs copolymères amphiphiles^{165, 166} ou de mélanges de copolymères amphiphiles et de lipides.^{170, 171, 179}

Les vésicules dont la membrane est formée par un mélange polymère / lipide sont souvent désignées comme étant des vésicules hybrides. De récents travaux ont mis en évidence deux structurations de la membrane des vésicules ainsi formées : homogène, *i.e.* avec une répartition statistique des constituants au sein de la membrane à l'échelle micrométrique,^{175, 180} et hétérogène, *i.e.* avec des domaines de taille micrométrique riches en un des composés.^{178, 179} Les deux topographies présentent des avantages distincts (voir partie 1.4.3.2) : les membranes homogènes ont des propriétés mécaniques intermédiaires à celles obtenues sur des vésicules préparées avec les composés purs,^{172, 174} et les hétérogènes offrent des zones distinctes dans la membrane pouvant avoir des propriétés différentes de la « matrice » qui compose la vésicule.^{171, 177}

Les paramètres qui déterminent la structuration de ces membranes ne sont pas clairement identifiés (voir partie 1.4.3.2). Chemin *et al.* ont en particulier étudié la formation de vésicules hybrides PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ / POPC ou DPPC et montré que la composition initiale du mélange autorise un certain contrôle sur la structure de la membrane.¹⁷⁹ Pour élucider l'influence de la masse molaire et / ou de l'architecture du copolymère, nous avons étudié la formation de vésicules hybrides à partir de mélanges polymère / lipide utilisant le PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇. En effet, ce copolymère tribloc est de même nature chimique que le PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ mais a une masse molaire plus élevée, ce qui conduit à des membranes plus épaisses, et une architecture moléculaire différente. De plus, la perméabilité à l'eau des assemblages obtenus a été mesurée afin de déterminer l'impact de l'inclusion de lipides dans les membranes polymères et de la structuration des membranes hybrides formées. En effet, il n'est pas établi que pour des membranes homogènes les coefficients de perméabilité à l'eau sont intermédiaires à ceux des

composés purs, comme cela est le cas pour les propriétés mécaniques, ou qu'ils sont limités par la perméabilité d'un des deux composants quand des membranes hétérogènes sont formées. Le coefficient de perméabilité à l'eau P_f est un paramètre important car il reflète la perméabilité de la membrane aux petites molécules polaires et traduit la capacité d'une vésicule à ajuster son volume interne en réponse à des changements d'osmolarité du milieu extérieur.

Finalement, l'imperméabilité native des membranes de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ aux espèces ioniques ainsi que la possibilité d'induire une perméabilité spécifique aux ions calcium a été étudiée à travers des expériences de minéralisation intravésiculaire. En effet, bien que Picker *et al.* aient prouvé au cours d'expériences similaires que la calcimycine permette de rendre les membranes de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ perméables aux ions calcium,⁴ son utilisation dans les systèmes de vésicules polymère est encore peu courante. Cette étude a donc à la fois permis de s'assurer que ce transporteur ionique reste efficace quand les membranes des vésicules sont plus épaisses et d'architecture mieux définie, et de déterminer si cela a une influence sur les processus de minéralisation intravésiculaire.

4.1 Formation de vésicules hybrides polymère / lipide

L'objectif est ici d'approfondir l'étude précédente menée par Chemin *et al.*¹⁷⁹ afin de mieux comprendre les paramètres moléculaires permettant de former des membranes stables, *i.e.* ne présentant pas de séparation de phase sur la durée des expériences, et de contrôler leur structure (répartition des composants), ce qui est particulièrement attrayant dans une optique avancée de modulation des propriétés de membrane. Par analogie avec l'étude de Chemin *et al.*, nous étudierons la formation de vésicules hybrides en utilisant du DPPC (T_m élevée) ou du POPC (T_m basse) comme composant lipidique.

4.1.1 PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / DPPC

Le DPPC est un lipide qui présente une température de transition coopérative, *i.e.* de transition d'une phase gel $L_{\beta'}$ vers une phase cristal-liquide désordonnée L_{α} (voir partie 1.3.2), supérieure à la température ambiante (T_m DPPC \sim 41,5°C). Former des vésicules géantes par électroformation avec les mélanges PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / DPPC nécessite donc de chauffer le système pour que les lipides soient en phase fluide. Pour cela, la cellule d'électroformation (composée des deux lames d'ITO séparées par un espaceur) est transférée dans une platine chauffante qui peut s'adapter à un microscope droit. La température de consigne de la platine chauffante est alors fixée à 48°C et une fois la température souhaitée atteinte le protocole d'électroformation appliqué est le même que celui décrit dans la partie

3.3.2. Avec cette méthode, il est possible d'observer l'électroformation en temps réel tout en chauffant le système.

Avant de préparer des vésicules hybrides ayant un double marquage de membrane, pour directement observer la structure des membranes formées, une expérience préliminaire a permis de s'assurer que le PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂-Fluorescéine s'insère bien dans les membranes de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ (figure 4.1).

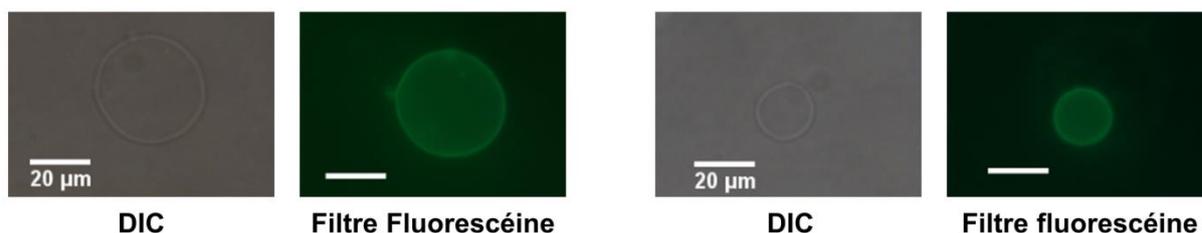


Figure 4.1. Marquage de membrane des vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ avec du PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂-Fluorescéine. L'observation est faite sur un microscope optique en transmission et en épifluorescence.

Les vésicules sont visibles en transmission et en épifluorescence avec un filtre « fluorescéine » (sensible au vert). Le PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂-Fluorescéine peut donc être utilisé comme marqueur de la phase polymère dans la membrane des vésicules hybrides.

Des compositions molaires de 25%, 50% et 75% en copolymère ont été sélectionnées pour les observations de vésicules hybrides en microscopie de fluorescence. Les deux fluorophores ajoutés à l'ensemble des mélanges utilisés pour la préparation des vésicules sont la Liss-Rhod PE, qui s'insère préférentiellement dans les phases lipidiques fluides et permet de visualiser les zones riches en DPPC, et le PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂-Fluorescéine. Les observations au microscope confocal et au microscope inversé en épifluorescence montrent des vésicules hybrides pour toutes les compositions, avec des membranes qui ont une répartition homogène des différents composants (figure 4.2 et annexe 4.5.1). Il semble également que pour la composition à 75% molaire de DPPC, la solution contienne un mélange de vésicules hybrides et de liposomes (annexe 4.5.1).

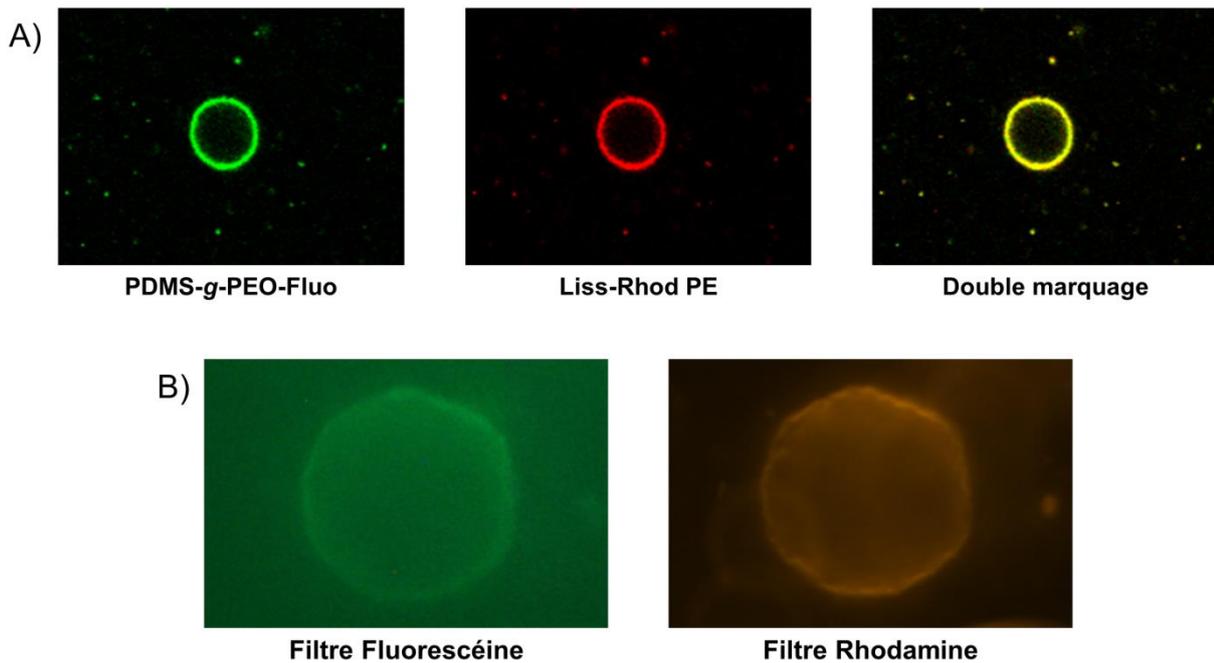


Figure 4.2. A) Images de microscopie confocale d'une vésicule hybride 75% PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / 25% DPPC avec un double marquage de membrane. B) Images de microscopie optique en épifluorescence d'une vésicule hybride 25% PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / 75% DPPC avec un double marquage de membrane. Le filtre « fluorescéine » est sensible au vert (PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂-Fluorescéine) et le filtre « rhodamine » est sensible au rouge (Liss-Rhod PE). Les observations ont été réalisées à température ambiante.

Bien qu'il ne soit pas possible de vérifier la composition chimique exacte des vésicules, différentes observations suggèrent que les membranes sont bien des mélanges de copolymère tribloc et de DPPC. En plus du double marquage, une indication de la présence de DPPC est que la formation conduit à de nombreuses vésicules géantes sur l'ensemble des lames d'ITO, ce qui n'est pas le cas quand seul le PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ est utilisé. Aussi, on observe des vésicules d'aspect froissé / facetté quand le DPPC est le composé majoritaire (figure 4.2.B), ce qui est caractéristique des liposomes de DPPC en dessous de la $T_{m\text{DPPC}}$.²²⁷ En effet, au-dessus de leur température de transition coopérative, ces lipides sont en phase cristal-liquide désordonnée L_{α} et les vésicules obtenues sont lisses et sphériques. En passant sous la $T_{m\text{DPPC}}$, on observe une transition vers une phase gel L_{β} , qui entraîne la nucléation d'une microstructure complexe de la membrane avec des défauts, et donc des zones de courbure non uniforme. Il en résulte un aspect froissé / facetté, qui a été observé sur des liposomes géants²²⁷ et également nanométriques.^{228, 229}

La présence de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ dans les membranes se traduit par la perte de cette forme froissée / facettée pour les compositions molaires de 50% et 75% en copolymère (seul des vésicules sphériques ont été observées). Il n'est pas non plus possible que seul le PDMS₂₂-

g-PEO₁₂-Fluorescéine s'insère dans les membranes car les formes sphériques sont obtenues dans les mêmes conditions sans utiliser le marqueur de la phase polymère (lors des expériences de choc osmotique).

Pour caractériser plus précisément la formation des membranes hybrides, des compositions allant de 0% à 80% molaire en copolymère (par pas de 10%) ont été étudiées en calorimétrie différentielle à balayage (figure 4.3).

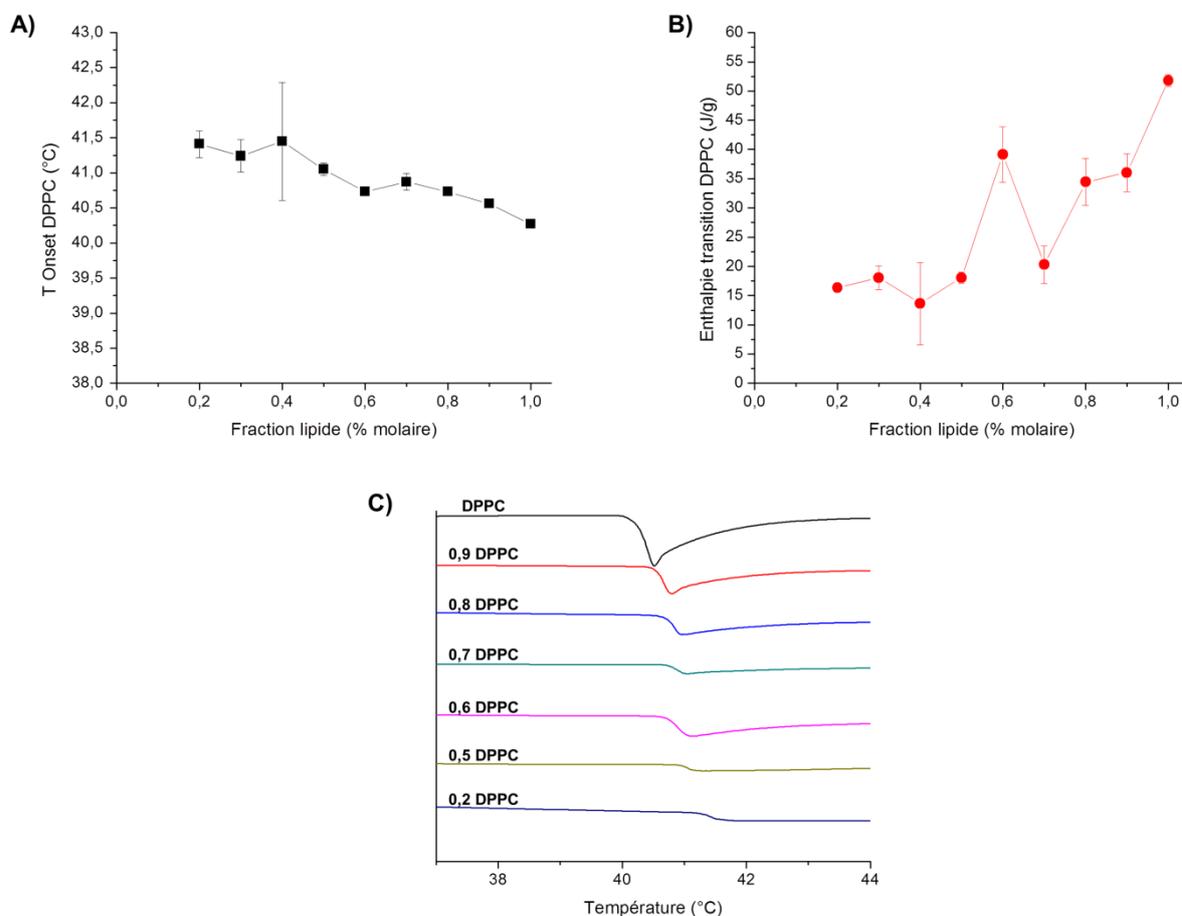


Figure 4.3. Résultats des analyses par calorimétrie différentielle à balayage des différentes compositions PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / DPPC. A) Température du début de transition ($^{\circ}\text{C}$) en fonction de la composition du mélange. B) Enthalpie de transition (J/g) associée au changement de phase. C) Thermogrammes obtenus pour les suspensions vésiculaires.

La température de transition coopérative indiquée pour le DPPC pur (figure 4.3.A) est de 40,5 $^{\circ}\text{C}$ et non 41,5 $^{\circ}\text{C}$ car la température relevée est ici la température du début de la transition et non celle du maximum du pic endothermique. Aussi, les thermogrammes présentés en figure 4.3.C ont été superposés manuellement en ajustant l'axe vertical (qui représente normalement le HeatFlow en mW/g) pour clarifier la représentation.

La courbe présentée en figure 4.3.A montre une augmentation de la température de transition coopérative T_m des lipides quand la fraction molaire en copolymère augmente. Dans

le même temps, la diminution de l'enthalpie associée à cette transition ainsi que l'élargissement du pic de transition indique une diminution de l'interaction coopérative entre les lipides,²³⁰ probablement due à une séparation progressive des domaines de DPPC en phase gel par les chaînes de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇.

Discussion.

Des modifications complexes des phénomènes de fusion des phases gel pour des phospholipides à chaîne saturée en présence de cholestérol ont été observées et étudiées de manière systématique.⁷⁵ Il a notamment été rapporté que le pic de transition observée en DSC pouvait être déconvolué en deux parties : un pic étroit dont la température de transition et la coopérativité diminue avec l'ajout de cholestérol, et ce quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée du lipide, et un pic large à des températures légèrement supérieures. La température de transition associée à ce deuxième pic augmente avec la quantité de cholestérol ajoutée dans le mélange quand la chaîne aliphatique des lipides contient moins de 17 carbones, et diminue pour les lipides dont la partie hydrophobe est plus longue.

Les études menées par ces auteurs ainsi que d'autres résultats sur les mélanges DPPC / Cholestérol obtenus par Vist *et al.*⁷⁸ en DSC et RMN montrent que le pic large correspondrait au passage d'une phase cristal-liquide ordonnée L_o à une phase cristal-liquide désordonnée L_α . C'est la différence d'épaisseur entre le cholestérol et les lipides qui expliquerait l'apparition de la phase L_o , car l'introduction de composés orientés perpendiculairement au plan de la bicouche et ayant une autre longueur hydrophobe affecte la stabilité de la phase gel en fonction de l'écart de taille avec les chaînes carbonées des lipides. En particulier, l'introduction de composés dont la taille hydrophobe est supérieure à l'épaisseur de la bicouche lipidique devrait stabiliser la phase gel du lipide hôte, qui est plus épaisse que la phase cristal-liquide désordonnée L_α , sous forme de phase cristal-liquide ordonnée L_o et ainsi augmenter la température associée à la transition de la phase L_o vers la phase L_α .

Dans notre cas, dès l'ajout de copolymère, le pic de transition s'élargit et voit sa température augmenter ; cependant il n'est pas possible de le déconvoluer en deux parties distinctes par analogie avec la littérature. Dans la mesure où aucune augmentation de la température n'a été observée pour les mélanges utilisant le PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂,¹⁷⁹ qui forme des membranes d'épaisseur similaire aux bicouches liposomales, on peut être tenté de faire une analogie avec les études citées précédemment. La phase gel du DPPC pourrait être stabilisée par la présence de grandes chaînes hydrophobes de PDMS ($M_w = 5000$ g/mol) et ainsi former une phase L_o , dont la proportion augmente avec la quantité de copolymère introduite dans le

mélange. Les caractéristiques d'une telle phase étant entre autres une mobilité latérale comparable à celle des lipides en phase cristal-liquide L_α ,⁷⁵ cela est cohérent avec la disparition de l'aspect froissé pour les fractions molaires en copolymère élevées, comme cela a déjà été rapporté pour l'ajout de cholestérol dans des membranes lipidiques en phase gel L_β ,^{231, 232}

Il est possible que ces membranes hybrides présentent des hétérogénéités à l'échelle nanométrique, car les analyses en DSC révèlent une transition de domaines lipidiques mais les observations en microscopie optique montrent des membranes homogènes à l'échelle micrométrique, avec une densité de DPPC en phase L_β et L_o qui fluctue le long de la membrane (formation de « nano-domaines »). Bien que la phase L_o présente une fluidité élevée en comparaison de la phase gel, aucune séparation de phase à l'échelle microscopique n'a été observée sur la durée des observations. Il est possible que la mobilité latérale dans la membrane soit réduite par rapport à une phase L_o obtenue avec un mélange ternaire de lipides, où une séparation de phase se produit,²³³ à cause de la phase riche en copolymère qui a une fluidité bien plus faible,⁶ limitant la diffusion latérale des lipides.

En plus des différences observées en DSC, ces résultats s'écartent de ceux obtenus par Chemin *et al.* montrant la formation de membranes hétérogènes qui présentent des domaines micrométriques riches en polymère quand le DPPC est le composant majoritaire et des domaines riches en DPPC quand le composant majoritaire est le PDMS_{22-g}-PEO₁₂.¹⁷⁹ En revanche, des membranes hybrides d'aspect homogène ont été obtenues par Ruyschaert *et al.* en utilisant du PMOXA-*b*-PDMS-*b*-PMOXA (M_w PDMS = 5400, $d \sim 10$ nm), dont la masse molaire hydrophobe est très proche de celle du PEO_{17-b}-PDMS_{66-b}-PEO₁₇.¹⁷⁰ Ils n'ont cependant pas observé de variation de la T_m du DPPC par DSC en fonction de la fraction molaire en copolymère dans le mélange.

L'épaisseur des membranes formées par les copolymères semble être un facteur important pour la formation de domaines microscopiques. La différence de taille hydrophobe n'est pas le seul paramètre car la séparation de phase, qui permet la formation de domaines, semble être directement liée à la mobilité latérale des composants de la membrane et donc à leur masse molaire.⁶⁹ Seul le PDMS_{22-g}-PEO₁₂, qui forme des membranes fluides, conduit spontanément à la formation de domaines microscopiques dans les membranes hybrides pour une large gamme de compositions. Les copolymères ayant un bloc hydrophobe de masse molaire plus élevée, donc moins mobiles, conduisent à des membranes qui semblent homogènes. L'architecture du copolymère joue probablement elle aussi un rôle, cependant la

différence de mobilité latérale entre les composants d'une monocouche et les composants d'une bicouche n'est pas clairement établie.

4.1.2 PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / POPC

La formation de membranes hybrides en utilisant le POPC, qui est un lipide fluide à température ambiante ($T_m \sim -4$ °C), à la place du DPPC permet de mettre en évidence l'influence de la fluidité intrinsèque de la phase lipidique sur les membranes hybrides polymère / lipide. En effet, l'étude menée dans notre équipe sur les membranes hybrides avec le PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ a démontré que cette fluidité impacte à la fois la structure mais également la stabilité des vésicules hybrides.¹⁷⁹

La température de transition coopérative T_m POPC de ce lipide est inférieure à la température ambiante, il n'a donc pas été nécessaire d'utiliser la platine chauffante lors de l'électroformation. Comme pour les formations utilisant le DPPC, de nombreuses vésicules géantes ont été obtenues comparativement aux formations avec le PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ seul, ce qui incite à penser que les lipides se sont correctement insérés dans la membrane.

Dans l'optique de faire des mesures du coefficient de perméabilité à l'eau, il est nécessaire de former des vésicules stables sur la durée des expériences, *i.e.* ne montrant pas de séparation de phase en quelques jours. En se basant sur les résultats rapportés pour les mélanges PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ / POPC, qui montrent des vésicules stables ayant une membrane homogène pour une fraction molaire en copolymère supérieure ou égale à 60%, les fractions molaires en PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ retenues pour les observations en microscopie optique sont 50%, 60% et 75%. Les fluorophores utilisés pour le marquage des phases lipidiques et polymères sont respectivement la Liss-Rhos PE et le PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂-Fluorescéine.

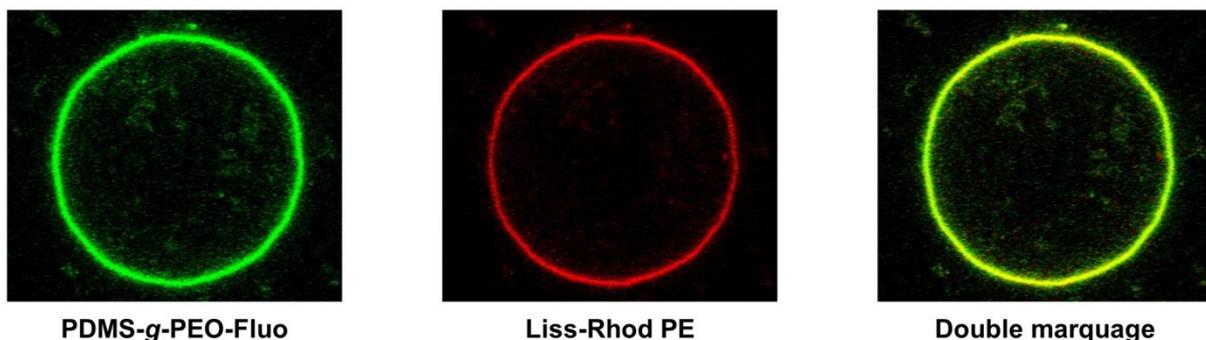


Figure 4.4. Images de microscopie confocale des vésicules hybrides 50% PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / 50% POPC avec un double marquage de membrane.

Les différentes observations réalisées au microscope confocal sur les compositions sélectionnées montrent la formation de vésicules hybrides présentant une répartition homogène

des composés dans la membrane (figure 4.4 et annexe 4.5.2). Ces résultats sont en bon accord avec ce qui avait été obtenu en utilisant le PDMS_{22-g}-PEO₁₂ comme copolymère.¹⁷⁹ En revanche, des membranes hétérogènes avaient été formées pour une quantité équimolaire de PDMS_{22-g}-PEO₁₂ / POPC et une séparation de phase progressive conduisait à un mélange de liposomes et de polymersomes en quelques heures. La stabilité des vésicules hybrides obtenues avec le PEO_{17-b}-PDMS_{66-b}-PEO₁₇ pour cette composition semble indiquer que les lipides sont dispersés dans une matrice de copolymère tribloc de mobilité réduite, limitant ainsi la séparation de phase.

La caractérisation des membranes hybrides PEO_{17-b}-PDMS_{66-b}-PEO₁₇ / POPC a été poursuivie par des mesures en calorimétrie différentielle à balayage (figure 4.5). La composition a été variée par pas de 10% molaire et les températures relevées correspondent au début de la transition coopérative du POPC.

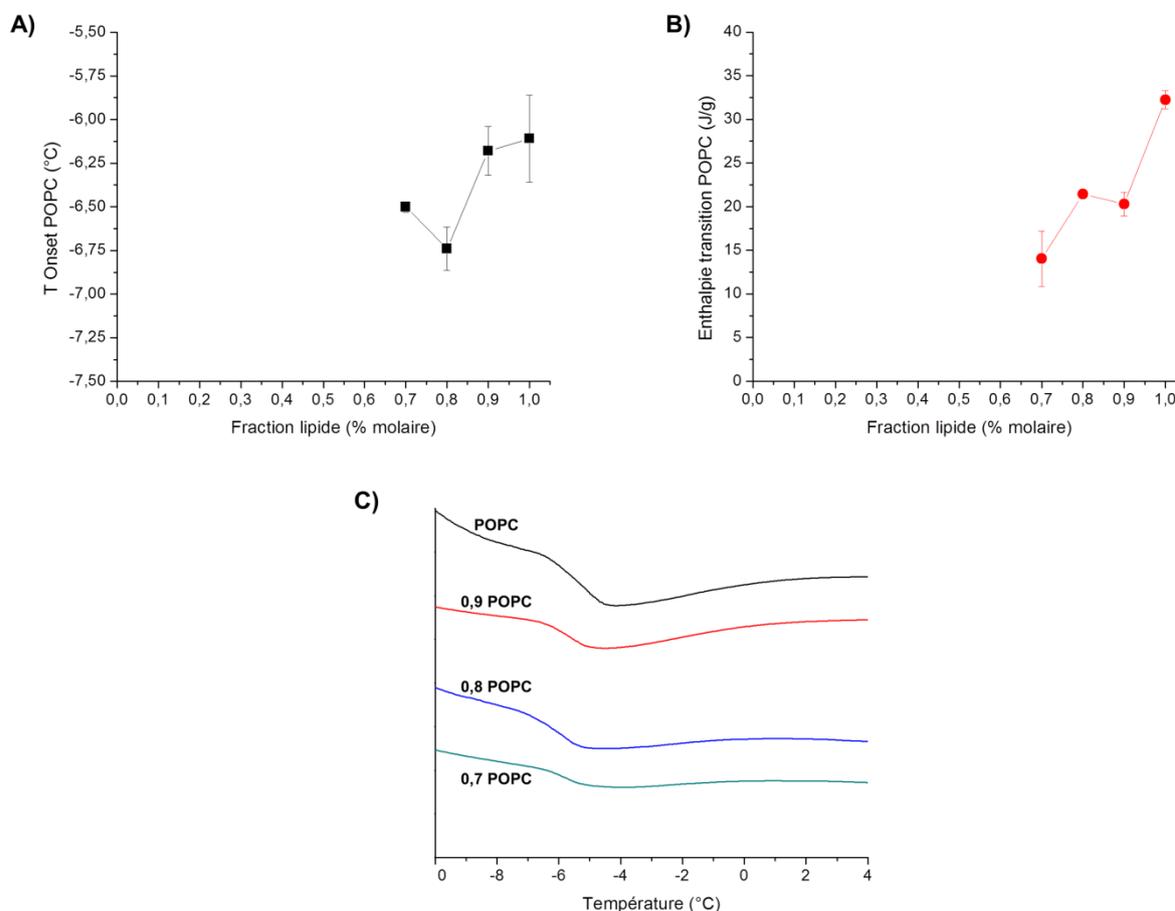


Figure 4.5. Résultats des analyses par calorimétrie différentielle à balayage des différentes compositions PEO_{17-b}-PDMS_{66-b}-PEO₁₇ / POPC. A) Température du début de transition (°C) en fonction de la composition du mélange. B) Enthalpie de transition (J/g) associée au changement de phase. C) Thermogrammes obtenus pour les suspensions vésiculaires.

Le signal correspondant à la transition de phase des lipides n'est observé que pour les faibles fractions molaires en PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇. Dès l'ajout de 10% de copolymère, on observe simultanément une légère diminution de la température de transition coopérative T_m POPC et de l'enthalpie qui y est associée. Ces diminutions indiquent une saturation progressive de la phase lipidique par le copolymère. Une fois une composition de 40% molaire en copolymère atteinte, les chaînes de copolymère saturant la phase lipidique et on bascule dans un régime où la phase majoritaire est une matrice polymère. Les chaînes de POPC sont solubles et dispersées dans cette matrice, elles ne peuvent alors plus ségréger en une phase riche en lipide qui transiterait d'une phase cristal-liquide désordonnée L_α à une phase gel lors du refroidissement. Cela semble confirmer que la mobilité réduite de la phase riche en copolymère empêche la séparation de phase, au moins sur des échelles de temps similaires à celles des expériences menées (un à deux jours).

Discussion.

La composition en copolymère pour laquelle on n'observe plus de transition de la phase lipidique est plus faible que celle relevée pour le PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ (70% molaire en copolymère).¹⁷⁹ Cela peut être dû à la différence d'épaisseur des membranes formées par les copolymères. En effet, il est plus défavorable énergétiquement de former des domaines, même à l'échelle nanométrique, avec le copolymère tribloc car la tension de ligne autour de ces domaines serait plus élevée que pour le PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ à cause de la plus grande différence d'épaisseur hydrophobe.

Ces résultats sont en accord avec les expériences de microscopie optique au cours desquelles des membranes hybrides stables et homogènes ont été observées pour des compositions molaires à partir de 50% en copolymère. En effet, la disparition de la transition coopérative du POPC indique que l'on est déjà dans un régime où les lipides sont complètement dispersés dans une matrice de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇.

Plusieurs références font état de la formation de vésicules hybrides utilisant le POPC comme composant lipidique. Nam *et al.* ont formé un mélange de vésicules hybrides homogènes stables et de liposomes quand le POPC est le principal constituant du mélange et seulement des vésicules hybrides homogènes stables quand le PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ est le composé majoritaire.¹⁷² En revanche, les compositions intermédiaires n'ont pas permis de former des vésicules géantes. Ce résultat est expliqué selon les auteurs par la différence d'épaisseur de membrane entre les phases lipidiques et polymères, ce qui semble confirmer les observations de Lim *et al.* qui ont formé des vésicules géantes stables pour un mélange équimolaire en utilisant un copolymère de

masse molaire plus faible (PBut₂₂-*b*-PEO₁₃).¹⁷⁵ Seul le couple PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ / POPC conduit à la formation de systèmes qui présentent une séparation de phase s'étalant sur quelques heures : pour des fractions molaires majoritaires en POPC, une séparation de phase conduit à des vésicules biphasiques puis un mélange de polymersomes et liposomes distincts.

L'épaisseur des membranes formées par les composants polymères des mélanges semble être un facteur crucial tant pour la formation d'hybrides que pour la formation de domaines. Les études sur les hybrides PBut-*b*-PEO / lipide semblent indiquer qu'une trop grande incompatibilité de taille hydrophobe inhibe la formation de vésicules hybrides. De plus, la différence de mobilité latérale entre un copolymère amphiphile conduisant à des membranes épaisses et une bicouche lipidique fluide, mise en évidence par les hybrides utilisant le PDMS comme bloc hydrophobe du copolymère, semble empêcher la séparation de phase nécessaire à la formation de domaines. Dans le cas présent, le PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ ne semble pas avoir une mobilité latérale suffisante pour autoriser spontanément la formation de domaines à l'échelle micrométrique, et ce quelle que soit la fluidité de la phase lipidique (L_{β} , L_o et L_{α}).

4.2 Mesures du coefficient de perméabilité à l'eau

L'ensemble des vésicules hybrides polymère / lipide préparées présentent des membranes stables avec une répartition qui semble homogène à l'échelle microscopique quand le copolymère est le composant majoritaire. La mesure des coefficients de perméabilité à l'eau de ces structures va permettre de déterminer quelle est l'influence des inclusions de lipides, de faible masse molaire, dans une membrane plus épaisse formée par une matrice de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇. Ces membranes ayant été obtenues pour deux natures de lipides, fluide et en phase gel à température ambiante, il va également être possible de déterminer si ce paramètre joue un rôle sur la perméabilité des membranes hybrides pour cette gamme de compositions.

4.2.1 Principe de la mesure

Les mesures du coefficient de perméabilité à l'eau P_f sont réalisées en suivant l'évolution temporelle du volume de vésicules soumises à des chocs osmotiques contrôlés. En effet, quand celles-ci sont soumises à un déséquilibre osmotique, elles ajustent leur volume interne pour retourner en conditions d'équilibre car l'énergie osmotique qui s'applique sur leur surface est prépondérante par rapport à leur énergie de courbure.⁸² Il existe alors différentes méthodes pour calculer la valeur du coefficient de perméabilité à l'eau à partir des courbes représentant l'évolution temporelle du rayon ou du volume des vésicules (voir partie 1.3.4).

Pour mener ces expériences, des pièges microfluidiques développés au LIONS ont été utilisés.¹⁹² Ils permettent de piéger des vésicules sous flux hydrodynamique et de changer la phase externe tout en faisant une observation au microscope confocal (voir partie 2.3.1.3). Une source d'erreur inhérente à cette technique provient de la résolution optique de l'objectif qui sert à faire les observations. La résolution dans le plan x-y de l'objectif à immersion d'huile utilisé au cours de ces travaux (grossissement $\times 60$ et $NA = 1,42$) est de $0,176 \mu\text{m}$, ce qui signifie que pour une vésicule, un changement de diamètre minimal de $0,176 \mu\text{m}$ peut être détecté. Par conséquent, l'erreur sur le volume calculé pour une vésicule est d'autant plus petite que la taille de celle-ci est grande (figure 4.6).

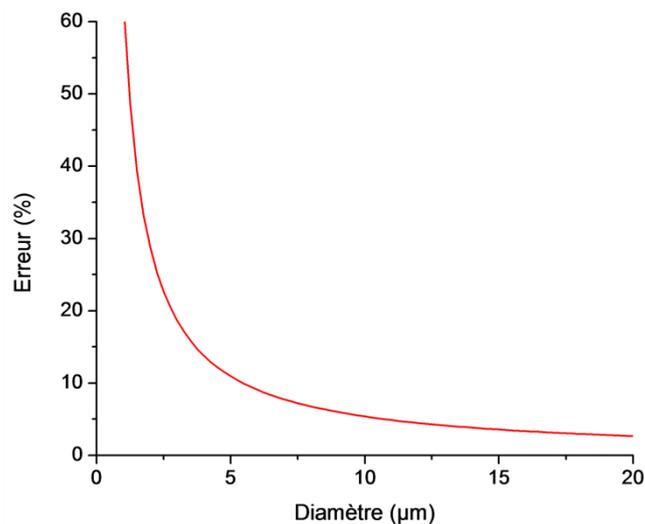


Figure 4.6. Représentation de l'erreur calculée sur le volume d'une vésicule en fonction de son diamètre mesuré. Le volume est calculé en utilisant la relation $V = (4/3)\pi R^3$, ce qui suppose que la vésicule est sphérique.

Il est donc à priori préférable de faire les observations sur les plus grandes vésicules bloquées dans les pièges hydrodynamiques afin de minimiser cette source d'erreur. Il faut cependant prendre en compte qu'un plus grand rayon signifie un plus gros volume, et donc un temps d'acquisition 3D au microscope confocal plus long. Un bon compromis semble être, si c'est possible, de sélectionner des vésicules dont le diamètre varie entre $11 \mu\text{m}$ et $15 \mu\text{m}$ car ce sont les plus petits diamètres correspondants à une erreur sur le volume inférieure à 5%.

4.2.2 Validation du protocole expérimental

Les premières mesures sont réalisées sur un copolymère commercial dont le coefficient de perméabilité à l'eau est connu, le PBut₄₆-*b*-PEO₃₀, afin de valider la procédure expérimentale utilisée.^{21, 36}

4.2.2.1 Suivi temporel de l'évolution d'une vésicule

Les vésicules ont été préparées par électroformation en utilisant la procédure décrite dans la partie 3.3.2. Un fluorophore non perméable à la membrane (Alexa Fluor 488 Dextran) est ajouté à la solution d'électroformation, et une dilution de la solution de vésicules récupérée par une solution iso-osmolaire ne contenant pas de fluorophore est faite avant l'injection dans les pièges microfluidiques. Cela permet de créer un contraste en fluorophore entre les milieux intra- et extravésiculaires afin de visualiser les vésicules en fluorescence.

Au cours de cette expérience, nous allons essayer de déterminer le coefficient de perméabilité à l'eau P_f en appliquant des chocs hypotoniques et hypertoniques successifs sur une même vésicule. Une vésicule de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ encapsulant une solution de sucrose à 100 mM est bloquée dans un piège hydrodynamique puis exposée à une solution hypotonique à 75 mM de sucrose. Cela entraîne l'absorption d'eau par la vésicule et donc son gonflement jusqu'à une taille d'équilibre. La solution de formation des vésicules, qui contient 100 mM de sucrose ainsi que du fluorophore, est ensuite réinjectée afin de faire retourner la vésicule à sa taille initiale. Finalement, la solution extravésiculaire est remplacée par une solution hypertonique à 125 mM. L'osmolarité de toutes les solutions utilisées a été mesurée avec un osmomètre. Les empilements enregistrés pour suivre l'évolution temporelle du volume (figure 4.7) ont été traités selon la procédure décrite partie 2.3.3.4.

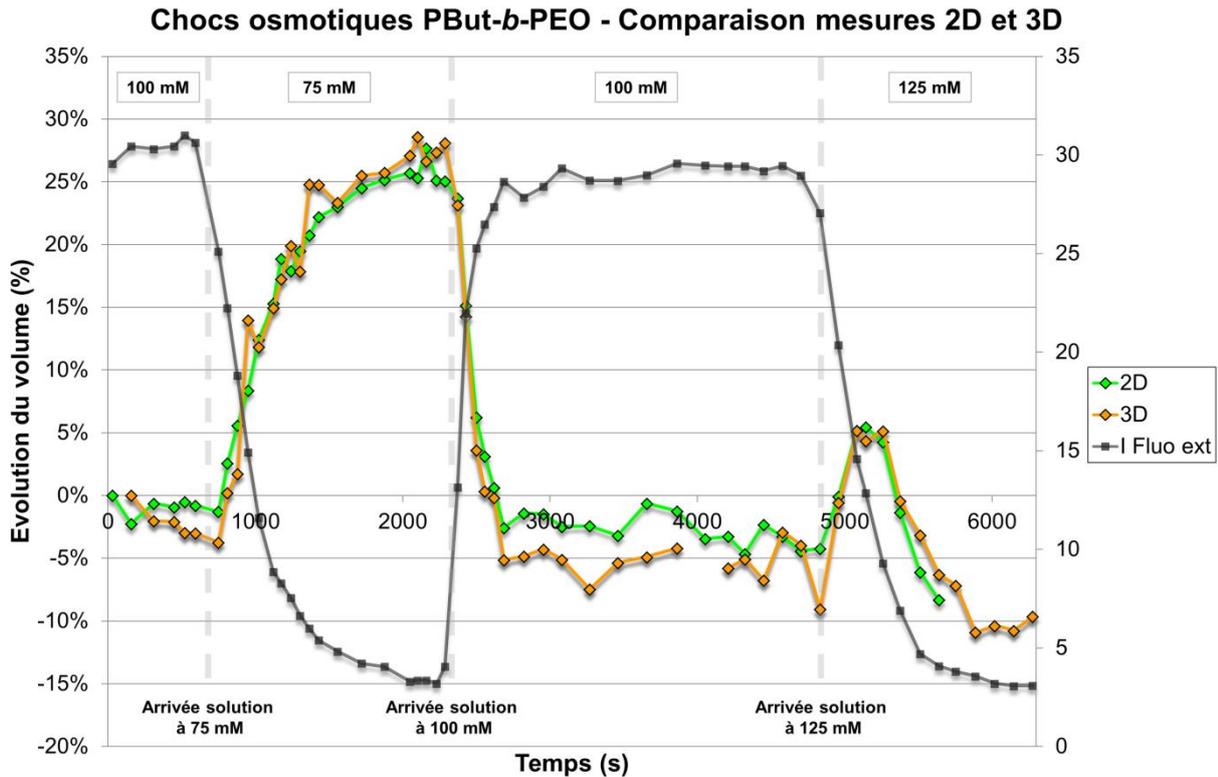


Figure 4.7. Pourcentage d'évolution temporelle du volume d'une vésicule de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ soumise à un choc hypotonique (100 mM → 75 mM), replacée dans une solution à 100 mM pour qu'elle retrouve sa taille initiale puis soumise à un choc hypertonique (100 mM → 125 mM). La courbe verte représente la reconstruction « 2D » du volume et la courbe orange la reconstruction « 3D ». La courbe noire représente l'intensité de fluorescence extravésiculaire qui est maximale pour la solution de préparation des vésicules à 100 mM de sucre.

Deux reconstructions du volume ont été faites à partir des empilements (voir partie 2.3.3.4), la reconstruction « 3D » qui correspond à la somme des aires de la vésicule mesurées sur chaque section optique multipliée par la distance entre elles, et la reconstruction « 2D » qui correspond au volume calculé à partir du rayon correspondant à l'aire maximale mesurée sur une section optique de l'empilement d'images.

Lors du choc hypotonique, le début de changement de taille des vésicules correspond bien au moment où la solution extravésiculaire, initialement isotonique, est remplacée. Cela est facilement visualisable grâce à la chute de l'intensité de fluorescence de la solution extérieure, seule la solution isotonique contenant du fluorophore (courbe noire figure 4.7). Il y a une très bonne corrélation entre les pourcentages de changement de volume des vésicules pour les deux méthodes de reconstruction utilisées, bien que le rayon déterminé ne soit pas exactement le même (annexe 4.5.3). En revanche, la valeur maximale de gonflement atteinte est d'environ 27%, ce qui est légèrement en dessous de la valeur théorique (33%) mais toujours dans les barres d'erreur. Il est peu vraisemblable qu'il y ait eu des fuites, ce qui pourrait expliquer la

différence de gonflement, car on retrouve une taille après le retour dans une solution à 100 mM très proche des dimensions initiales.²¹

Une possibilité est que la tension de membrane, qui apparaît suite à son étirement et qui s'oppose au gonflement, empêche la vésicule d'atteindre sa taille théorique maximale qui ne prend pas en compte les forces élastiques.^{87, 106} Pour un gonflement caractérisé par une déformation de la surface $\alpha(t) = \Delta A(t)/A_0$, la proportion de la pression osmotique compensée par les forces élastiques peut être estimée en faisant le rapport suivant (le détail du calcul est présenté en annexe 4.5.4) :

$$\Delta p(t)/\Delta\pi(t) = \frac{2K_a\alpha(t)}{\sqrt{R_0^2(\alpha(t) + 1)}} / RT \left(c^{ext} - c_0^{int} \frac{R_0^3}{(\sqrt{R_0^2(\alpha(t) + 1)})^3} \right) \quad (4.1)$$

avec $R = 0,08206 \text{ atm.L/mol/K}$ la constante des gaz parfaits, T la température (K), K_a le module élastique de la membrane et R_0 le rayon initial de la vésicule. Dans notre cas, on peut estimer que les forces élastiques compensent environ 74% ou 87%, respectivement pour les reconstructions « 2D » et « 3D », de la pression osmotique au gonflement maximal.

La deuxième partie de l'expérience, *i.e.* le choc hypertonique après avoir replacé la vésicule dans son milieu d'origine, donne de moins bons résultats car la contraction maximale observée n'est que de -10% (la légère augmentation du volume observée avant la contraction correspond à un reste de solution à 75 mM qui était dans le système microfluidique). La principale raison qui explique ce résultat est que, pour ce système de pièges hydrodynamiques et dans ces conditions d'osmolarité, les vésicules sont progressivement déformées et aspirées dans les pièges (Figure 4.8), jusqu'à ce qu'elles soient assez petites pour passer à travers.

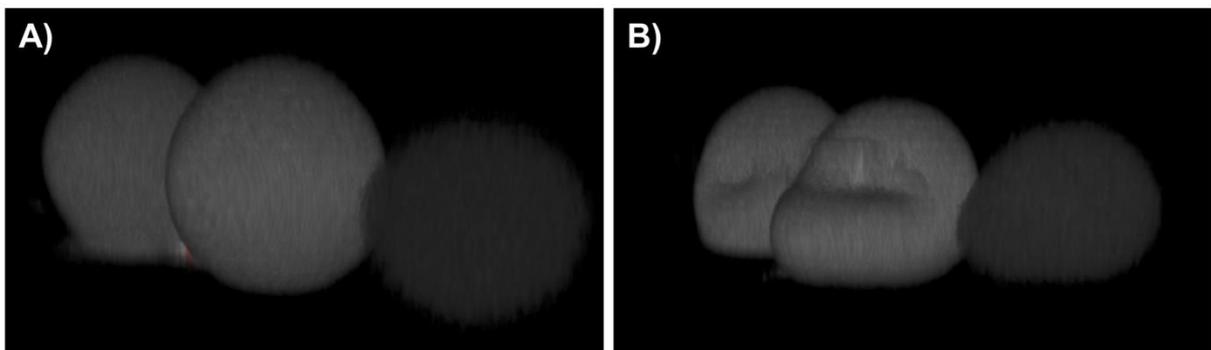


Figure 4.8. Reconstructions volumiques (ImageJ - 3D Viewer) de vésicules de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ encapsulant de l'Alexa Fluor 488 Dextran bloquées dans un piège hydrodynamique. A) Vésicules en conditions isotoniques et B) mêmes vésicules en cours de contraction lors d'un choc hypertonique (100 mM → 125 mM).

Il n'a donc pas été possible de s'assurer que la taille finale déterminée est bien la taille finale d'équilibre. De plus, cela empêche de faire les reconstructions « 2D » car les vésicules ne sont plus sphériques et rend les reconstructions « 3D » plus difficiles. En effet, il est beaucoup moins aisé de déterminer les contours des vésicules sur chaque section optique, tant au niveau de la transition entre la partie non aspirée et la partie aspirée qu'au niveau des extrémités supérieures et inférieures.

Les conditions osmotiques les plus adaptées pour faire les mesures de coefficient de perméabilité à l'eau avec le système de pièges microfluidiques sont donc les chocs hypotoniques. En plus de permettre l'observation des vésicules en minimisant la probabilité qu'elles soient aspirées à travers le piège, cela valide l'hypothèse qu'elles restent sphériques au cours du temps et permet ainsi de faire les reconstructions « 2D ».

4.2.2.2 Détermination du coefficient de perméabilité à l'eau lors du gonflement

Différentes valeurs du coefficient de perméabilité à l'eau ont été extraites des courbes représentant l'évolution temporelle de la vésicule. Les deux premières méthodes de traitement utilisées, détaillées partie 1.3.2.3, sont restreintes aux petites déformations ($\alpha < 10\%$) afin de pouvoir négliger les forces élastiques. En effet, c'est la principale limitation des mesures en conditions hypotoniques car on peut déjà estimer les forces élastiques à ce taux de gonflement ($\alpha = 10\%$) comme comptant pour environ 12% de la pression osmotique (annexe 4.5.4). Toutefois, il est raisonnable de supposer que les forces de tension dues à l'étirement de la membrane et qui s'opposent au gonflement de la vésicule sont initialement très faibles et augmentent progressivement. Les équations utilisées pour réaliser ces ajustements sont les suivantes :

- L'approximation à l'ordre zéro ($R_0^3/R(t)^3 = 1$), dans laquelle le rayon évolue linéairement dans le temps et le coefficient de perméabilité à l'eau se calcule grâce à l'équation :

$$P_f = - \frac{1}{v_w(c^{ext} - c_0^{int})} \frac{dR(t)}{dt} \quad (4.2)$$

avec v_w le volume molaire de l'eau ($\sim 0,018 \text{ L.mol}^{-1}$).

- L'approximation à l'ordre 1 ($R_0^3/R(t)^3 = 1 - 3(R(t) - R_0)/R_0$) quand le second terme de l'équation n'est pas négligeable. La valeur du rayon varie de manière exponentielle avec le temps :

$$R(t) = R_0[A - (A - 1)\exp(-kt)] \quad (1.21)$$

avec le paramètre $A = (4 c_0^{int} - c^{ext})/3 c_0^{int}$ sans dimension et le paramètre $k = (3 v_w P_f c_0^{int})/R_0$ en s^{-1} , à partir duquel le coefficient de perméabilité à l'eau P_f est calculé.

Les résultats obtenus pour ces deux ajustements de courbe et les deux procédés de reconstruction du volume de la vésicule sont présentés en figure 4.9.

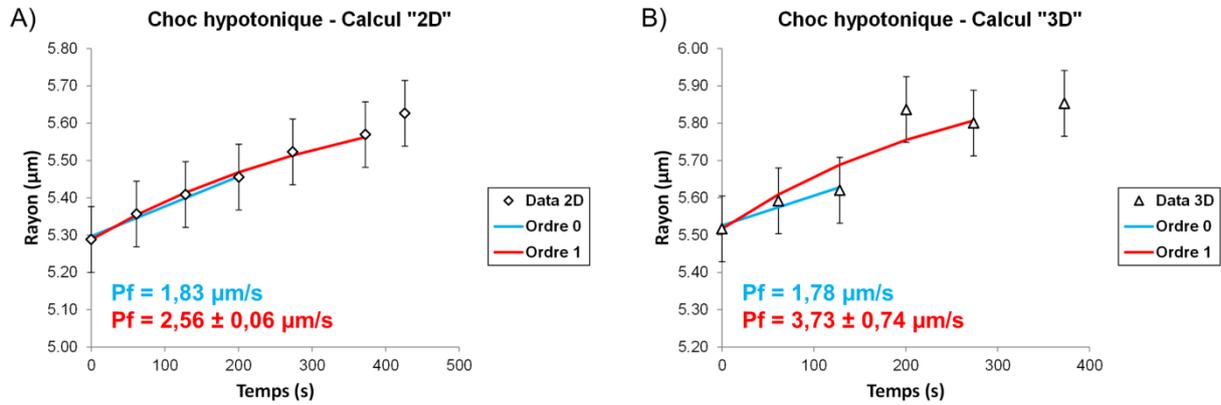


Figure 4.9. Courbes représentant l'évolution temporelle du rayon d'une vésicule de PBut₄₆-b-PEO₃₀ lors de son gonflement suite à un choc hypotonique (100 mM \rightarrow 75 mM). Les données expérimentales ont été obtenues en faisant A) une reconstruction «2D» à partir des empilements et B) une reconstruction «3D». Sur chaque graphe, la courbe bleue représente l'ajustement avec l'équation à l'ordre zéro et la courbe rouge l'ajustement avec l'équation à l'ordre 1 (l'erreur indiquée est calculée à partir de l'erreur sur le coefficient k).

Les résultats obtenus lors du gonflement des vésicules sont du même ordre de grandeur pour les deux méthodes de reconstruction des vésicules, « 2D » et « 3D », et dans les deux cas le coefficient de perméabilité à l'eau P_f calculé est plus élevé en ajustant la courbe expérimentale avec l'équation exponentielle (figure 4.9). Bien que les résultats soient similaires, cela indique qu'il est préférable de prendre en compte le second terme de l'équation, estimé comme comptant pour environ 15% dans le cas de vésicules sphériques.

Deux méthodes de traitement qui ne sont pas restreintes aux petites déformations ont également été utilisées :

- L'ajustement de courbe sans approximation sur $R_0^3/R(t)^3$, mais qui ne tient pas compte des forces élastiques. L'équation est obtenue en intégrant directement l'équation 1.15, ce qui conduit à la formule suivante :

$$t = -\frac{R_\infty}{v_w P_f c^{ext}} \left[u - u_0 + \frac{1}{3} \ln \left(\frac{1-u}{1-u_0} \right) - \frac{1}{6} \ln \left(\frac{1+u+u^2}{1+u_0+u_0^2} \right) - \frac{1}{3} \left(\tan^{-1} \left(\frac{1+2u}{\sqrt{3}} \right) - \tan^{-1} \left(\frac{1+2u_0}{\sqrt{3}} \right) \right) \right] \quad (4.3)$$

avec $u = \frac{R(t)}{R_\infty}$ et $\frac{R_0}{R_\infty} = \left(\frac{c_0^{ext}}{c_0^{int}}\right)^{\frac{1}{3}}$.

- L'ajustement de courbe avec une équation qui tient compte des forces élastiques qui s'établissent dans la membrane au cours du gonflement (calcul détaillé en annexe 4.5.5). L'équation utilisée est:

$$R(t) = R_0[(1 + A) - Aexp(-kt)] \tag{4.4}$$

avec $A = \frac{c_0^{int} - c_0^{ext}}{3c_0^{int} + \frac{4K_a}{RT}} R_0$ et $k = -\frac{P_f}{R_0} \left(3c_0^{int} + \frac{4K_a}{RT}\right)$.

En principe, il est donc possible de déterminer le coefficient de perméabilité à l'eau P_f ainsi que le module élastique K_a avec l'équation 4.4. Les résultats obtenus avec ces deux ajustements de courbe, qui ne sont pas restreints aux petites déformations, pour les deux procédés de reconstruction du volume de la vésicule sont présentés en figure 4.10.

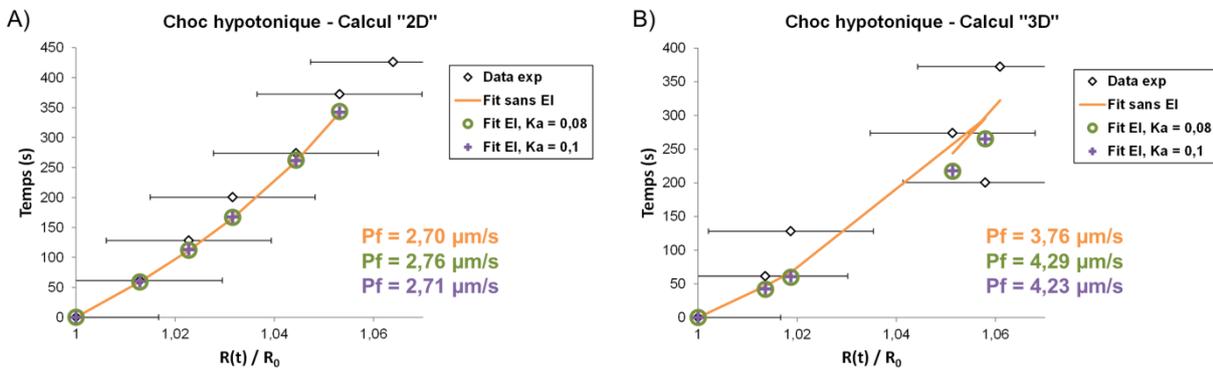


Figure 4.10. Courbes représentant l'évolution temporelle du rayon d'une vésicule de PBut₄₆-b-PEO₃₀ lors de son gonflement suite à un choc hypotonique (100 mM → 75 mM). Les données expérimentales ont été obtenues en faisant A) une reconstruction «2D» à partir des empilements et B) une reconstruction «3D». Sur chaque graphe, la courbe orange représente l'ajustement avec l'équation sans les forces élastiques, les ronds verts représentent l'ajustement obtenu avec les forces élastiques et un module élastique $K_a = 80$ mN/m, et les croix violettes l'ajustement obtenu avec les forces élastiques et un module élastique $K_a = 100$ mN/m.

La valeur du module élastique K_a utilisée pour faire les ajustements de courbe en tenant compte des forces élastiques a peu d'influence sur la valeur du coefficient de perméabilité à l'eau P_f déterminée. De plus, les résultats sont très proches de ce qui est obtenu en faisant l'ajustement de courbe avec l'équation à l'ordre 1. L'équation 1.21 est donc suffisante et a été retenue pour déterminer les coefficients de perméabilité à l'eau P_f . Cela permet de simplifier le traitement des données et de traiter un maximum de courbes car certaines vésicules n'ont pas pu être maintenues dans les pièges hydrodynamiques jusqu'à ce qu'elles atteignent leur taille d'équilibre après le gonflement.

Les différents coefficients de perméabilité à l'eau déterminés lors du gonflement sont en accord avec la valeur de $3,1 \pm 1,6 \mu\text{m/s}$ rapportée dans la littérature par Carlsen *et al.* pour des vésicules préparées avec le même copolymère.³⁶ Leur mesure avait également été réalisée en appliquant des chocs hypotoniques, mais sur des vésicules en solution. La principale difficulté rencontrée était l'estimation de l'amplitude du choc osmotique subi par les vésicules, car avec cette méthode il n'était pas possible de faire le suivi temporel d'une vésicule tout en mélangeant le milieu extérieur pour assurer l'homogénéité de la concentration en glucose de la solution extravésiculaire. L'utilisation de pièges microfluidiques supprime cette limitation car la solution extérieure est complètement remplacée.

4.2.2.3 Détermination du coefficient de perméabilité à l'eau lors du retour à la taille initiale

Les données expérimentales correspondant au retour de la vésicule à sa taille initiale, après le gonflement, peuvent également être utilisées pour déterminer une valeur du coefficient de perméabilité à l'eau (figure 4.11).

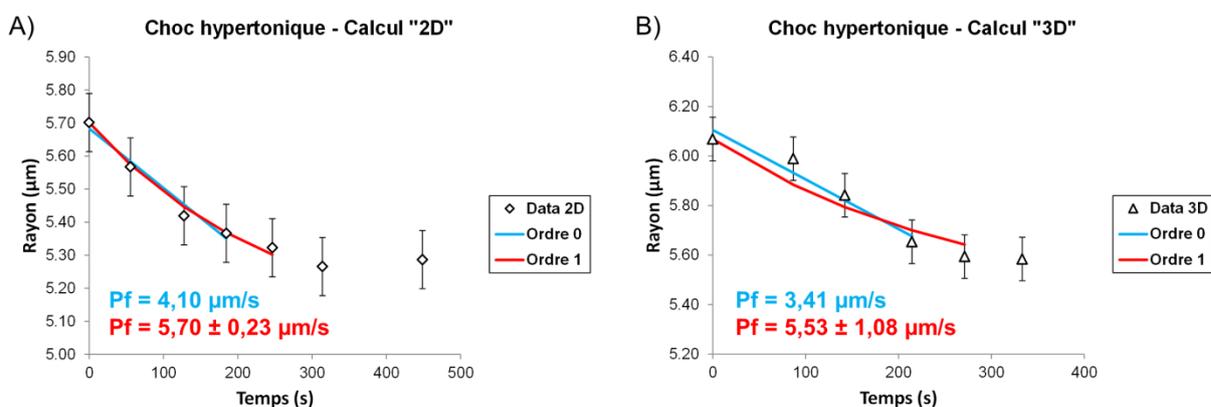


Figure 4.11. Evolution temporelle du rayon d'une vésicule de PBut₄₆-b-PEO₃₀ replacée dans son milieu d'origine suite à un choc hypotonique. Les données expérimentales ont été obtenues en faisant A) une reconstruction «2D» à partir des empilements et B) une reconstruction «3D». Sur chaque graphe, la courbe bleue représente l'ajustement avec l'équation à l'ordre zéro et la courbe rouge l'ajustement avec l'équation à l'ordre 1 (l'erreur indiquée est calculée à partir de l'erreur sur le coefficient k).

Les coefficients de perméabilité à l'eau P_f déterminés pour les deux méthodes de reconstruction du volume et les ajustements de courbe à l'ordre 0 et l'ordre 1 sont plus élevés que pour les données expérimentales correspondant au gonflement de la vésicule. Il est possible que cela soit dû à la tension de la membrane qui, en plus de la pression osmotique, contribue à expulser l'eau des vésicules. En effet, les déformations maximales de la surface au départ (calculées à partir du rayon initial R_0 et du rayon final), $\alpha = 17,7\%$ et $\alpha = 18,2\%$ pour les reconstructions

« 2D » et « 3D » respectivement, correspondent à des forces élastiques élevées. Il est donc préférable d'utiliser les données obtenues lors du gonflement pour calculer le coefficient de perméabilité à l'eau d'une vésicule.

L'utilisation de chocs hypotoniques avec le système de pièges microfluidiques permet donc des mesures du coefficient de perméabilité à l'eau P_f des vésicules pendant leur gonflement. Le traitement « 2D » des données, qui consiste en la mesure du rayon d'une vésicule sur la section optique centrale pour estimer son volume, est possible car l'hypothèse de sphéricité est vérifiée dans ces conditions (seuls les chocs hypertoniques entraînent un changement de forme). En plus de simplifier le traitement des données, cela permet d'améliorer la résolution temporelle car il n'est pas nécessaire de scanner les vésicules sur toute leur hauteur. Les données expérimentales peuvent ensuite correctement être ajustées avec une équation exponentielle, qui permet de calculer une valeur du coefficient de perméabilité à l'eau P_f en accord avec la littérature. La limitation principale de cette technique est qu'il y a une erreur liée à l'élasticité de la membrane, mais celle-ci peut-être minimisée en traitant les données dans le régime des faibles déformations ($\alpha < 10\%$).

4.2.3 Perméabilité à l'eau des vésicules hybrides

4.2.3.1 Vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇

Avant de modifier la nature des membranes *via* l'incorporation de lipides, il est nécessaire de déterminer le coefficient de perméabilité à l'eau P_f de la membrane polymère seule. Les expériences sont menées selon le protocole établi en utilisant les vésicules de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀. Cependant, il est nécessaire de travailler avec des débits d'injection plus faibles (seulement 1 à 2 $\mu\text{m/s}$) car ces vésicules se déforment plus facilement et sont aspirées à travers les pièges microfluidiques pour de plus faibles débits d'injection. Cette restriction rend l'expérience plus compliquée à réaliser car plus le débit d'injection est faible plus les vésicules piégées sont petites¹⁹² (voir partie 2.3.1.3). Cela implique également qu'il y a un photoblanchiment plus prononcé, que le changement de phase externe est plus long (expérience plus longue) et que le risque de perdre la vésicule observée est plus élevé.

Une seconde difficulté expérimentale, dont on se rend compte grâce aux fluorophores qui marquent la membrane et le milieu encapsulé, est que de nombreuses vésicules présentent une invagination (annexe 4.5.6). Afin de ne pas ajouter de sources d'erreur, les vésicules sélectionnées pour faire les mesures du coefficient de perméabilité sont celles que l'on observe unilamellaires au vu des différentes images de fluorescence.

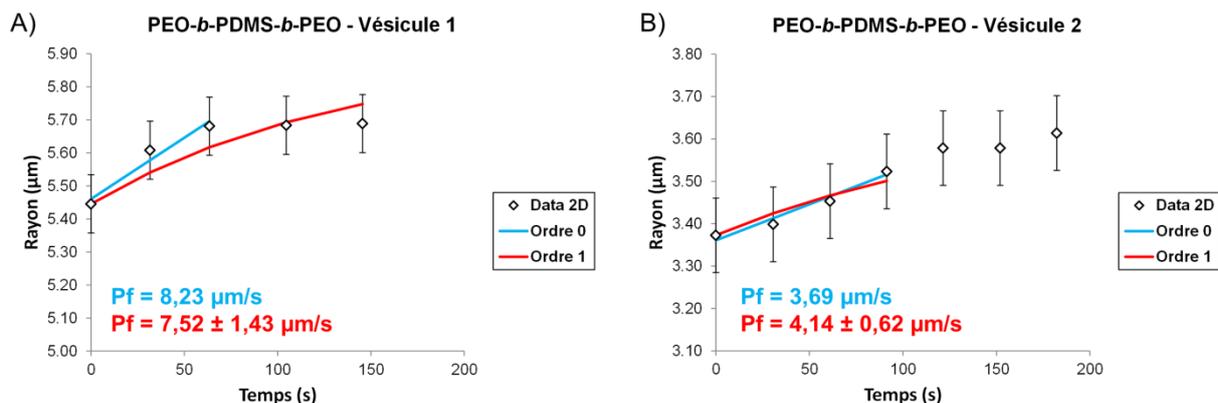


Figure 4.12. Evolution temporelle du rayon de deux vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ suite à un choc hypotonique (100 → 75 mM). Les données expérimentales ont été obtenues en prenant la valeur du rayon correspondant à l'aire maximale mesurée sur l'ensemble des sections optiques de chaque empilement (traitement « 2D »). Sur chaque graphe, la courbe bleue représente l'ajustement avec l'équation à l'ordre zéro et la courbe rouge l'ajustement avec l'équation à l'ordre 1 (l'erreur indiquée est calculée à partir de l'erreur sur le coefficient k).

Même s'il a été établi que le calcul du coefficient de perméabilité à l'eau P_f doit être fait à partir du traitement des courbes avec l'équation à l'ordre 1, l'ajustement avec l'équation linéaire a également été réalisé car de nombreux suivis temporels du rayon des vésicules n'ont pas été exploitables (il n'a pas été possible de déterminer le volume initial exact des vésicules, perte avant d'observer un changement de taille...). L'intérêt est de s'assurer qu'il n'y a pas d'écart important entre les deux méthodes d'ajustement, tout particulièrement pour la vésicule n°1 où il semble manquer la valeur de référence du volume (le premier point correspond au début du changement de taille) car l'ajustement à l'ordre 0 se base uniquement sur la pente de la courbe.

Le coefficient de perméabilité à l'eau déterminé avec les deux ajustements de courbe est du même ordre de grandeur pour chaque vésicule (figure 4.12). La valeur moyenne, déterminée avec les ajustements de courbes à l'ordre 1, est $P_f = 5,8 \pm 2,4 \mu\text{m/s}$. Bien qu'elle soit de l'ordre de grandeur caractéristique des membranes polymères,⁶ cette valeur diffère de ce que l'on pouvait attendre au vu des résultats déjà rapportés pour des membranes dont le cœur hydrophobe est composé de PDMS. En effet, à partir des lois d'échelle décrites dans la littérature, $d \propto M_{\text{wh}}^{0,55}$ et $P_f \propto d^{-1}$, et de la valeur du coefficient de perméabilité à l'eau P_f mesuré pour des vésicules de PMOXA₁₅-*b*-PDMS₁₁₀-*b*-PMOXA₁₅ (0,8 $\mu\text{m/s}$),³⁰ on peut estimer un coefficient de perméabilité à l'eau d'environ 1 $\mu\text{m/s}$ pour les membranes formées par le PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ seul. Il est possible que cette différence d'un facteur 5 soit liée au fait que la valeur rapportée dans cette référence est très petite, car la perméabilité mesurée dans notre cas est faible.

En revanche, la valeur de $5,8 \pm 2,4 \mu\text{m/s}$ mesurée expérimentalement est plus faible que l'estimation de $\sim 15 \mu\text{m/s}$ que l'on peut faire en se basant sur le coefficient de perméabilité à l'eau mesurée pour les vésicules de PDMS_{22-g}-PEO₁₂ ($28 \mu\text{m/s}$) et les différentes lois d'échelle. Cela confirme que l'architecture du copolymère formant la membrane impacte sa capacité à laisser passer des molécules d'eau, comme cela avait été suggéré dans l'étude de Carlsen *et al.*³⁶

4.2.3.2 Vésicules hybrides 75% PEO_{17-b}-PDMS_{66-b}-PEO₁₇ / 25% DPPC

Les observations de microscopie optique sur des vésicules formées à partir de cette composition polymère / lipide ont mis en évidence des membranes hybrides qui apparaissent comme étant homogènes à l'échelle microscopique. En revanche, les analyses DSC révèlent un signal d'amplitude modérée pouvant correspondre à une transition de phase gel - liquide, ce qui permet d'envisager la présence de nano-domaines de DPPC dispersés dans la matrice de copolymère.

Les vésicules hybrides utilisées lors des chocs hypotoniques ont été électroformées dans une solution de glucose à 100 mM qui contient également de l'Alexa-Fluor 488 Dextran. Seul un simple marquage de membrane, avec la Liss-Rhod PE, a permis de vérifier la présence de la phase lipidique dans les membranes mais les observations précédentes ont toujours montré que les vésicules présentaient un double marquage de membrane et donc un caractère hybride (voir partie 4.1.1). Les chocs hypotoniques ont été appliqués avec une solution de glucose à 75 mM (figure 4.13 et tableau 4.1).

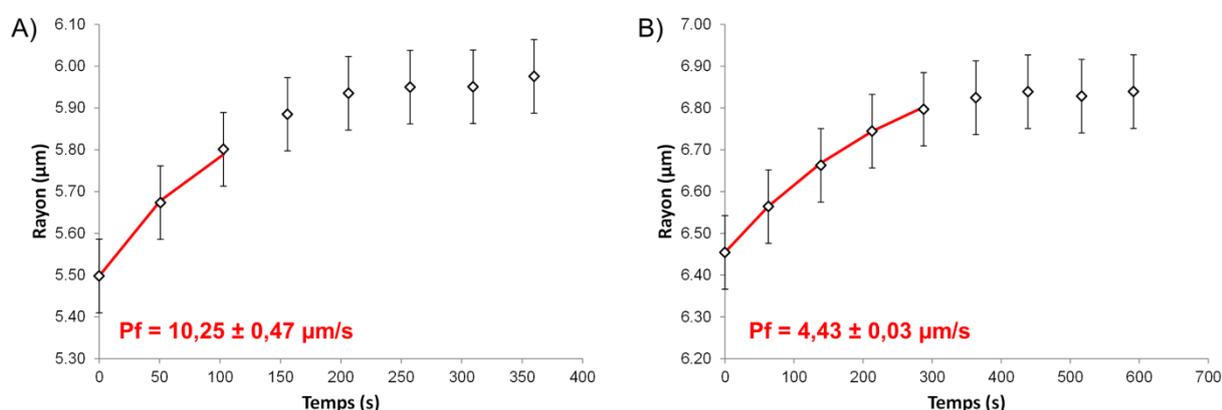


Figure. 4.13. Evolution temporelle du rayon de deux vésicules hybrides préparées à partir d'un mélange 75% PEO_{17-b}-PDMS_{66-b}-PEO₁₇ / 25% DPPC et soumises à un choc hypotonique (100 → 75 mM). Les données expérimentales ont été obtenues en prenant la valeur du rayon correspondant à l'aire maximale mesurée sur l'ensemble des sections optiques de chaque empilement, et l'ajustement de la courbe est fait avec l'équation à l'ordre 1.

| Vésicule | R_0 (μm) | % changement $V_{\text{éq. th}}$ | % changement $V_{\text{éq. exp}}$ | α_{max} (%) | P_f ($\mu\text{m/s}$) |
|----------|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| A | 5,50 | 32,5% | 28,1% | 17,9% | $10,25 \pm 0,47$ |
| B | 6,45 | 32,5% | 18,2 % | 11,2 % | $4,43 \pm 0,03$ |
| C | 7,47 | 32,5% | 25,7% | 16,5% | $7,28 \pm 1,21$ |

Tableau 4.1. Résultats obtenus en appliquant un choc hypotonique (100 \rightarrow 75 mM) sur des vésicules préparées à partir d'un mélange 75% PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / 25% DPPC.

Les résultats indiqués dans le tableau 4.1 montrent plusieurs différences entre les trois vésicules. Le taux de gonflement final mesuré pour la vésicule B est bien en dessous de celui qui aurait dû être théoriquement atteint et le coefficient de perméabilité à l'eau déterminé est plus faible que pour les vésicules A et C, même si l'ajustement de courbe paraît bon (figure 4.13). Ce résultat peut s'expliquer par une mauvaise encapsulation du soluté dans cette vésicule lors de sa formation. En effet, une concentration intravésiculaire en glucose plus faible implique un plus faible gonflement pour retourner à l'équilibre ainsi qu'un plus faible gradient de concentration ressenti lors du changement de phase extérieure. L'inhomogénéité d'encapsulation d'un soluté est un phénomène courant. C'est également vrai pour la concentration en fluorophore (annexe 4.5.6) et a déjà été rapporté dans la littérature pour des macromolécules hydrophiles.²³⁴ Il est également possible qu'il y ait une inhomogénéité de composition de la membrane, qui ne contient pas forcément 25% molaire de DPPC.

Le coefficient de perméabilité à l'eau moyen est $P_f = 7,3 \pm 2,9 \mu\text{m/s}$. Cette valeur est très proche de celle qui a été obtenue pour les vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ pur, l'inclusion de 25% molaire de DPPC ne semble donc pas modifier la perméabilité à l'eau de ces membranes. Bien que les analyses DSC révèlent un signal d'amplitude modérée pouvant correspondre à une transition de phase gel - liquide, laissant présumer de la présence de nano-domaines de DPPC, une partie non négligeable des lipides serait répartie dans la matrice polymère. Les modifications de perméabilité peuvent avoir deux origines : la nature de la membrane qui forme les domaines et / ou des défauts dans la membrane au niveau de l'interface domaines lipidiques / matrice polymère. Dans la mesure où il y aurait peu de domaines et que ceux-ci seraient vraisemblablement peu perméables à l'eau (la perméabilité de la phase L_o est similaire à celle du DPPC en phase gel, seulement 0,042 $\mu\text{m/s}$ à 26,5°C),¹⁸⁴ l'effet n'est peut-être pas visible. Il est également possible que, pour cette composition, il n'y ait pas assez de lipides dans la membrane pour former des domaines nanométriques et que la répartition des composants soit homogène. Dans les deux cas, la valeur de la perméabilité de la vésicule hybride est alors limitée par celle de la matrice polymère.

Il n'a pas été possible de réaliser des mesures du coefficient de perméabilité à l'eau sur des vésicules préparées à partir d'un mélange plus riche en DPPC (50% molaire). Très peu de vésicules ont été retenues par les pièges hydrodynamiques, elles semblent se déformer facilement pour cette composition. Celles qui ont été piégées n'ont pas montré d'évolution significative de leur taille au cours du choc hypotonique (expérience réalisé sur deux lots différents). Il est possible que la déformation maximale de la membrane soit plus proche de celle rapportée pour les liposomes ($\alpha_c \sim 5\%$) à cause de la proportion plus élevée en lipides dans la composition du mélange, et ne soit par conséquent pas détectable en microscopie optique sur de petites vésicules ($R_0 \sim 3 \mu\text{m}$).

4.2.3.3 Vésicules hybrides PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / POPC

De manière similaire aux vésicules hybrides utilisant du DPPC, les observations de microscopie optique ont montré des membranes hybrides apparemment homogènes à l'échelle microscopique. Les analyses par DSC n'ont cependant pas permis de mesurer un signal correspondant à la transition coopérative de domaines lipidiques pour les compositions où il y a plus de 30% molaire en copolymère.

Les vésicules utilisées ont été préparées dans une solution contenant 100 mM de glucose et à partir d'un mélange 75% molaire copolymère / 25% molaire lipide. Il n'a pas été possible de piéger des vésicules préparées à partir d'un mélange équimolaire, même à très faible débit d'injection, car celles-ci se déforment et sont aspirées à travers les pièges hydrodynamiques. Les chocs osmotiques ont été appliqués avec une solution hypotonique à 75 mM (figure 4.14 et tableau 4.2).

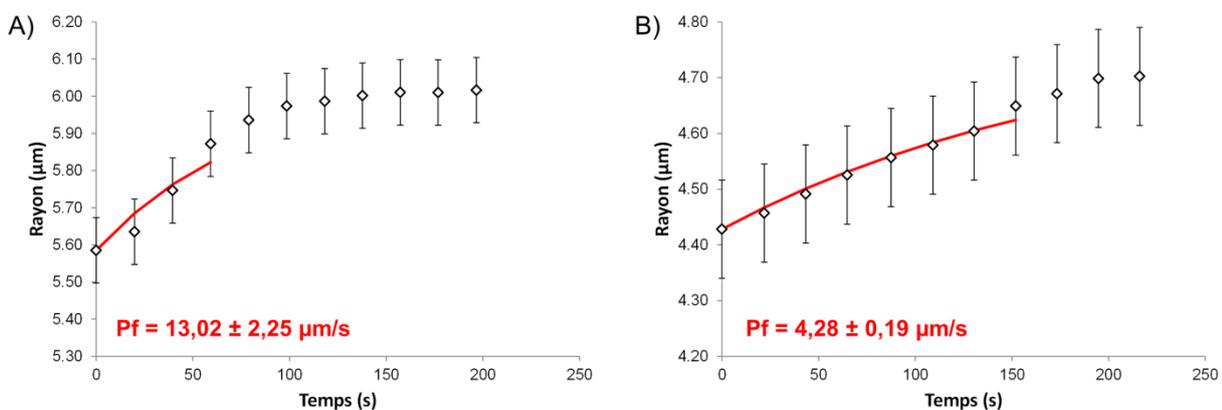


Figure 4.14. Evolution temporelle du rayon de deux vésicules hybrides préparées à partir d'un mélange 75% PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / 25% POPC et soumises à un choc hypotonique (100 → 75 mM). Les données expérimentales ont été obtenues en prenant la valeur du rayon correspondant à l'aire maximale mesurée sur l'ensemble des sections optiques de chaque empilement, et l'ajustement de la courbe est fait avec l'équation à l'ordre 1.

| Vésicule | R_0 (μm) | % changement $V_{\text{éq. th}}$ | % changement $V_{\text{éq. exp}}$ | α_{max} (%) | P_f ($\mu\text{m/s}$) |
|----------|-------------------------|--|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| A | 5,59 | 31,7% | 29,49% | 18,80% | $13,02 \pm 2,25$ |
| B | 4,43 | 31,7% | 23,9% | 15,36% | $4,28 \pm 0,19$ |
| C | 5,91 | Vésicule perdue avant qu'elle atteigne l'équilibre | | | $3,41 \pm 0,18$ |
| D | 4,90 | 31,7% | 28,07% | 17,93% | $6,45 \pm 0,43$ |
| E | 4,61 | 31,7% | 25,24% | 16,19% | $4,33 \pm 0,30$ |
| F | 7,09 | Vésicule perdue avant qu'elle atteigne l'équilibre | | | $7,78 \pm 0,77$ |

Tableau 4.2. Résultats obtenus en appliquant un choc hypotonique ($100 \rightarrow 75$ mM) sur des vésicules préparées à partir d'un mélange 75% molaire de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / 25% molaire de POPC.

Les mesures effectuées sur les vésicules hybrides, résumées dans le tableau 4.2, diffèrent d'une vésicule à l'autre. Les plus grosses variations concernent les coefficients de perméabilité à l'eau P_f déterminés en ajustant les courbes expérimentales avec une équation exponentielle. Les taux de gonflements étant similaires, bien qu'inférieurs à la limite théorique à cause des forces élastiques qui s'appliquent dans la membrane, il est possible que ce soit lié à la présence simultanée de nombreuses vésicules dans un même piège hydrodynamique. En effet, il est fréquent que celles-ci soient en contact ce qui a pour effet de diminuer la surface osmotiquement active (à travers laquelle s'effectue l'échange d'eau).

Le coefficient de perméabilité à l'eau moyen déterminé est très proche de celui des polymersomes : $P_f = 6,5 \pm 3,6$ $\mu\text{m/s}$. Comme pour le DPPC, l'incorporation de 25% molaire de POPC ne modifie pas la perméabilité à l'eau des vésicules formées. Ce résultat est à première vue plus surprenant car le POPC, qui est en phase fluide à température ambiante, s'assemble sous forme de bicouches très perméables à l'eau quand il est le seul composé ($P_{f \text{ POPC}} \sim 130$ $\mu\text{m/s}$).¹⁸⁵ Cependant, les analyses DSC menées sur les mélanges PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / POPC ont révélé une disparition du signal de transition coopérative des lipides pour les fractions molaires en copolymère supérieures à 30%. Cela a été attribué à la dispersion des chaînes lipidiques dans la matrice polymère, qui ne peuvent plus ségréger en une phase riche en POPC qui transiterait d'une phase L_α à L_β . Il n'y a par conséquent pas de nano-domaines qui pourraient localement augmenter la perméabilité à l'eau de la membrane, donc celle-ci est limitée par celle de la matrice polymère.

Il est à noter que Lim *et al.* ont observé, pour des membranes hybrides composées de PBut₂₂-*b*-PEO₁₄ et de POPC, une augmentation de la quantité de carboxyfluorescéine libérée après

quelques jours quand la fraction molaire de POPC utilisée augmente.¹⁷⁵ Cependant, nous n'avons pas d'informations sur la structuration des membranes qu'ils obtiennent.

Il apparaît donc comme nécessaire de former des domaines de lipide fluide, au moins à l'échelle nanométrique, pour modifier les propriétés de perméabilité à l'eau des vésicules hybrides. Les essais menés avec 25% molaire de deux lipides différents, le POPC qui est fluide à température ambiante et le DPPC qui est en phase gel, ont montré une perméabilité qui est limitée à celle de la matrice polymère, majoritaire pour cette composition molaire.

4.3 Expérience de minéralisation

Les polymersomes sont décrits comme étant très peu perméables aux espèces ioniques.¹⁵⁹ Il a été prouvé que l'ajout de calcimycine, un ionophore qui permet de transporter sélectivement les cations divalents,¹⁶⁰ dans des membranes hydrophobes de PDMS de faible masse molaire (PDMS₂₂-g-PEO₁₂) peut significativement accroître le transport de d'ions Ca²⁺.⁴ Par le biais d'expériences de minéralisation intravésiculaire, nous allons déterminer si cette amélioration de la perméabilité aux ions calcium reste efficace pour des membranes de même nature chimique mais plus épaisses.

4.3.1 Précipitation intravésiculaire de CaCO₃

Les expériences de minéralisation intravésiculaire peuvent se découper en étapes distinctes. Il faut tout d'abord préparer des vésicules dans une solution contenant des ions carbonates CO₃²⁻ (en équilibre avec des ions hydrogénocarbonates HCO₃⁻) afin que ceux-ci se retrouvent encapsulés dans les milieux intravésiculaires. Les ions carbonates de la phase continue sont ensuite remplacés par des ions Ca²⁺. Finalement, de la calcimycine est ajoutée au système pour induire la perméabilité de la membrane aux ions calcium et ainsi initier la précipitation dans les vésicules (figure 4.15).

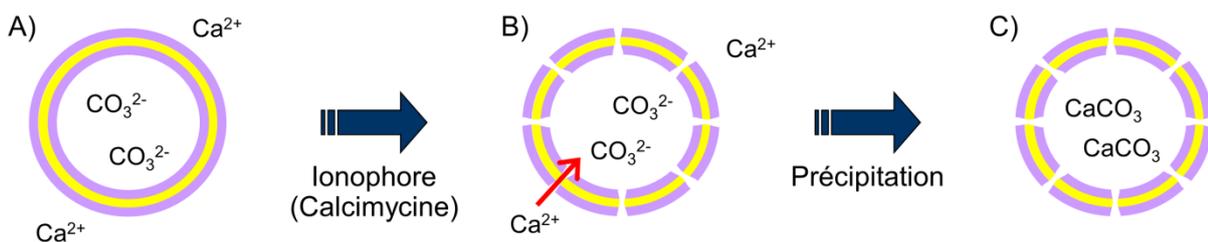


Figure 4.15. Représentation schématique du principe de précipitation intravésiculaire du carbonate de calcium CaCO₃ : A) préparation d'une solution de vésicules encapsulant des ions carbonates et contenant des ions calcium dans le milieu extravésiculaire, B) ajout de calcimycine pour permettre le passage des ions calcium à travers la membrane et déclencher C) la précipitation intravésiculaire.

Le système utilisé doit respecter certaines conditions pour que l'on puisse déclencher la précipitation au moment souhaité. Il faut que les ions carbonates soient correctement encapsulés lors de la formation des vésicules, que la membrane de celles-ci soit imperméable aux ions calcium et aux ions carbonates, et que l'ionophore permette le passage des ions calcium à travers la membrane.

De plus, il y a quelques précautions à prendre quand on fait une expérience de minéralisation intravésiculaire. Il faut prendre soin de tamponner le pH des solutions, particulièrement celui du milieu intravésiculaire, car les propriétés de transport de la calcimycine dépendent à la fois du pH général (meilleure efficacité pour un pH de 7,5 ou plus)¹⁶³ et des gradients de pH qui peuvent s'établir au travers de la membrane à cause du transport de protons H⁺ en contrepartie des ions Ca²⁺ pour maintenir l'électroneutralité (voir partie 1.4.2.2). Il est également préférable de tamponner l'osmolarité des solutions, en la fixant à une valeur élevée, pour ne pas avoir de contraction des vésicules (ou une contraction négligeable) au cours de la précipitation. En effet, la concentration intravésiculaire en ions carbonates et en protons diminue au fur et à mesure que les ions calcium entrent dans les vésicules et sont consommés, créant ainsi un déséquilibre osmotique.

4.3.2 Perméabilité naturelle de la membrane aux espèces ioniques

Ce sont les propriétés d'imperméabilité des vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ aux espèces ioniques qui vont permettre de réaliser ce type d'expérience. En effet, il faut être en mesure de séparer les deux espèces ioniques impliquées dans le processus de minéralisation pour pouvoir contrôler le début de précipitation.

La perméabilité des membranes formées par auto-assemblage aux ions calcium est généralement très faible. Par exemple, un coefficient de perméabilité de seulement $2,5 \cdot 10^{-7}$ μm/s a été mesuré pour des vésicules phospholipidiques.¹⁰⁴ Des expériences de précipitation de phosphate de calcium dans des vésicules de PMOXA-*b*-PDMS-*b*-PMOXA⁽¹⁵⁹⁾ et de carbonate de calcium dans des vésicules de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂⁽⁴⁾ ont également montré que les membranes hydrophobes de PDMS sont quasiment imperméables aux ions calcium.

Cette perméabilité spécifique est étudiée en utilisant des fluorophores sensibles au calcium, tels que le Fluo-3 ou le Fluo-5N. Le fluorophore retenu lors de notre étude est le Fluo-5N, dont la gamme de sensibilité aux ions calcium va jusqu'à une concentration de 1 mM. Malheureusement, il s'est avéré que ce fluorophore se dégrade lors du processus d'électroformation, rendant toute mesure quantitative impossible.

Seul un test qualitatif mettant en présence des vésicules qui encapsulent des ions carbonates et une solution contenant du calcium a permis de montrer que, au moins pour la durée d'une expérience de minéralisation (2-3 heures), les membranes de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ sont peu ou pas perméables aux ions calcium (annexe 4.5.7). En se basant sur cette observation et les résultats préalablement rapportés dans la littérature,^{4,159} il est raisonnable d'estimer que ces membranes sont quasiment imperméables aux ions calcium. De plus, cela révèle que les membranes sont peu perméables aux ions HCO₃⁻.

4.3.3 Ajout d'ionophore *via* la solution d'ions calcium

Pour réaliser cette expérience, des vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ qui encapsulent une solution contenant 20 mM de NaHCO₃, 20 mM d'HEPES (tampon pH) et 130 mM de sucrose (tampon osmolarité) ont été préparées par électroformation, selon le protocole décrit dans la partie 3.3.2 (durée de formation de 21h30). Suite à l'électroformation, la solution de vésicules a été diluée d'un facteur 20 par une solution iso-osmolaire contenant 20 mM d'HEPES et du glucose afin de diminuer la concentration extravésiculaire en ions carbonates. Cela est beaucoup plus rapide qu'une dialyse, et l'utilisation du glucose dans la solution de dilution permet de faire sédimenter les vésicules, remplies de sucrose, pour les concentrer et ainsi en récupérer facilement une quantité raisonnable.

La précipitation intravésiculaire est déclenchée en mélangeant 40 µL de cette solution à un volume équivalent de solution iso-osmolaire contenant 20 mM de CaCl₂, 20 mM d'HEPES, 2 µM de calcimycine et du glucose (figure 4.16). L'observation est réalisée entre deux lamelles de verre recouvertes d'une couche de PDMS.

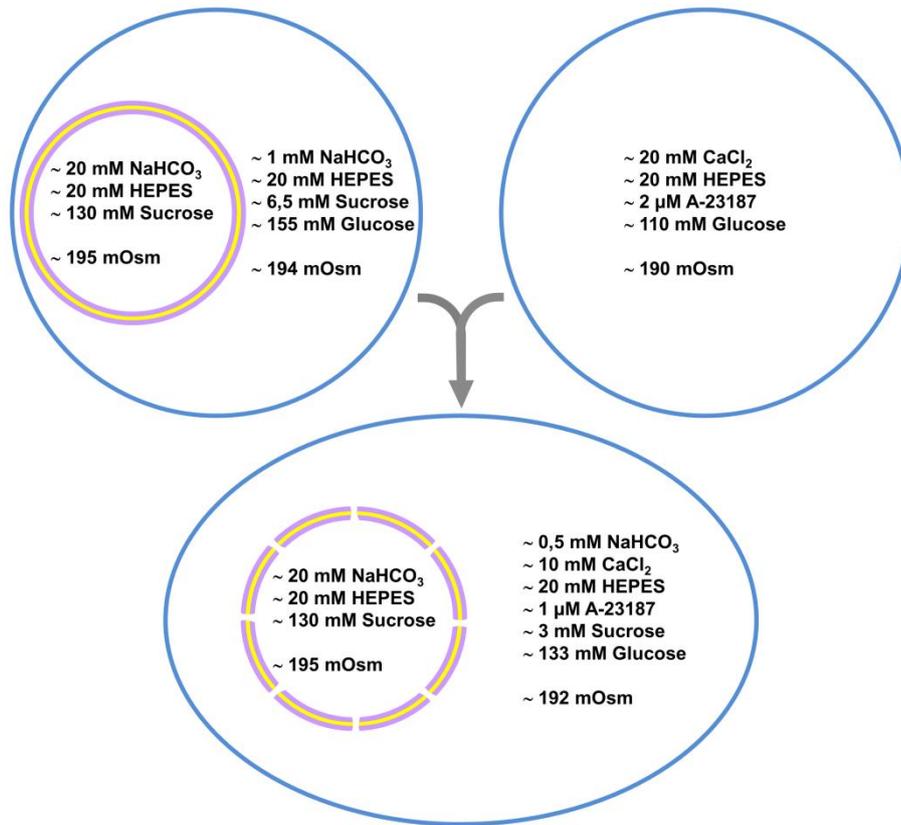


Figure 4.16. Schéma de principe d'une expérience de minéralisation dans laquelle la calcimycine (A-23187) est ajoutée dans la solution extravésiculaire.

Des photographies de microscopie en contraste de phase prises au cours de cette expérience sont présentées en figure 4.17. Environ 5 minutes après avoir mélangé les deux solutions, on voit apparaître de petits points noirs au niveau de la membrane et dans les vésicules, qui sont vraisemblablement des précipités de carbonate de calcium.⁴ Leur nombre semble augmenter avec le temps écoulé depuis le mélange des solutions. Après environ une demi-heure, on observe de plus en plus de gros points noirs résultant de l'agglomération des petits. Certains présentent un aspect bleuté, qui laisse penser que l'on est passé de petits précipités de carbonate de calcium amorphes vers un précipité cristallin.

Une expérience témoin, réalisée en ajoutant 1 μM de calcimycine à une solution de polymersomes dans du sucrose, ne montre pas la formation de points noirs dans les membranes (annexe 4.5.8). En effet, il est possible que la calcimycine seule s'agrége dans les membranes et se comporte comme un canal ionique.²³⁵ L'A-23187 permet donc de déclencher le transport des cations Ca²⁺ à travers la membrane des vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇.

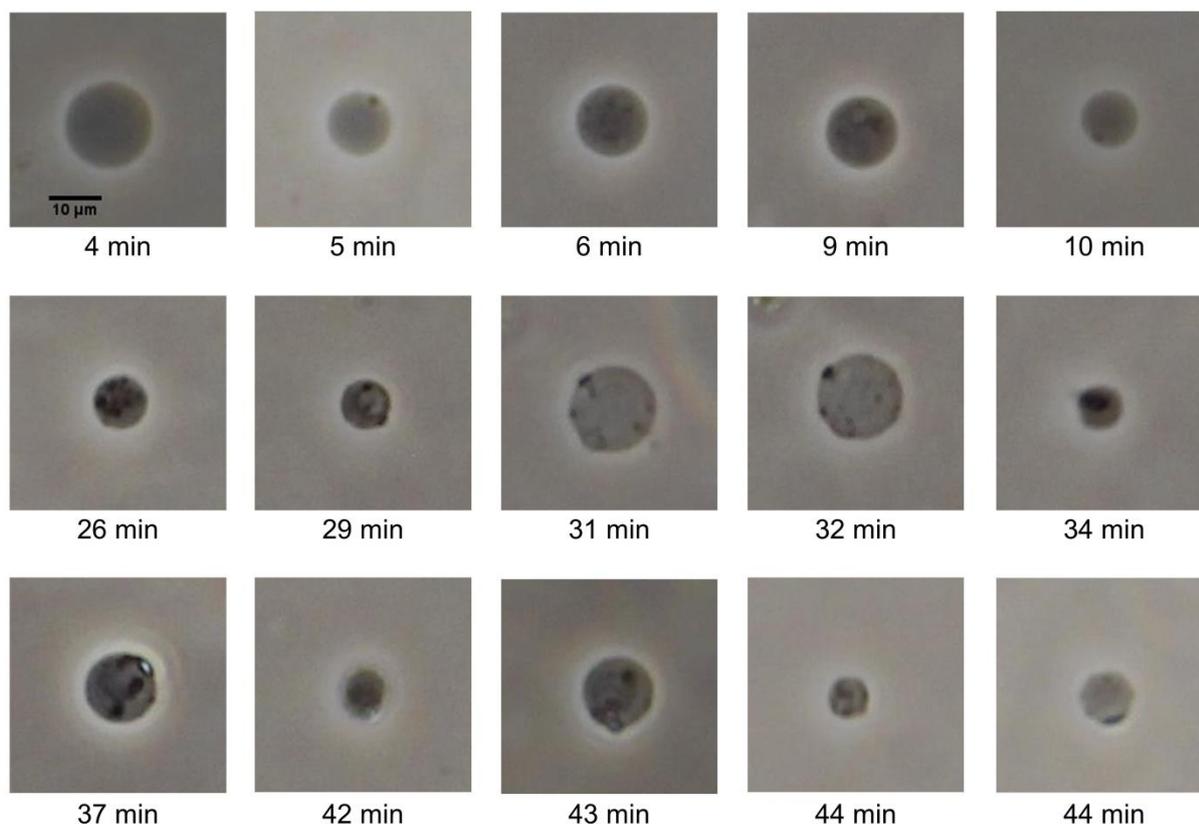


Figure 4.17. Photographies prises sur diverses vésicules de l'échantillon. Le temps indiqué sous chaque image correspond au temps écoulé depuis le mélange des deux solutions.

Toutefois, l'inconvénient majeur de ce protocole de minéralisation intravésiculaire reste que la quantité de calcimycine utilisée par rapport à la quantité de copolymère auto-assemblé sous forme de vésicules n'est pas contrôlée.

4.3.4 Incorporation d'ionophore dans les membranes lors de la formation

Pour contrôler la quantité de calcimycine dans le système, 2wt% d'ionophore est directement introduit dans la solution de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ avant la préparation des films sur les électrodes d'ITO utilisées lors de l'électroformation. La solution de vésicules encapsulant les ions carbonates est ensuite préparée de la même manière que pour l'expérience décrite partie 4.3.3.

La précipitation intravésiculaire est déclenchée en mélangeant 40 μL de cette solution à un volume équivalent de solution iso-osmolaire contenant 20 mM de CaCl₂, 20 mM d'HEPES et du sucrose (figure 4.18). Il n'est pas nécessaire d'ajouter de l'ionophore car il se trouve a priori déjà dans la solution de vésicules. La solution de CaCl₂ est tamponnée en osmolarité avec du sucrose et non plus du glucose afin de ne pas avoir trop de contraste en microscopie optique en contraste de phase (pour que l'intérieur des vésicules ne soit pas trop foncé).

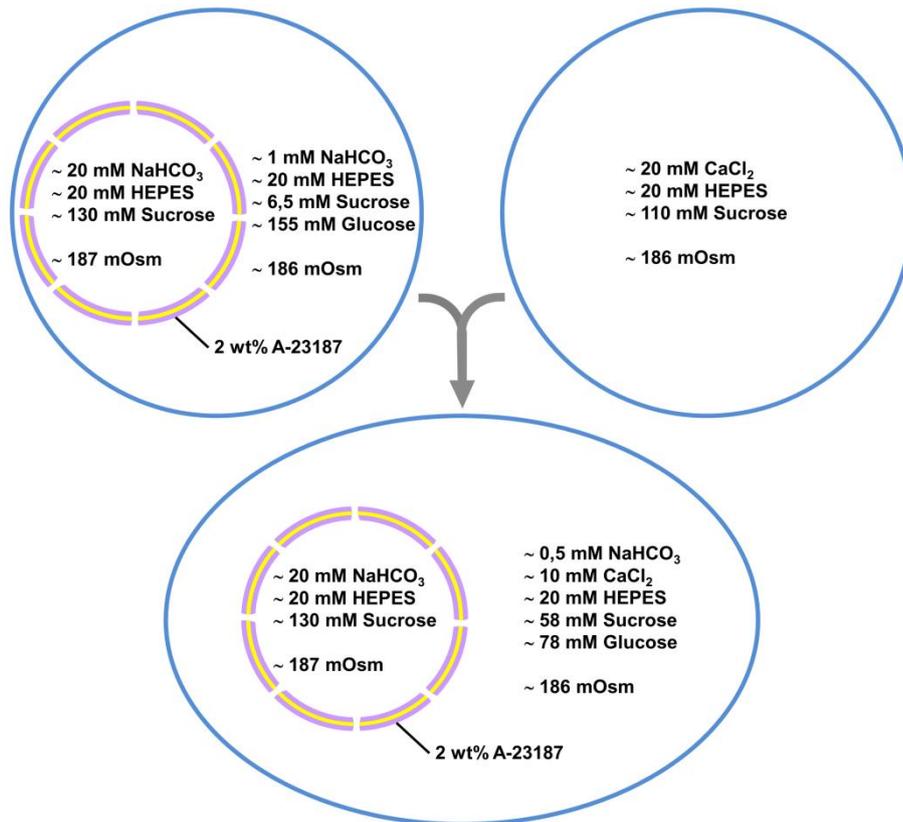


Figure 4.18. Schéma de principe d'une expérience de minéralisation dans laquelle la calcimycine (A-23187) est introduite dans la solution de vésicules au moment de leur formation.

Au cours des observations, de petits points noirs sont apparus dans les vésicules quelques minutes après avoir ajouté les ions calcium dans la phase extérieure (~ 7 min pour la vésicule figure 4.19.A). Malheureusement, ces points sont trop petits pour être vus sur la majorité des photographies. On les distingue dans la vésicule présentée figure 4.19.B, ils semblent se déplacer dans le milieu intravésiculaire.

De plus gros précipités de carbonate de calcium, qui semblent également être situés dans les vésicules, sont clairement identifiables à partir d'une heure et cinquante minutes après le mélange des deux solutions (figure 4.19.C). L'apparition de précipités présentant ces dimensions est bien plus longue que lors de l'expérience où l'A-23187 est directement ajoutée dans la solution extérieure, ce qui suggère que la cinétique de transfert du calcium est bien plus lente. L'observation de ces particules en lumière polarisée ne révèle pas de biréfringence, elles sont soit trop petites ou ce sont des précipités qui ne sont pas cristallins (amorphes).

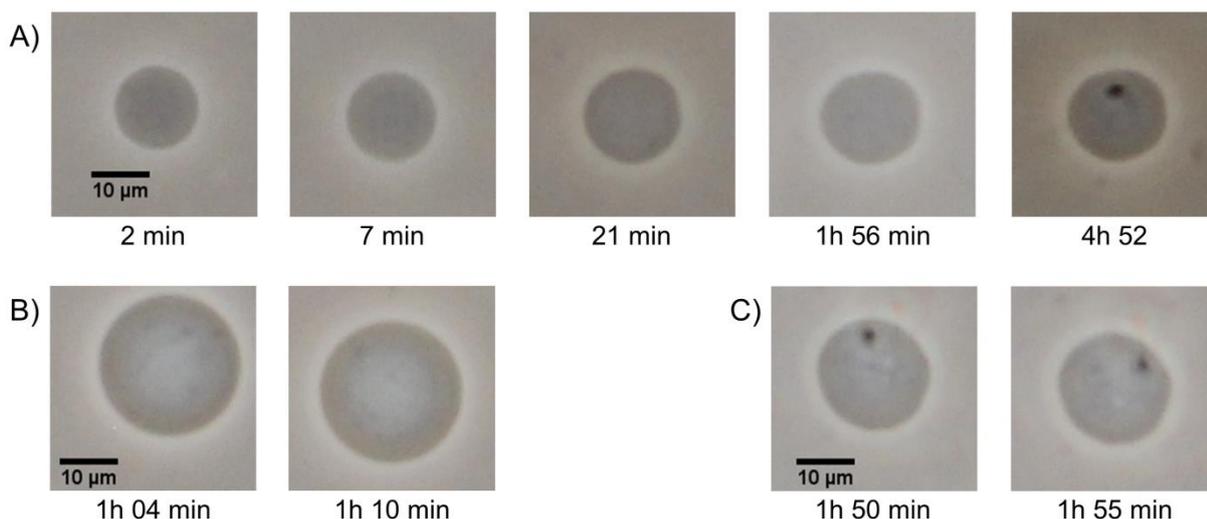


Figure 4.19. Suivi temporel de trois vésicules (A, B, et C). Le temps indiqué sous chaque image correspond au temps écoulé depuis le mélange des deux solutions.

La quantité de calcimycine utilisée pour la préparation de ces échantillons, lors de l'électroformation, est égale à $V_{\text{solution polymère}} \times C_{\text{m totale}} \times 2\text{wt}\% / M_{\text{n A-23187}} = 3,82 \cdot 10^{-9}$ mole. Il faut au moins 1 mL pour remplir la cellule d'électroformation donc en supposant que toute la calcimycine passe en solution, ce qui n'est probablement pas le cas car une grande majorité du film polymère / A-23187 reste sur les lames d'ITO, la concentration maximale en ionophore serait de 3,82 μM après la formation des vésicules. A cela s'ajoute la dilution d'un facteur 20 par une solution iso-osmolaire, afin de diminuer la concentration extravésiculaire en NaHCO_3 , ce qui fait également chuter la concentration maximale en A-23187 à 0,191 μM. Il apparaît donc logique que la cinétique de précipitation intravésiculaire observée soit plus lente que pour une expérience où la quantité totale d'ionophore dans le système est fixée à 1 μM. En effet, la concentration maximale, probablement largement surestimée, est au moins 5 fois plus faible.

Il faut toutefois être prudent car la majorité des vésicules a complètement sédimenté (sucrose dans le milieu intravésiculaire et glucose dans le milieu extravésiculaire) et se trouve en contact avec la lamelle du bas. Il est possible que cela induise des déformations de membrane, comme pour la vésicule figure 4.19.A qui n'est plus parfaitement sphérique après 21 minutes, et entraîne l'ouverture de pores. Cependant, la cinétique lente comparé à l'expérience décrite partie 4.3.3 et ce qui a été rapporté dans la littérature⁴ semble infirmer la formation de pores dans les membranes, qui auraient probablement conduit à une précipitation rapide. De plus, de nombreux petits points noirs étaient visibles dans les vésicules bien avant que celles-ci aient terminé de sédimenter.

Les vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ semblent donc naturellement très peu perméables aux ions carbonates et calcium, et l'utilisation d'un transporteur d'ions spécifique aux cations divalents, la calcimycine (A-23187), permet le passage des ions Ca²⁺ à travers la membrane hydrophobe. En revanche les cinétiques de précipitation, *i.e.* les moments à partir desquels des points noirs sont visibles au niveau des vésicules, sont plus lentes que celles qui ont été rapportées pour des expériences similaires réalisées avec des vésicules géantes de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ (pour 1 μM et 2wt.% de calcimycine).²¹ Cet effet est probablement lié à l'épaisseur de membrane, plus élevée pour le copolymère tribloc PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ que pour le PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂.

La cinétique de précipitation, qui dépend également de la quantité d'ionophore utilisée, semble influencer la localisation de la nucléation des précipités. L'ajout de la calcimycine à hauteur de 1 μM conduisait à des points noirs au niveau de la membrane des vésicules (figure 4.17) alors que pour une quantité de calcimycine plus faible on observe des précipités qui semblent se situer dans les vésicules (figure 4.19). Il n'a malheureusement pas été possible de caractériser la nature des précipités, par ATR-IR par exemple, car le nombre de vésicules en solution est très faible et le signal correspondant n'est pas suffisant pour mener l'analyse à bien.

4.4 Conclusion

Des vésicules hybrides PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / lipide ont été formées avec succès pour une large gamme de compositions molaires. La membrane de ces objets semble être stable et présenter une répartition statistique de ses composants à l'échelle micrométrique, que le lipide utilisé soit fluide à température ambiante (POPC) ou en phase gel (DPPC). Quand le composant lipidique est le DPPC, il semblerait que l'ajout de polymère modifie l'empilement des lipides d'une phase gel L_{β} vers une phase liquide-ordonnée L_o . L'ajout de copolymère tribloc dans les membranes fluides de POPC est plus favorable, la phase lipidique semble saturée en copolymère dès une fraction molaire de 40%.

La mobilité latérale du copolymère dans une membrane, reliée à sa masse molaire, est un paramètre important pour la formation de domaines. Le PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ ne semble pas avoir une mobilité latérale suffisante pour autoriser une séparation de phase spontanée, donc la formation de domaines à l'échelle micrométrique, et ce quelle que soit la fluidité de la phase lipidique (L_{β} , L_o et L_{α}). Cela est probablement lié à sa masse molaire, environ deux fois plus élevée que celle du PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ qui permet de former des membranes hétérogènes.

Les coefficients de perméabilité à l'eau des polymersomes et des vésicules hybrides 75% molaire copolymère / 25% molaire lipide ont pu être mesurés en appliquant des chocs hypotoniques en pièges microfluidiques. Les résultats ne montrent pas d'évolution de la perméabilité à l'eau des membranes liée à l'inclusion de lipides. Elle est limitée à celle de la matrice polymère au moins pour cette composition. La formation des domaines de lipide fluide, au moins à l'échelle nanométrique, apparaît donc comme étant nécessaire pour changer la perméabilité à l'eau des vésicules hybrides. Par ailleurs, il n'a pas été possible d'étudier des fractions molaires en lipide plus élevées avec le système de pièges hydrodynamiques. Des expériences de micropipette ou en solution seraient nécessaires pour confirmer ce résultat.

Finalement, les vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ ont été utilisées comme réacteur de minéralisation. Elles sont peu perméables aux ions carbonates et calcium, et des ionophores tels que la calcimycine (A-23187) peuvent assurer le transport des ions Ca²⁺ à travers la membrane malgré son épaisseur. De plus, il apparaît que la cinétique de précipitation intravésiculaire du CaCO₃ dépend de la quantité d'ionophore utilisée, au moins dans les faibles gammes de concentration (pas de formation de canaux membranaires).

4.5 Annexes

4.5.1 Hybrides PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / DPPC

Trois compositions distinctes ont été observées en microscopie optique pour les mélanges qui utilisent le DPPC comme lipide. Une composition à 75% molaire en copolymère conduit à des vésicules sphériques ayant un marquage de membrane homogène et une composition de 75% molaire en DPPC à des vésicules déformées également avec un marquage homogène (pour les vésicules hybrides). Les images suivantes confirment qu'un double marquage de membrane homogène est également obtenu pour une composition équimolaire 50% PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / 50% DPPC (figure 4.20).



Figure 4.20. Images de microscopie optique en épifluorescence d'une vésicule hybride 50% PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / 50% DPPC avec un double marquage de membrane. Le filtre « fluorescéine » est sensible au vert (PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂-Fluorescéine), le filtre « rhodamine » est sensible au rouge (Liss-Rhod PE) et le filtre double-bande permet d'observer la superposition des deux fluorescences.

Comme pour les vésicules dont le mélange initial contient une majorité de copolymère, les vésicules observées sont sphériques. La différence avec les vésicules froissées / facettées, obtenues pour une majorité de DPPC, est flagrante (figure 4.21).

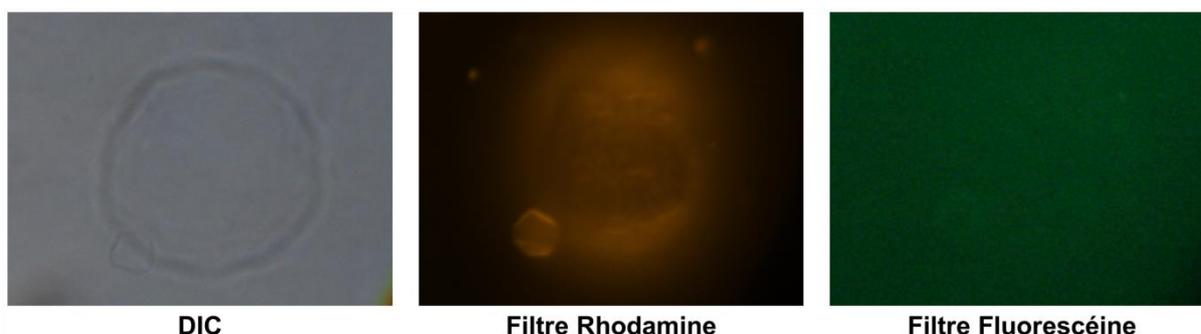


Figure 4.21. Images de microscopie optique en transmission et en épifluorescence d'une vésicule obtenue suite à l'électroformation avec un mélange 25% PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / 75% DPPC. Le filtre « fluorescéine » est sensible au vert (PDMS-*g*-PEO-Fluorescéine), le filtre « rhodamine » est sensible au rouge (Liss-Rhod PE).

Cette morphologie non-sphérique est due à la transition du DPPC d'une phase L_α quand $T > T_m$ vers une phase L_β' quand $T < T_m$. On ne voit pas la vésicule en utilisant un filtre sensible à la Fluorescéine, il n'y a donc pas le double marquage de membrane. Cela laisse penser que pour une majorité de DPPC dans la composition initiale du mélange on forme en réalité un mélange de vésicules hybrides homogènes (figure 4.2.B) et de liposomes (figure 4.21). Cela a déjà été observé lors de la formation de vésicules hybrides PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ / POPC, où une forte fraction en POPC conduit à la formation d'un mélange de vésicules hybrides et de liposomes.¹⁷²

4.5.2 Hybrides PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / POPC

Les trois compositions de vésicules hybrides utilisant le POPC comme composant lipidique observées en microscopie optique conduisent à la formation de membranes présentant une répartition apparente homogène des constituants. Les images présentées figure 4.22 complètent celles qui sont dans la partie 4.1.2.

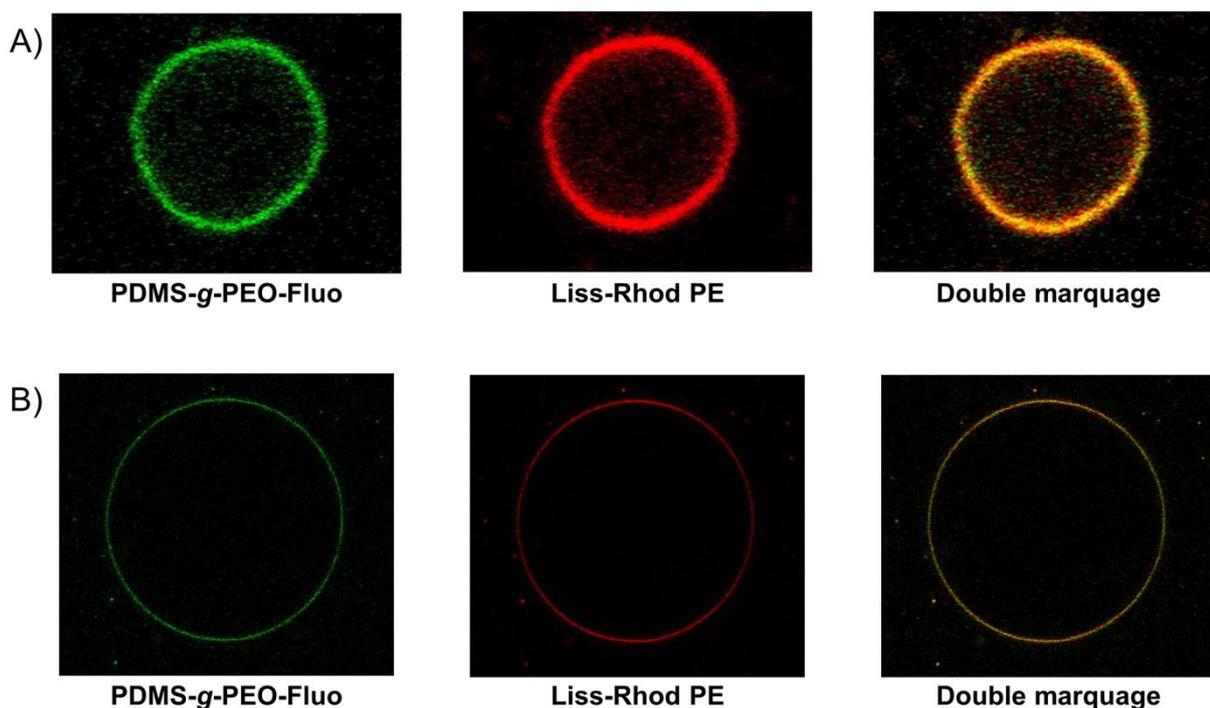


Figure 4.22. Images de microscopie confocale de vésicules hybrides avec un double marquage de membrane préparées à partir d'un mélange (A) 60% / 40 % et (B) 75% / 25% de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ / POPC.

Il apparaît clairement sur ces images que les deux fluorophores sont répartis dans l'ensemble de la membrane, on ne distingue pas de zone enrichie en copolymère ou en lipide.

4.5.3 Reconstruction volumique « 2D » vs. « 3D »

Il y a de nombreuses représentations possibles de l'évolution temporelle de la taille d'une vésicule. La figure 4.23 représente l'évolution de la taille du rayon de la vésicule de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ qui a permis de valider le protocole expérimental des mesures du coefficient de perméabilité à l'eau P_f . Ces résultats ont été obtenus *via* les deux méthodes de reconstructions utilisées au cours de ces travaux.

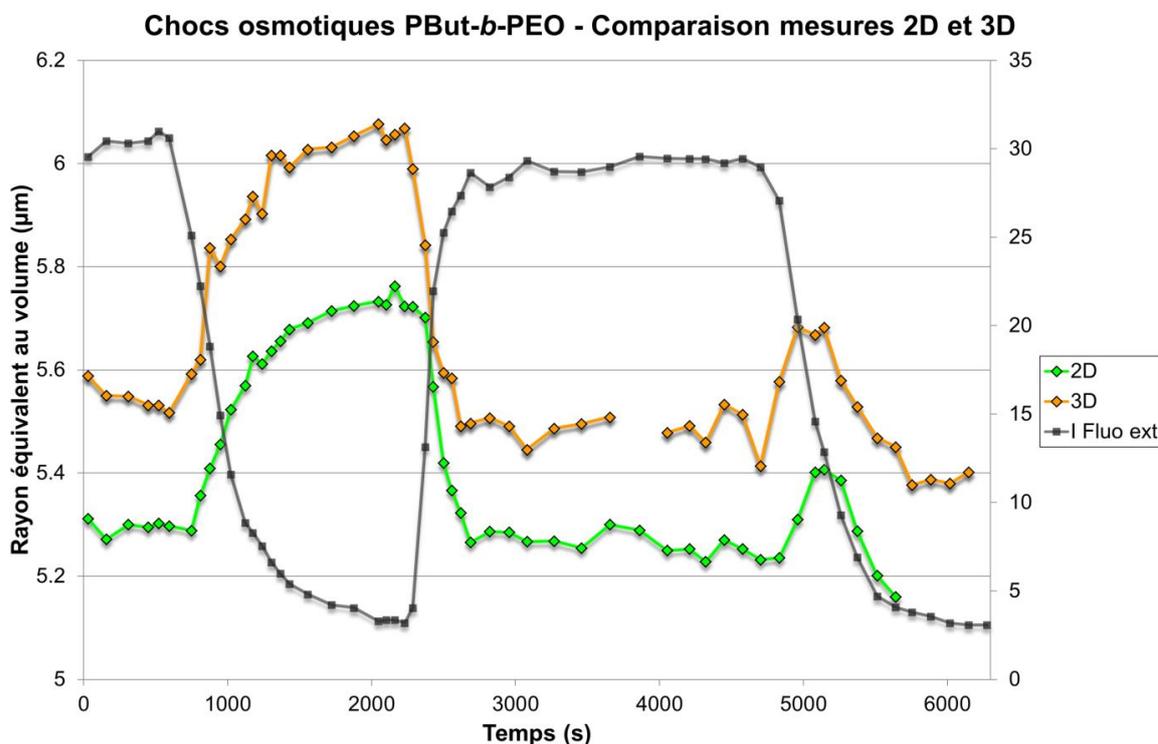


Figure 4.23. Evolution temporelle du rayon d'une vésicule de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ soumise à un choc hypotonique (100 mM → 75 mM), replacée dans une solution à 100 mM pour qu'elle retrouve sa taille initiale puis soumise à un choc hypertonique (100 mM → 125 mM). La courbe verte représente la valeur du rayon issue de l'aire maximale mesurée sur les sections optiques de chaque empilement (reconstruction « 2D ») et la courbe orange la valeur du rayon correspondant au volume calculé pour la vésicule (reconstruction « 3D »). La courbe noire représente l'intensité de fluorescence extracellulaire qui est maximale pour la solution de préparation des vésicules à 100 mM de sucrose.

Il apparaît clairement qu'il y a une différence de rayon entre les deux méthodes utilisées pour calculer le volume de la vésicule. Cet écart est dû à une difficulté supplémentaire qui intervient dans le cadre des reconstructions « 3D », car il est malaisé de déterminer précisément l'aire de la vésicule sur les sections optiques correspondant à ses extrémités inférieures et supérieures. En effet, la définition des contours sur ces sections optiques est mal définie à cause de l'intensité de fluorescence résiduelle provenant des sections optiques supérieures ou inférieures. Cela a tendance à augmenter la mesure de l'aire (intensité supplémentaire) et donc d'entraîner une surévaluation du volume de la vésicule.

4.5.4 Forces élastiques

Des forces élastiques s'appliquent sur la membrane d'une vésicule lors de son gonflement (voir partie 1.3.3.2) à cause de la tension de surface qui apparaît lors de l'étirement de la membrane. Celles-ci peuvent être estimées *via* la pression de Laplace $\Delta p = 2K_a\alpha(t)/R(t)$, avec K_a le module élastique de la membrane, $\alpha(t) = \Delta A(t)/A_0$ la déformation de la membrane et $R(t)$ le rayon de la vésicule. La proportion des forces élastiques par rapport à la pression osmotique dépend à la fois du rayon initial R_0 de la vésicule, du gradient de glucose appliqué et de son état de gonflement. A tout instant, la pression osmotique $\Delta\pi$ vérifie la relation :

$$\Delta\pi(t) = RT\Delta c(t) = RT \left(c^{ext} - c_0^{int} \frac{V_0^{vésicule}}{V^{vésicule}(t)} \right) \quad (4.5)$$

avec $R = 0,08206$ atm.L/mol/K la constante des gaz parfaits et T la température (K).

Pour une vésicule sphérique, on peut alors écrire :

$$\Delta\pi(t) = RT \left(c^{ext} - c_0^{int} \frac{R_0^3}{R(t)^3} \right) \quad (4.6)$$

A un instant t correspondant à une déformation de la surface $\alpha(t)$, la valeur du rayon est :

$$R(t) = \sqrt{R_0^2(\alpha(t) + 1)} \quad (4.7)$$

La valeur de la pression osmotique est donc :

$$\Delta\pi(t) = RT \left(c^{ext} - c_0^{int} \frac{R_0^3}{\left(\sqrt{R_0^2(\alpha(t) + 1)}\right)^3} \right) \quad (4.8)$$

Dans le même temps, les forces élastiques qui s'appliquent sur une vésicule pour un gonflement caractérisé par $\alpha(t)$ sont (voir partie 1.3.3.2) :

$$\Delta p(t) = \frac{2K_a\alpha(t)}{R(t)} = \frac{2K_a\alpha(t)}{\sqrt{R_0^2(\alpha(t) + 1)}} \quad (4.9)$$

Le rapport Equation 4.9 / Equation 4.8 permet d'estimer la proportion des forces élastiques qui s'appliquent sur une vésicule pour un gonflement caractérisé par une déformation de la surface $\alpha(t)$. Si on considère un diamètre initial de 11 μm , une déformation de la surface $\alpha = 10\%$, un choc hypotonique initialement de 25 mM ($c_{int} = 100$ mM et $c_{ext} = 75$ mM, ce qui a été utilisé au long de ce chapitre) et un module élastique $K_a \sim 0,1$ N/m,⁶ la proportion des forces élastiques par rapport à la pression osmotique est déjà de 12%.

4.5.5 Calcul de la perméabilité avec les forces élastiques

L'équation utilisée pour le calcul du coefficient de perméabilité à l'eau en tenant compte des forces élastiques est obtenue à partir de l'équation 1.27 (décrite dans la partie 1.3.4.4) :

$$\frac{dR}{dt} = -\frac{P_f v_w}{RT} \left(RT \Delta c(t) + \frac{2K_a \alpha(t)}{R(t)} \right) \quad (4.10)$$

avec $RT\Delta c$ le terme de pression osmotique et $2K_a\alpha(t)/R(t)$ le terme élastique, P_f le coefficient de perméabilité à l'eau, v_w le volume molaire de l'eau, R la constante des gaz parfaits, T la température, K_a le module élastique, $\alpha(t)$ la déformation de la membrane et $R(t)$ le rayon de la vésicule. La vésicule étant supposée sphérique, il est possible d'écrire :

$$\frac{dR}{dt} = -\frac{P_f v_w}{RT} \left(RT \left(c^{ext} - c_0^{int} \frac{R_0^3}{R(t)^3} \right) + \frac{2K_a}{R_0} \left(\frac{R(t)}{R_0} - \frac{R_0}{R(t)} \right) \right) \quad (4.11)$$

avec $\Delta c(t) = c^{ext} - c_0^{int} \frac{R_0^3}{R(t)^3}$. De plus, si on définit $\varepsilon = \frac{R(t)-R_0}{R_0}$ il est possible d'écrire :

$$\frac{dR}{dt} = -\frac{P_f v_w}{RT} \left(RT \left(c^{ext} - \frac{c_0^{int}}{(1+\varepsilon)^3} \right) + \frac{2K_a}{R_0} \left((1+\varepsilon) - \frac{1}{(1+\varepsilon)} \right) \right) \quad (4.12)$$

En faisant un développement de Taylor à l'ordre 1 $\left(\frac{1}{(1+\varepsilon)^3} = 1 - 3\varepsilon; (1+\varepsilon) - \frac{1}{(1+\varepsilon)} = 2\varepsilon \right)$ cela amène à :

$$\frac{dR}{dt} = -\frac{P_f v_w}{RT} \left(RT(\Delta c_0 - 3\varepsilon c_0^{int}) + \frac{4K_a \varepsilon}{R_0} \right) \quad (4.13)$$

L'intégration de cette équation conduit au résultat final :

$$R(t) = R_0[(1+A) - A \exp(-kt)] \quad (4.4)$$

avec $A = \frac{c_0^{int} - c_0^{ext}}{3c_0^{int} + \frac{4K_a}{RTR_0}}$ et $k = -\frac{P_f}{R_0} \left(3c_0^{int} + \frac{4K_a}{RTR_0} \right)$.

4.5.6 Défauts de préparation des vésicules

Il y a principalement deux sortes de défauts liés à la préparation des vésicules qui perturbent les mesures du coefficient de perméabilité quand on utilise des chocs osmotiques. Le premier est la présence de vésicules multilamellaires (ou présentant une invagination) dans l'échantillon. En effet, il faut que les vésicules dont on suit l'évolution temporelle du rayon soient unilamellaires sinon la valeur du coefficient de perméabilité déterminée sera sous-évaluée à cause des multiples couches hydrophobes. Bien que l'électroformation ne permette pas la formation de GUV uniquement, il est souvent possible de distinguer les vésicules multilamellaires grâce aux fluorophores (figure 4.24.A).

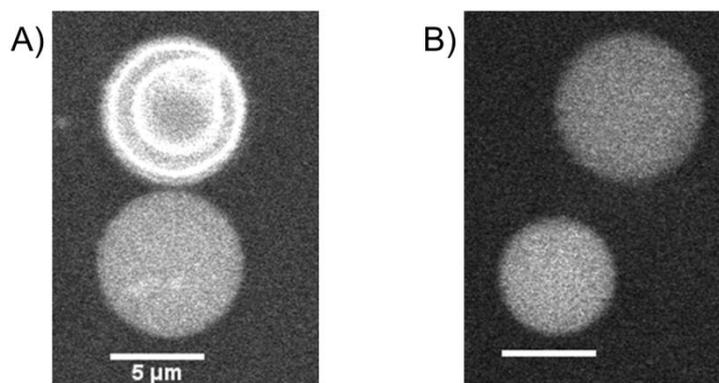


Figure 4.24. A) Vésicule de $\text{PEO}_{17}\text{-}b\text{-PDMS}_{66}\text{-}b\text{-PEO}_{17}$ multilamellaire (située en haut de l'image) retenue dans un piège hydrodynamique. B) Deux vésicules de $\text{PEO}_{17}\text{-}b\text{-PDMS}_{66}\text{-}b\text{-PEO}_{17}$ piégées au même moment mais présentant une fluorescence intravésiculaire différente.

Le second phénomène qui peut compliquer les mesures du coefficient de perméabilité à l'eau P_f est l'inhomogénéité de la concentration en soluté encapsulée dans les vésicules lors de leur formation (figure 4.24.B). Cela peut être le cas pour la concentration en fluorophore, qui sert uniquement à visualiser le volume de la vésicule, mais également pour la concentration en glucose. Ce cas de figure est gênant car le gradient de concentration en glucose appliqué lors des chocs osmotiques, nécessaire pour déterminer le coefficient de perméabilité à l'eau des membranes, n'est alors plus précisément connu.

4.5.7 Perméabilité aux espèces ioniques – expérience qualitative

L'expérience suivante consiste à ajouter des ions calcium dans une solution de vésicules encapsulant des ions carbonates. Comme il n'y a pas de calcimycine ajoutée dans le milieu extravésiculaire en même temps que les ions calcium, on ne devrait pas observer de précipitation intravésiculaire si les vésicules sont imperméables aux espèces ioniques.

Les vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ ont été préparées par électroformation selon le protocole décrit dans la partie 3.3.2, avec une durée de formation de 21h30. La solution utilisée pendant la formation, encapsulée dans les vésicules, contient 20 mM de NaHCO₃, 20 mM d'HEPES et du sucrose, pour une osmolarité totale de 195 mOsm. La solution de vésicules a ensuite été diluée d'un facteur 20 par une solution iso-osmolaire contenant 20 mM d'HEPES et du glucose afin de diminuer la concentration extravésiculaire en ions carbonates.

Finalement, une goutte de cette solution (20 µL) est mélangée à une goutte d'une solution iso-osmolaire contenant 20 mM de CaCl₂, 20 mM d'HEPES et du glucose. Ce mélange est préparé entre deux lamelles de verre recouvertes d'une couche de PDMS, et les observations sont réalisées au microscope droit en contraste de phase (figure 4.25).

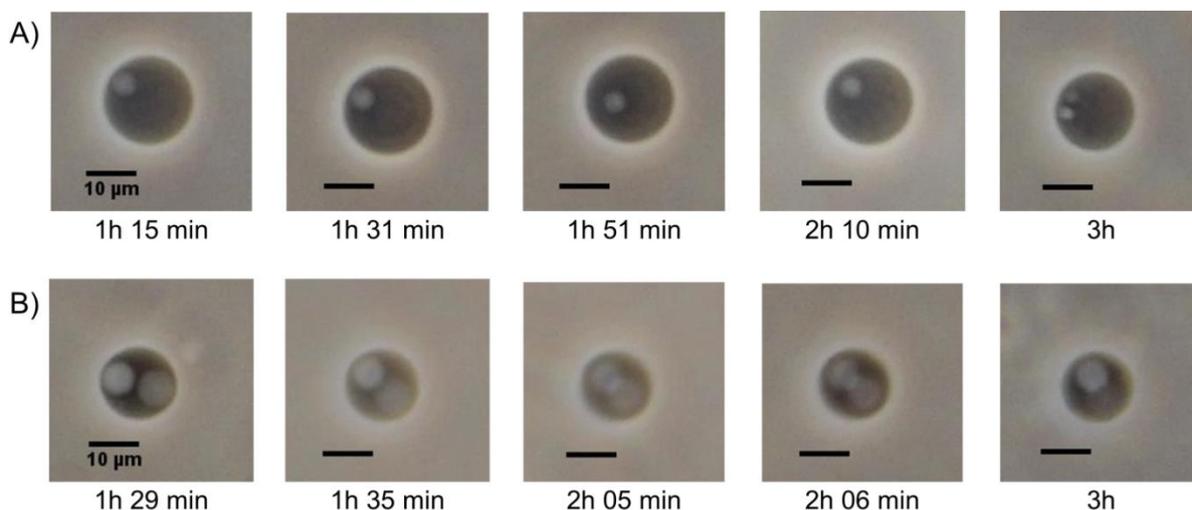


Figure 4.25. Suivi de deux vésicules encapsulant 20 mM NaHCO₃ placées dans une solution contenant 10 mM de CaCl₂. L'observation est faite au microscope droit en contraste de phase avec un grossissement $\times 20$.

Sur ces images, les vésicules sont foncées sur un fond clair à cause de la différence de contraste qu'il y a entre le sucrose (intravésiculaire) et le glucose (extravésiculaire). On ne voit pas apparaître de points noirs dans les vésicules ou au niveau des membranes, comme cela a été observé quand l'ionophore A-23187 est ajouté dans la solution extravésiculaire. Cela signifie que sur la durée de l'expérience on n'observe pas de précipitation intra et / ou extravésiculaire liée à la perméation d'ions calcium ou carbonates respectivement.

4.5.8 Incorporation de calcimycine dans les membranes

Cette expérience vise à vérifier que la formation de points noirs dans la membrane des vésicules, lors d'une expérience de minéralisation dans laquelle l'ionophore est ajouté dans la solution extravésiculaire, ne résulte pas l'agrégation d'A-23187. En effet, il a été montré que la calcimycine peut s'agréger dans des membranes hydrophobes,²³⁵ ce qui dans notre cas pourrait se traduire par l'apparition de points noirs comme observé en microscopie optique.

Des vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ ont été préparées par électroformation dans une solution contenant 163 mM de glucose et 20 mM d'HEPES. 40 μ L de cette solution de vésicule ont ensuite été mélangés à un volume équivalent d'une solution contenant 163 mM de glucose, 20 mM d'HEPES et 2 μ M de calcimycine (concentration finale de 1 μ M). Les observations sont faites au microscope droit en contraste de phase (figure 4.26).

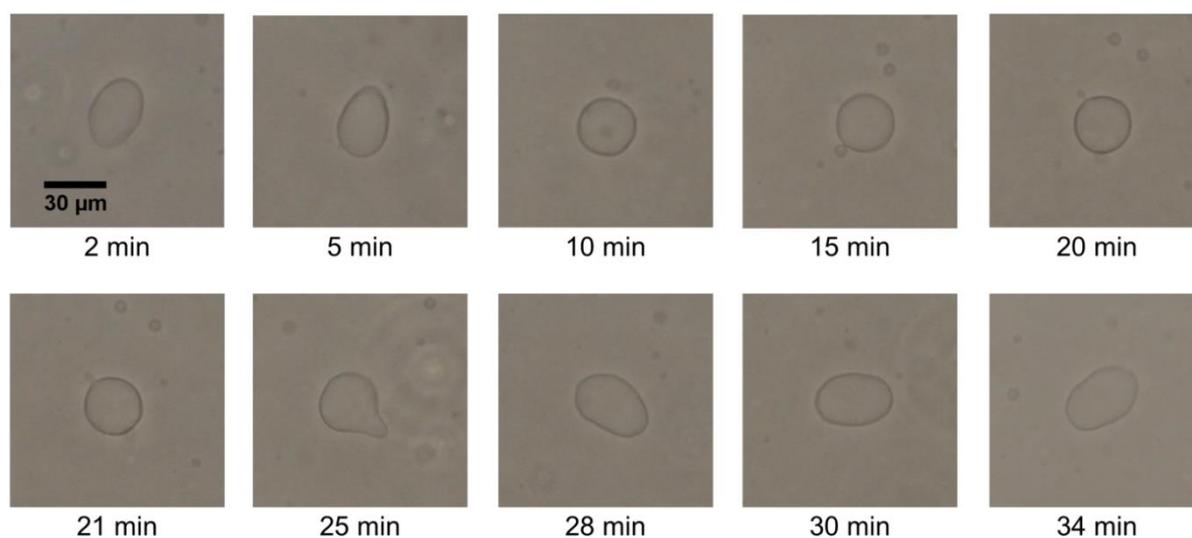


Figure 4.26. Suivi temporel d'une vésicule géante suite à l'ajout de 1 μ M de calcimycine dans la solution extérieure.

Le seul phénomène observé lors du suivi temporel est une légère déformation des vésicules, probablement dû à l'ajout de DMSO dans la phase extérieure. En effet, la calcimycine est issue d'une solution stock dans le DMSO, qui n'a pas été pris en compte pour le calcul de l'osmolarité totale de la solution *via* laquelle l'ionophore est ajouté. Il en résulte un léger choc hypertonique qui entraîne un dégonflement partiel de la vésicule.

La formation de points noirs dans les membranes, comme lors d'expériences mettant en contact une solution de vésicules encapsulant des ions carbonates et une solution contenant des ions Ca²⁺ et de la calcimycine, n'a pas été observée. Cela semble confirmer que les points noirs observés lors des expériences de minéralisation sont des précipités de carbonate de calcium CaCO₃, et que c'est bien la présence d'ionophore qui déclenche la précipitation intravésiculaire en transportant les ions Ca²⁺ à travers la membrane des vésicules.

Chapitre 5 :

**Nano-polymersomes en conditions de choc
osmotique : déformations membranaires et
évolution de la forme**

5 Nano-polymersomes en conditions de choc osmotique : déformations membranaires et évolution de la forme

Sommaire Chapitre 5

| | | |
|---------|---|-----|
| 5.1 | Etude du comportement par diffusion dynamique de la lumière..... | 170 |
| 5.2 | Vésicules de PDMS ₂₂ - <i>g</i> -PEO ₁₂ | 172 |
| 5.2.1 | Cryo-TEM | 172 |
| 5.2.2 | DNPA | 174 |
| 5.2.2.1 | Conditions isotoniques | 175 |
| 5.2.2.2 | Conditions hypertoniques..... | 177 |
| 5.3 | Vésicules de PEO ₁₇ - <i>b</i> -PDMS ₆₆ - <i>b</i> -PEO ₁₇ | 180 |
| 5.3.1 | Cryo-TEM | 180 |
| 5.3.2 | DNPA | 182 |
| 5.4 | Vésicules de PBut ₄₆ - <i>b</i> -PEO ₃₀ | 184 |
| 5.5 | Evolution des morphologies | 187 |
| 5.5.1 | Accord avec les modèles théoriques..... | 187 |
| 5.5.2 | Limite des modèles théoriques | 189 |
| 5.5.2.1 | Epaisseur de la membrane..... | 190 |
| 5.5.2.2 | Nature de la membrane | 193 |
| 5.5.3 | Autres effets..... | 194 |
| 5.5.3.1 | Disparitions des micelles allongées | 194 |
| 5.5.3.2 | Polymersomes bilamellaires déformés..... | 195 |
| 5.6 | Conclusion | 196 |
| 5.7 | Annexes | 197 |
| 5.7.1 | Viscosité des solutions de glucose | 197 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 5.7.2 | DNPA : choc hypotonique | 198 |
| 5.7.3 | PDMS ₂₂ - <i>g</i> -PEO ₁₂ : images de cryo-TEM supplémentaires | 199 |
| 5.7.4 | Complémentarité cryo-TEM / DNPA | 200 |
| 5.7.5 | Polydispersité en forme équivalente à polydispersité sur le rayon | 202 |
| 5.7.6 | PEO ₁₇ - <i>b</i> -PDMS ₃₉ - <i>b</i> -PEO ₁₇ | 204 |

Les vésicules polymères sont des objets de plus en plus étudiés dans les domaines des sciences du vivant. En effet, ces structures présentent une bonne tenue mécanique, peuvent être biocompatibles et encapsuler des substances hydrophiles et hydrophobes, ce qui en fait des vecteurs adéquats pour les applications de libération de principes actifs.⁵ Les paramètres physico-chimiques de ces vecteurs médicamenteux ont une forte influence sur leur efficacité en tant que système de transport. La taille et la chimie de surface sont les plus étudiés,^{109, 110} mais la forme des particules impacte elle aussi leurs performances. Le comportement de particules anisotropes dévie de celui de particules sphériques à de multiples niveaux tels que le transport dans le système sanguin,¹¹¹ l'adhésion cellulaire¹¹² et leur internalisation.¹¹⁴ Les résultats montrent que les particules prolates ont une adhésion sur les cellules environ quatre fois plus élevée que les particules sphériques et que les morphologies oblates sont au moins deux fois mieux phagocytées. Il est donc important, si l'on souhaite utiliser des polymersomes en tant que vecteurs pour des applications thérapeutiques, de maîtriser leurs formes pour optimiser leurs performances.

La membrane des polymersomes étant par nature peu perméable,⁶ ils peuvent être soumis à des déséquilibres osmotiques une fois injectés en conditions physiologiques. Cela entraîne l'apparition d'une pression osmotique isotrope sur l'ensemble des vésicules, qui vont alors ajuster leurs volumes internes par transfert d'eau pour retourner à l'équilibre.³⁶ Ces variations de volume interne s'accompagnent de changements de forme, c'est ce qui est observé quand des vésicules sont soumises à des chocs osmotiques afin de mesurer la perméabilité à l'eau de leur membrane (voir partie 1.3.5). Pour prévoir et maîtriser les changements de forme des polymersomes en de telles conditions, il faut comprendre quels sont les paramètres qui contrôlent ces changements de morphologie.

Dans ce contexte, nous avons étudié les changements de formes induits par des chocs osmotiques sur des nano-vésicules formées avec des polymères de différentes architectures – greffés, diblocs et triblocs – et différentes natures de bloc hydrophobe – PDMS et PBut. Les blocs hydrophobes choisis ont une température de transition vitreuse T_g basse ($T_{g \text{ PDMS}} \sim -129^\circ\text{C}$ et $T_{g \text{ PBut}} \sim -31^\circ\text{C}$) afin de permettre la formation de membranes fluides à température ambiante.

Une partie des résultats présentés dans ce chapitre a été publiée dans une revue à comité de lecture.²³⁶

5.1 Etude du comportement par diffusion dynamique de la lumière

Cette technique de caractérisation a permis d'avoir une vue d'ensemble du comportement des nano-polymersomes en suivant leurs changements de taille apparente en condition de déséquilibre osmotique (figure 5.1).

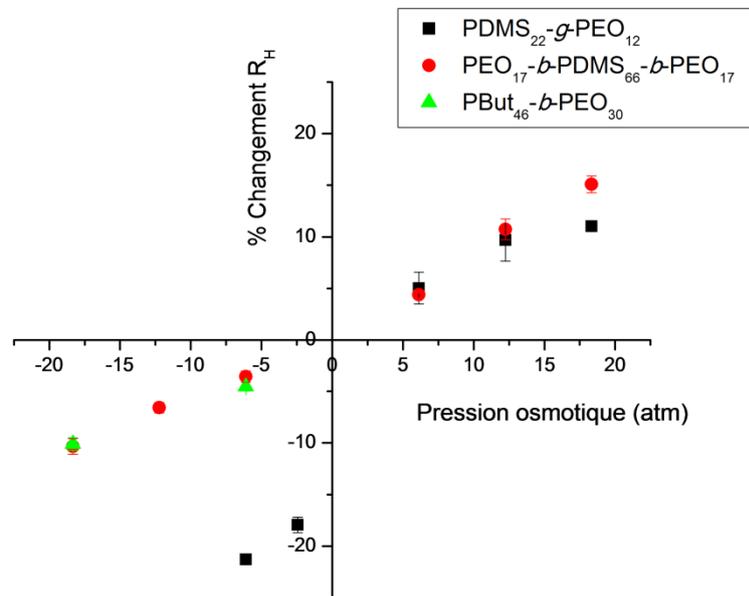


Figure 5.1. Evolution du rayon hydrodynamique R_H des vésicules en fonction de la pression osmotique appliquée. Le % de changement correspond au changement relatif $(R_H - R_0)/R_0$.

Les échantillons de vésicules ont été préparés à 10 mg/mL en utilisant les protocoles décrits dans la partie 3.3.2.2 et ont été dilués à 1 mg/mL pour les mesures des rayons hydrodynamiques. Seules les solutions isotoniques (eau MilliQ pour les chocs hypertoniques et solution 1M de glucose pour les chocs hypotoniques) ont été utilisées pour faire les dilutions avant les mesures des rayons hydrodynamiques initiaux R_0 . Pour les différents chocs osmotiques, les deux solutions de dilution ont été utilisées pour obtenir la concentration extravésiculaire en soluté souhaitée et une concentration finale en copolymère de 1 mg/mL. Les mesures des rayons hydrodynamiques R_H ont été faites une heure après avoir ajusté la concentration extravésiculaire en glucose (tableau 5.1). Toutes les fractions des lots de vésicules utilisées pour les chocs osmotiques ont été soumises à un seul changement de phase externe (pas de chocs osmotiques consécutifs) et les valeurs de viscosité des solutions aqueuses à différentes concentrations en glucose utilisées pour déterminer les rayons hydrodynamiques sont indiquées en annexe 5.7.1.

| Choc | Hypertonique | | | | Isotonique | Hypotonique | | |
|--|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Δc (mM) | -750 | -500 | -250 | -100 | 0 | 250 | 500 | 750 |
| $\Delta \Pi$ (atm) | -18,34 | -12,23 | -6,11 | -2,45 | 0 | 6,11 | 12,23 | 18,34 |
| Polymère | Rayon Hydrodynamique R_H (nm) et indice de polydispersité | | | | | | | |
| PDMS _{22-g} -PEO ₁₂ | - | - | 42,8 ± 0,1 (0,06) | 44,6 ± 0,4 (0,09) | 54,4 ± 0,5 (0,05) | - | - | - |
| | - | - | - | - | 44,6 ± 0,5 (0,04) | 46,8 ± 0,7 (0,03) | 48,9 ± 0,9 (0,03) | 49,5 ± 0,2 (0,03) |
| PEO _{17-b} -PDMS _{66-b} -PEO ₁₇ | 44,2 ± 0,4 (0,06) | 46,1 ± 0,3 (0,06) | 47,6 ± 0,3 (0,06) | - | 49,3 ± 0,3 (0,05) | - | - | - |
| | - | - | - | - | 50,3 ± 0,6 (0,14) | 52,5 ± 0,2 (0,11) | 55,7 ± 0,5 (0,14) | 57,9 ± 0,4 (0,12) |
| PBut _{46-b} -PEO ₃₀ | 54,5 ± 0,4 (0,07) | - | 57,8 ± 0,1 (0,05) | - | 60,6 ± 0,4 (0,05) | - | - | - |

Tableau 5.1. Rayons hydrodynamiques et indices de polydispersité mesurés pour les différentes conditions de choc osmotique.

La figure 5.1 montre que le comportement général des polymersomes à l'échelle nanométrique est similaire à celui des vésicules géantes³⁶ : une contraction en conditions hypertoniques et un gonflement en conditions hypotoniques car la différence d'osmolarité entre les milieux intra et extravésiculaires est compensée par le transfert d'eau au travers de la membrane. Les vésicules formées avec le PDMS_{22-g}-PEO₁₂, qui ont une membrane fine et fluide,¹⁸⁸ se comportent différemment des autres systèmes. La diminution de taille en conditions hypertoniques est bien plus prononcée (-21,3%) alors que les pressions osmotiques appliquées sont plus faibles que pour les vésicules formées avec les deux autres copolymères. De plus, le gonflement maximal observé en conditions hypotoniques est inférieur à celui mesuré pour les vésicules de PEO_{17-b}-PDMS_{66-b}-PEO₁₇. Cela peut s'expliquer par une plus petite déformation maximale à la rupture, $\alpha_c = \Delta A_c/A_0 \sim 23\%$ pour le choc hypotonique sur les vésicules de PDMS_{22-g}-PEO₁₂ avec $\Delta c = 750$ mM, que pour les vésicules de tribloc. En effet, il a été montré que cette limite augmente avec la masse molaire de l'amphiphile.⁶⁵

Le gonflement observé en conditions hypotoniques ne conduit pas une réorganisation de la membrane ou de la morphologie des vésicules (voir annexe 5.7.2). En revanche, les contractions observées en conditions hypertoniques impliquent nécessairement l'apparition d'un excès de surface. La réorganisation de la membrane et les changements de forme ne pouvant pas être déterminés par diffusion dynamique de la lumière, l'étude du comportement des nano-polymersomes en conditions hypertoniques a été menée par cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM) et diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA). Par souci de clarté, les résultats obtenus sont détaillés par la suite en fonction des différents systèmes avant de discuter des phénomènes mis en jeu lors des changements de morphologie.

5.2 Vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂

5.2.1 Cryo-TEM

Cette technique permet d'imager les vésicules avant et après changement *in situ* afin de déterminer les différentes morphologies présentes dans le système.

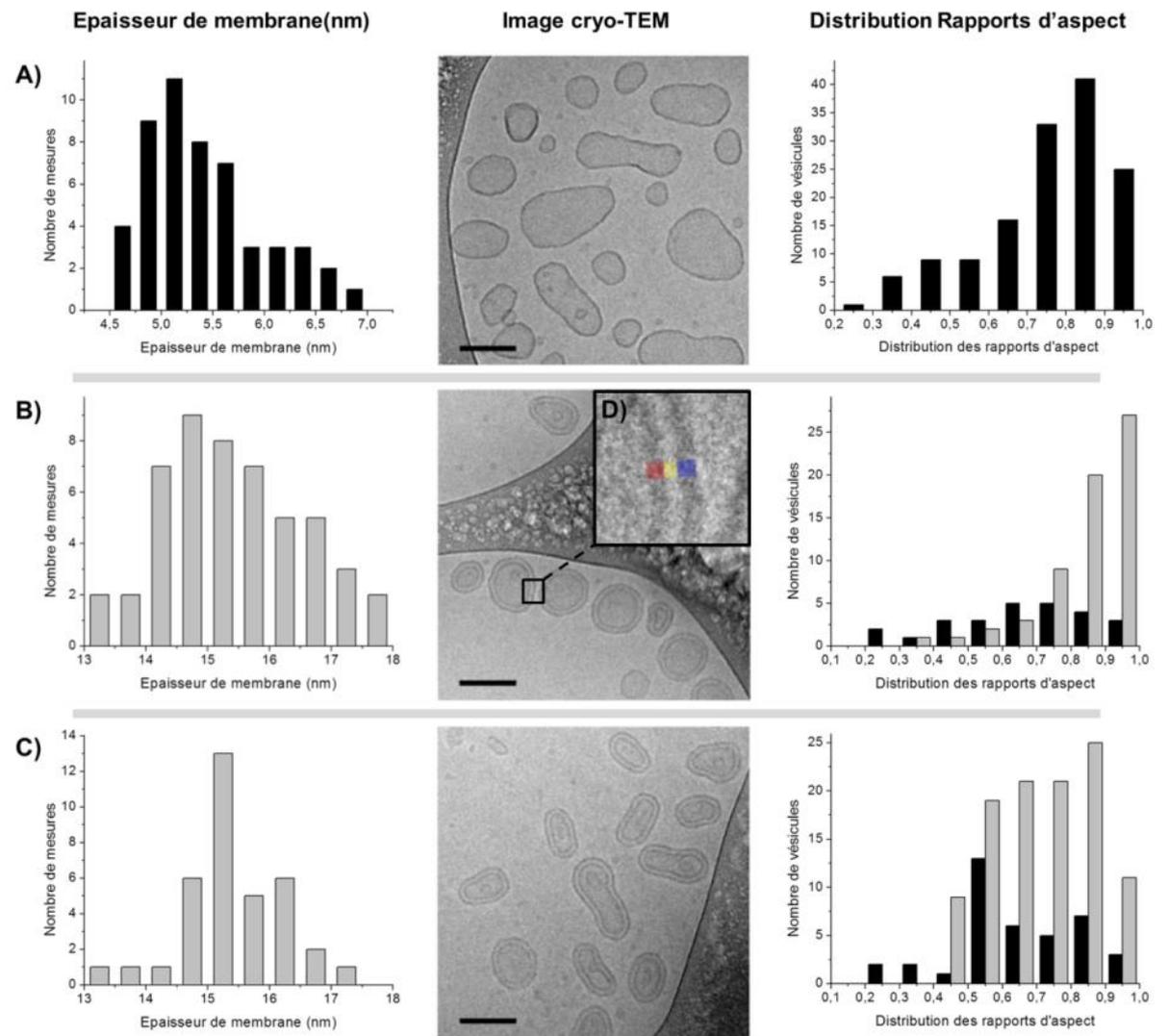


Figure 5.2. Epaisseurs de membrane, images de cryo-TEM et distributions des rapports d'aspect pour les vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ sous différentes conditions d'osmolarité. Les vésicules, remplies d'eau, étaient initialement dans (A) un milieu isotonique, puis ont été soumises à un choc hypertonique de (B) 100 mM ou (C) 250 mM. Pour tous les diagrammes, les colonnes noires correspondent aux vésicules unilamellaires et les colonnes grises aux vésicules bilamellaires. Les barres d'échelle représentent 100 nm. L'insertion (D) est un grossissement de la membrane d'une vésicule bilamellaire. La zone rouge correspond à la couche interne de la membrane d'épaisseur δ_i , la zone bleue à la couche externe de la membrane d'épaisseur δ_e , et la zone jaune à la distance entre les deux couches D_w .

La figure 5.2.A montre une image de cryo-TEM caractéristique des vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ en conditions isotoniques. Des images de cryo-TEM supplémentaires sont

disponibles en annexe 5.7.3 pour que le lecteur puisse avoir plusieurs images complètes illustrant l'évolution de la forme des vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ au cours des chocs hypertoniques. Les vésicules présentent clairement une polydispersité non seulement en taille mais également en forme. Cela est confirmé par la distribution des rapports d'aspect qui indique que de nombreuses vésicules sont anisotropes. Les rapports d'aspect ont été déterminés en ajustant la forme de chaque vésicule à une ellipse avec le logiciel ImageJ et définis comme étant les rapports entre les demi-petits axes et les demi-grands axes de chaque ellipse. La polydispersité en forme est vraisemblablement liée à l'étape d'extrusion des vésicules, comme déjà observé pour des vésicules lipidiques.¹¹⁸ En passant à travers les membranes du mini-extrudeur, les vésicules plus grosses que les pores sont déformées et peuvent se rompre. Une fois de l'autre côté, elles se referment mais peuvent garder une forme anisotrope liée à un excès de surface par rapport à leur volume interne.

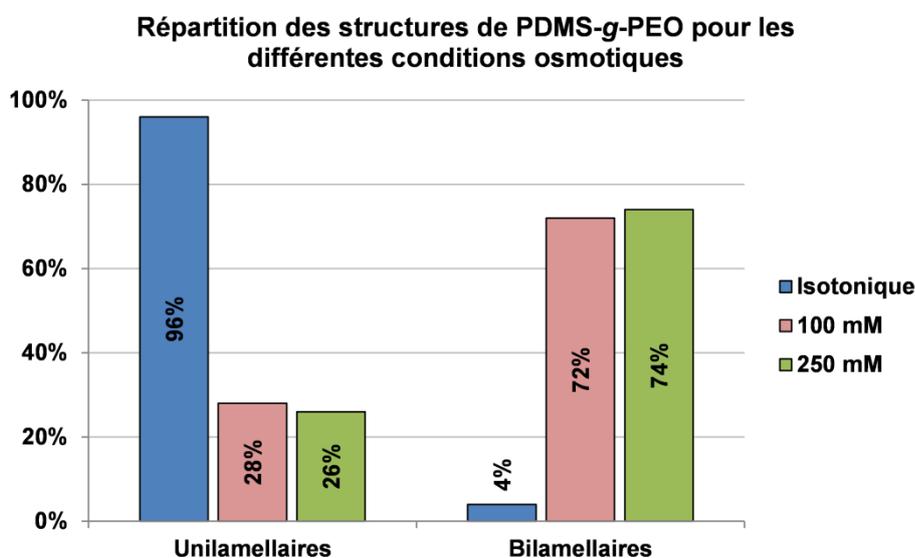


Figure 5.3. Evolution de la répartition des structures formées avec le PDMS₂₂-g-PEO₁₂ suite aux chocs hypertoniques.

Une étude statistique sur les images de cryo-TEM, présentée figure 5.3, indique que plus de 96 % des vésicules sont unilamellaires en conditions isotoniques. En accord avec la valeur indiquée dans la littérature,¹⁸⁸ leur épaisseur de membrane moyenne est $\delta = 5,4 \pm 0,6$ nm (50 mesures).

Les figures 5.2.B et 5.2.C montrent que suite aux différents chocs hypertoniques la majorité des vésicules présentent maintenant une membrane bilamellaire. Les deux couches de la membrane pouvant facilement être distinguées l'une de l'autre sur les images de cryo-TEM, plusieurs mesures d'épaisseur ont été réalisées (tableau 5.2).

| Δc | Membrane | δ_e (nm) | δ_i (nm) | D_w (nm) | δ_{tot} (nm) | Nb mesures |
|------------|---------------|-----------------|-----------------|---------------|---------------------|------------|
| 0 mM | Unilamellaire | - | - | - | $5,4 \pm 0,6$ | 50 |
| 100 mM | Bilamellaire | $6,1 \pm 0,6$ | $5,6 \pm 0,6$ | $3,6 \pm 0,9$ | $15,5 \pm 1,1$ | 50 |
| 250 mM | Bilamellaire | $6,0 \pm 0,7$ | $5,9 \pm 0,6$ | $3,5 \pm 0,7$ | $15,4 \pm 1,1$ | 38 |

Tableau 5.2. Ensemble des mesures d'épaisseur de membrane faites sur les images de cryo-TEM. L'épaisseur de membrane totale des vésicules bilamellaires est la somme de l'épaisseur de chaque couche de polymère et de la distance entre elles : $\delta_{tot} = \delta_i + D_w + \delta_e$.

Les différentes épaisseurs de membrane des vésicules bilamellaires, *i.e.* les deux couches de polymère et la couche d'eau entre elles, sont identiques quel que soit le choc appliqué. On remarque aussi que chaque couche de polymère composant les membranes bilamellaires a une épaisseur similaire à celle mesurée sur les vésicules en conditions isotoniques. La répartition des structures en figure 5.3 indique que la proportion de vésicules bilamellaires est également similaire pour les deux chocs hypertoniques et représentent environ les trois quarts du total d'objets. Le quart restant correspond à des vésicules qui sont restées unilamellaires. Ces dernières semblent petites par comparaison aux vésicules bilamellaires et sont souvent étirées, ce que confirment les distributions de rapport d'aspect (figures 5.2.B et 5.2.C).

La principale différence entre les deux chocs hypertoniques est que pour le choc à 100 mM les vésicules bilamellaires sont majoritairement sphériques alors que pour le choc à 250 mM elles sont plus étirées.

Le fait d'observer des structures bilamellaires suite aux chocs hypertoniques est en accord avec les résultats de DLS qui montrent une diminution importante du rayon hydrodynamique dès les faibles pressions osmotiques. En effet, en tenant compte de ce changement de forme il est possible de recalculer le diamètre extérieur moyen des vésicules qui sont devenues bilamellaires et le comparer aux mesures des rayons hydrodynamiques par DLS. Pour un rayon hydrodynamique initial R_0 de 54 nm (mesuré en DLS), une épaisseur de membrane de 5,5 nm et un écart entre les deux couches de polymère de 3,5 nm après la transformation en vésicule bilamellaire la diminution du rayon extérieur serait de 21,5%. Cette valeur, calculée simplement à partir de considérations géométriques, est parfaitement comparable aux diminutions du rayon hydrodynamique mesurées en DLS suite aux chocs hypertoniques : 17,9% et 21,3% pour les chocs à 100 mM et 250 mM respectivement.

5.2.2 DNPA

Cette deuxième technique permet de mesurer précisément les dimensions à l'échelle nanométrique *via* la mesure d'un facteur de forme moyenné sur des millions d'objets en solution, ce qui réalise une bien meilleure statistique. Elle permet aussi de s'assurer que les

changements de morphologie n'étaient pas liés à des artefacts de cryo-TEM pouvant résulter de la préparation des échantillons, comme observé sur certaines images de ce système en conditions isotoniques (voir annexe 5.7.4).

5.2.2.1 Conditions isotoniques

La figure 5.4 montre l'intensité diffusée par unité de volume par les vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ en conditions isotoniques ainsi que la courbe théorique obtenue en ajustant un facteur de forme vésiculaire (modèle de sphères creuses polydisperses) :

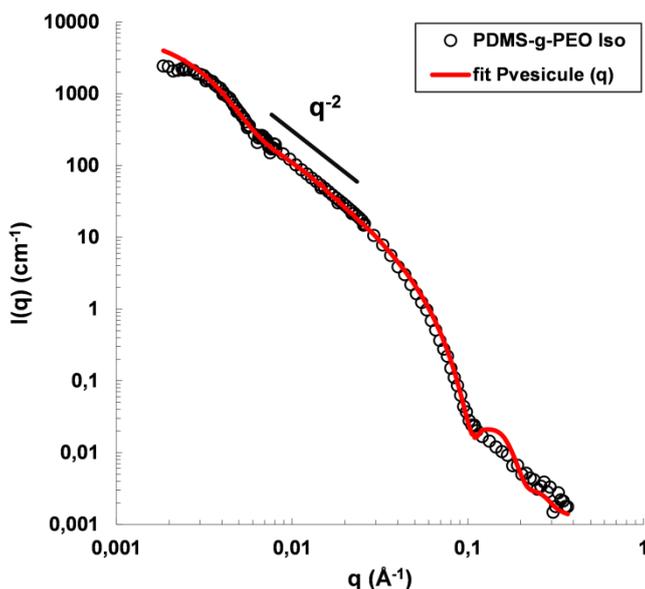


Figure 5.4. Données expérimentales de DNPA obtenues sur les nano-polymersomes de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ en conditions isotoniques. La courbe rouge représente l'ajustement d'un facteur de forme vésiculaire (modèle de sphères creuses polydisperses) aux données expérimentales ($R_c = 33$ nm, $\delta = 5,75$ nm).

D'un point de vue graphique seulement, la décroissance en q^{-2} de l'intensité diffusée dans le régime des petits vecteurs d'onde q est caractéristique de la présence d'interface lamellaire. Compte tenu du fait que l'on étudie des objets en solution, cela indique vraisemblablement la présence de structures vésiculaires, les lamelles correspondant aux couches hydrophobes formées par le PDMS. En s'appuyant sur cette observation et les résultats de cryo-TEM, le modèle théorique choisi pour traiter les données expérimentales est un modèle de sphères creuses polydisperses (Vesicle Model - SasView) avec une pondération du facteur de forme (5.1) par les volumes (5.2) et une polydispersité suivant une distribution log-normale pour la valeur du rayon du cœur de la vésicule R_c et l'épaisseur de membrane δ (5.3). Le facteur de forme correspondant est :²³⁷

$$P(q, R_e, R_c) = \frac{9}{(V_{R_e} - V_{R_c})^2} \left[V_{R_e} \frac{\sin(qR_e) - qR_e \cos(qR_e)}{(qR_e)^3} - V_{R_c} \frac{\sin(qR_c) + qR_c \cos(qR_c)}{(qR_c)^3} \right]^2 \quad (5.1)$$

avec R_c et $R_e = R_c + \delta$ les rayons du cœur et externe de la vésicule, et V_{R_c} (V_{R_e}) le volume de la sphère de rayon R_c (R_e). L'intensité diffusée est proportionnelle à la fraction en polymère et le contraste avec le solvant. Elle est calculée en intégrant les polydispersités géométriques :

$$I(q) = \Phi(\Delta\rho)^2 \frac{\iint_{R_c, \delta} (V_{R_e} - V_{R_c})^2 P(q, R_e, R_c) F(R_c, \sigma_{R_c}) dR_c F(\delta, \sigma_\delta) d\delta}{\iint_{R_c, \delta} (V_{R_e} - V_{R_c}) F(R_c, \sigma_{R_c}) dR_c F(\delta, \sigma_\delta) d\delta} \quad (5.2)$$

avec des distributions log-normales sur la valeur du rayon du cœur des vésicules $F(R_c, \sigma_{R_c})$ et l'épaisseur de membrane $F(\delta, \sigma_\delta)$:

$$F(x, x_0, \sigma_x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_x} x} \exp \left[-\frac{1}{2\sigma_x^2} \left(\ln \frac{x}{x_0} \right)^2 \right] \quad (5.3)$$

Pour ce modèle, on considère que tous les objets diffusants sont des coquilles de densité de longueur de diffusion $\rho_{\text{PDMS}} = 6,37 \cdot 10^{-8} \text{ \AA}^{-2}$ en solution dans de l'eau lourde de $\rho_{\text{D}_2\text{O}} = 6,35 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$. Les chaînes de PEO qui couvrent les surfaces externes et internes des coquilles de PDMS sont considérées comme étant totalement hydratées et n'ont donc quasiment pas de contraste avec le solvant.

Aussi faut-il tenir compte du fait qu'avec cette technique la polydispersité en forme des nanopolymersomes, observée en cryo-TEM, ne peut pas être distinguée de la polydispersité en taille (voir annexe 5.7.5). Le résultat final est donc peu dépendant de la valeur du rayon utilisée pour ajuster le facteur de forme, mais reste sensible vis-à-vis des paramètres de la membrane.

Les meilleurs résultats sont obtenus pour un rayon du cœur de la vésicule $R_c = 33 \text{ nm}$ ($\sigma_{R_c} = 0,38$) et une épaisseur de membrane $\delta = R_e - R_c = 5,75 \text{ nm}$ ($\sigma_\delta = 0,12$), en très bon accord avec la valeur mesurée en cryo-TEM. Cela confirme également que les polymersomes sont bien unilamellaires après leur formation.

5.2.2.2 Conditions hypertoniques

Données expérimentales : les mêmes expériences ont été conduites après avoir exposé les vésicules à des conditions hypertoniques de 100 mM et 250 mM. Les solutions de glucose utilisées pour les chocs ont été préparées avec 75 % de glucose deutéré et 25 % de glucose hydrogéné afin d'obtenir la même densité de longueur de diffusion que le D₂O. Les courbes expérimentales, présentées en figures 5.5.A et 5.5.B, révèlent une oscillation de l'intensité diffusée qui apparaît dans le domaine des q intermédiaires (q_{\min}).

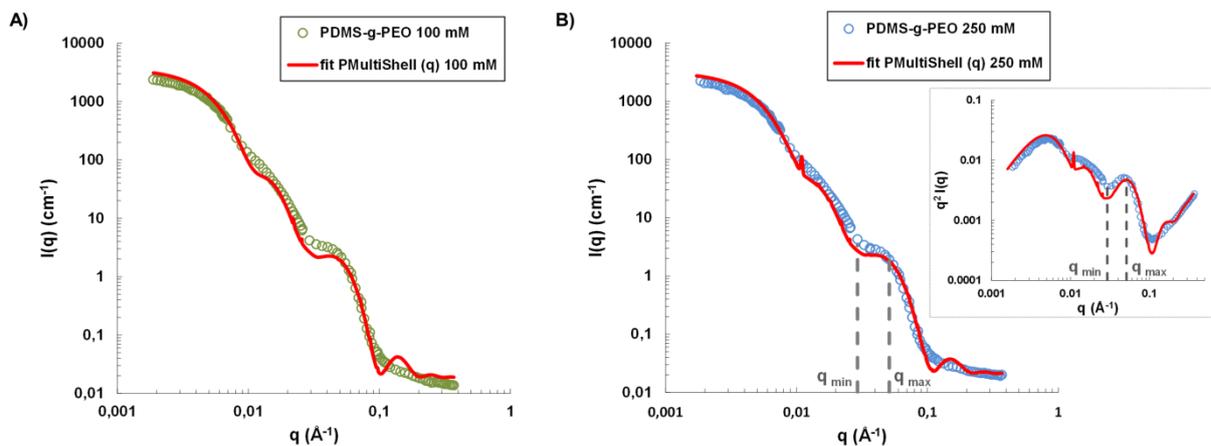


Figure 5.5. Données expérimentales de DNPA obtenues pour les nano-polymersomes de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ en conditions hypertoniques A) 100 mM et B) 250 mM. Sur chaque série de points expérimentaux, la courbe rouge représente le meilleur ajustement de la courbe obtenu en utilisant un modèle de vésicules multicouches polydisperses. L'insertion en B) est la représentation en $I(q) \times q^2$ vs. q des données du choc hypertonique à 250 mM.

Le maximum local des courbes expérimentales sur une représentation en $I(q) \times q^2$ vs. q (insertion figure 5.5.B) se situe à un vecteur d'onde $q_{\max} \sim 5.10^{-2} \text{ \AA}$ et est similaire pour les deux chocs hypertoniques appliqués. Cela indique que les deux échantillons ont une longueur de corrélation caractéristique de la membrane $\pi/q_{\max} \sim 60 \text{ \AA}$, très proche de l'épaisseur de membrane mesurée par cryo-TEM et DNPA en conditions isotoniques. De plus, la position de l'oscillation qui apparaît suite aux chocs hypertoniques (q_{\min}) est elle aussi très similaire pour les deux conditions, ce qui semble indiquer que l'ensemble des paramètres de membrane finaux sont très proches quel que soit le choc hypertonique appliqué.

Modèle de vésicules multicouches : en accord avec les observations de cryo-TEM, un modèle de vésicules multicouches, avec le nombre de couches fixé à 2 pour représenter des membranes bilamellaires, a été choisi pour ajuster les données expérimentales (figure 5.6, Multi Shell Model - SasView) :

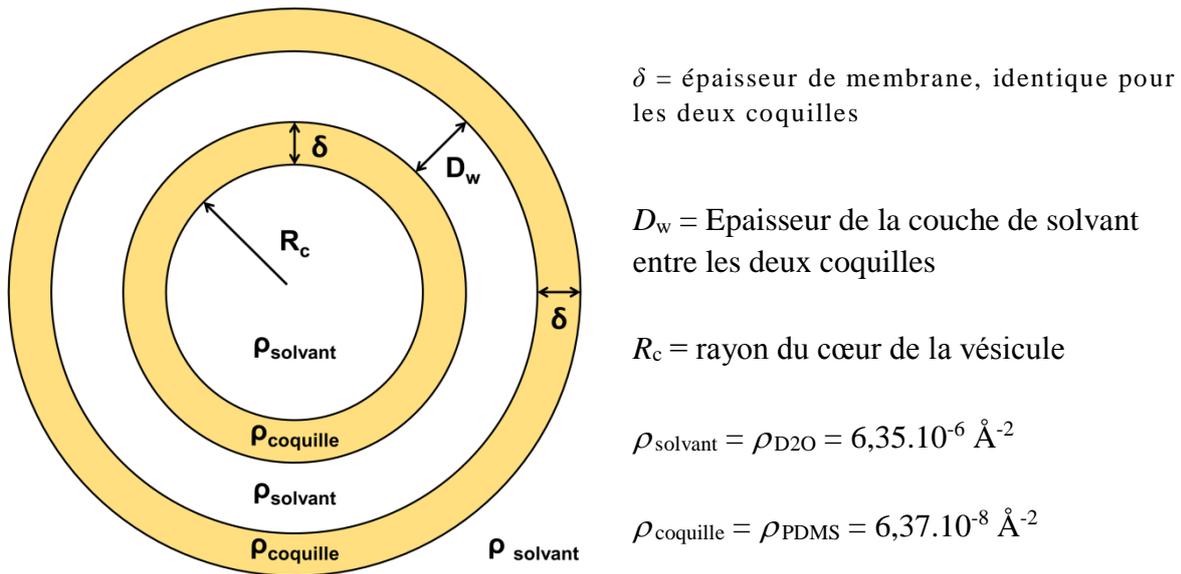


Figure 5.6. Schéma du modèle de vésicules multicouches et description de ses paramètres.

Dans ce modèle, les deux « coquilles » sphériques - de même centre, même épaisseur et même densité de longueur de diffusion - sont séparées par une couche de solvant, en accord avec ce qui a été observé en cryo-TEM. Pour le choc à 100 mM, les résultats obtenus sont un rayon du cœur de la vésicule $R_c = 16,6 \text{ nm}$ ($\sigma_{R_c} = 0,33$), environ deux fois plus petit que ce qui avait été obtenu en conditions isotoniques pour le cœur unique (figure 5.5.A). L'épaisseur de chaque couche de polymère est $\delta = 6,2 \text{ nm}$ ($\sigma_{\delta} = 0,1$) avec une distance entre elles $D_w = 3,9 \text{ nm}$ ($\sigma_{D_w} = 0,5$), en très bon accord avec les mesure de cryo-TEM. Egalement en accord avec les observations, qui montrent des membranes bilamellaires avec les mêmes paramètres quel que soit le choc hypertonique appliqué, les résultats pour le choc à 250 mM sont similaires (figure 5.5.B) : $R_c = 16 \text{ nm}$ ($\sigma_{R_c} = 0,36$), $\delta = 5,7 \text{ nm}$ ($\sigma_{\delta} = 0,1$) et $D_w = 4,5 \text{ nm}$ ($\sigma_{D_w} = 0,5$). Bien que ces résultats soient en excellent accord avec les mesures effectuées sur les images de cryo-TEM, l'oscillation qui apparaît dans le domaine des q intermédiaires (q_{min}) n'est pas assez atténuée pour correctement ajuster les courbes modèles aux données expérimentales. Cela peut être attribué au quart de vésicules unilamellaires qu'il reste dans le milieu après les chocs hypertoniques.

Mélange des modèles de vésicules multicouches et de sphères creuses : de meilleurs ajustements ont été obtenus en simulant un mélange de populations de vésicules unilamellaires et de vésicules bilamellaires en utilisant les paramètres préalablement déterminés par cryo-TEM et DNPA (figure 5.7) :

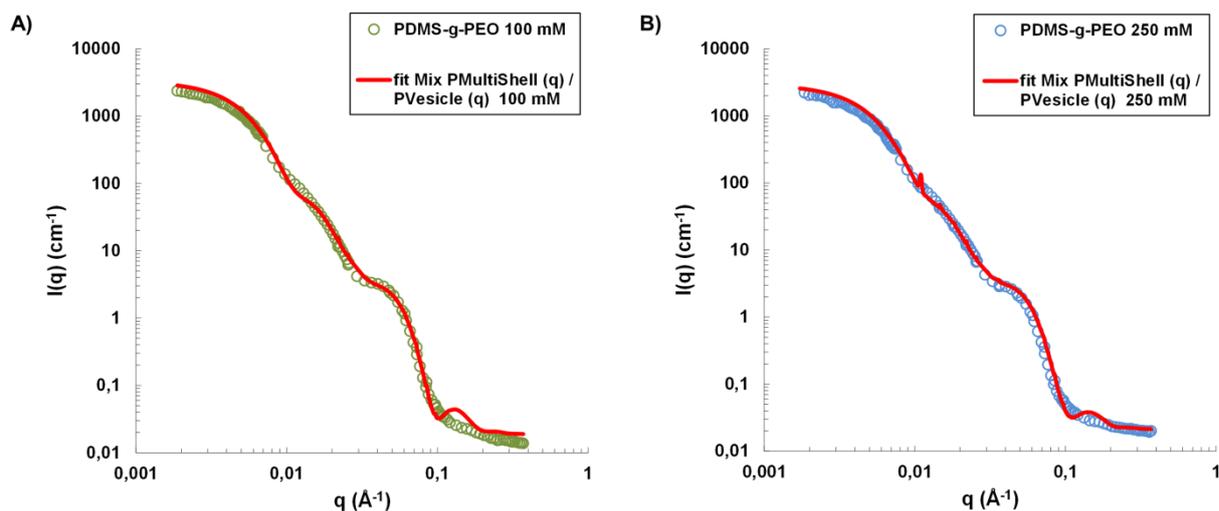


Figure 5.7. Données expérimentales de DNPA obtenues pour les nano-polymersomes de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ en conditions hypertoniques A) 100 mM et B) 250 mM. Sur chaque série de points expérimentaux, la courbe rouge représente l’ajustement obtenu en simulant un mélange de populations de vésicules unilamellaires (modèle de sphères creuses polydisperses) et de vésicules bilamellaires (modèle de vésicules multicouches polydisperses).

| Δc | Modèle | | R_c (nm) | σ_{R_c} | δ (nm) | σ_δ | D_w (nm) | σ_{D_w} |
|------------|----------|-------------|------------|----------------|---------------|-----------------|------------|----------------|
| | Vésicule | Multi Shell | | | | | | |
| 0 mM | Vesicle | 100 % | 33 | 0,38 | 5,75 | 0,12 | - | - |
| 100 mM | Mix | 28 % | 16,6 | 0,33 | 6,2 | 0,1 | 3,9 | 0,3 |
| 250 mM | Mix | 26 % | 16 | 0,36 | 5,7 | 0,1 | 4,5 | 0,3 |

Tableau 5.3. Paramètres des facteurs de forme de vésicules multicouches et de sphères creuses polydisperses utilisés pour leur ajustement aux données expérimentales obtenues sur les nano-polymersomes de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ après les chocs hypertoniques.

Pour simuler les vésicules bilamellaires, tous les paramètres du modèle de vésicules multicouches ont été gardés identiques exceptés les valeurs sur la polydispersité de l’écart entre les couches σ_{D_w} qui ont été fixées à 0,3. Les vésicules unilamellaires ont été simulées avec le modèle de sphères creuses polydisperses en utilisant les mêmes rayons (les R_c déterminés lors de l’ajustement du facteur de forme de vésicule multicouche représentent les valeurs moyennes pour l’ensemble des objets) et les mêmes paramètres de membrane que pour les vésicules bilamellaires (mais avec seulement une couche). La proportion utilisée pour chaque courbe a été fixée en utilisant la répartition mesurée en cryo-TEM.

Les courbes obtenues *via* cette méthode s’ajustent très bien aux données expérimentales (figure 5.7), et le très bon accord entre les valeurs déterminées par DNPA et par cryo-TEM pour les paramètres des membranes confirme la robustesse et le sens physique des ajustements de courbe réalisés. L’apparition d’une oscillation dans les q intermédiaires pour les deux conditions testées confirme que les nano-polymersomes unilamellaires de PDMS₂₂-g-PEO₁₂

préparés dans l'eau deviennent bilamellaires suite aux chocs hypertoniques. De plus, cela montre la grande complémentarité qu'il existe entre ces deux méthodes d'analyse, les données statistiques extraites des expériences de cryo-TEM pouvant être utilisées pour améliorer le traitement des courbes de DNPA de manière quantitative.

5.3 Vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇

L'étude du comportement des nano-polymersomes de tribloc en conditions hypertoniques permet de mettre en évidence l'influence de l'architecture du copolymère utilisé pour former les membranes. En effet, la faible diminution du rayon hydrodynamique en conditions hypertoniques (figure 5.1) semble peu compatible avec la formation de polymersomes bilamellaires comme observé avec le PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂. Une étude en DNPA a aussi été conduite sur le copolymère tribloc avec le bloc hydrophobe de poids moléculaire plus faible mais celui-ci ne semble pas former de vésicules (voir annexe 5.7.6).

5.3.1 Cryo-TEM

Les images de cryo-TEM du système en conditions isotoniques (figure 5.8.A) révèlent la présence de nombreux types d'agrégats en solution.

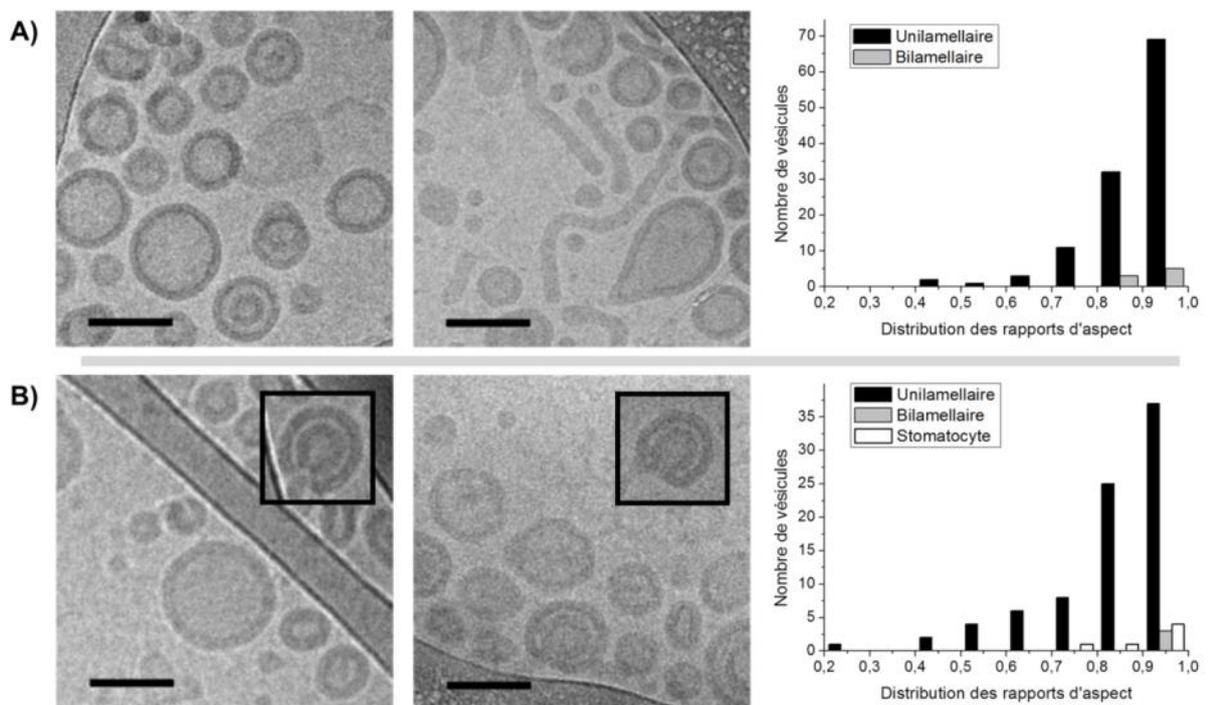


Figure 5.8. Images de cryo-TEM et distributions des rapports d'aspect pour les vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ en conditions (A) isotoniques et (B) de choc hypertonique 250 mM. Les insertions dans les images (B) sont d'autres structures issues des mêmes images mais hors du champ de vision présenté ici. Les barres d'échelle représentent 100 nm.

Une étude statistique de la répartition des populations, présentée en figure 5.9, indique que les vésicules unilamellaires sont majoritaires (66,8%), qu'il y a environ un quart de micelles allongées et quelques vésicules doubles issues du procédé de formation. Il n'est pas certain que les vésicules doubles observées sur ces images (figure 5.8.A) soient bien des vésicules bilamellaires (fermées) et non des stomatocytes – *i.e.* des vésicules ayant une forme d'estomac. En effet, si l'axe de symétrie d'un stomatocyte est orienté verticalement, la projection vue en cryo-TEM sera la même que celle d'une vésicule bilamellaire. Cependant seules des structures fermées ont été identifiées sur l'ensemble des images en conditions isotoniques et les stomatocytes sont facilement reconnaissables sur les images de cryo-TEM (voir annexe 5.7.4). On peut donc raisonnablement supposer que ce sont des vésicules bilamellaires. Contrairement aux polymersomes de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ en conditions isotoniques, les vésicules semblent sphériques. L'épaisseur de membrane mesurée est $\delta = 11,2 \pm 1,2$ nm (50 mesures), proche de la valeur indiquée dans la littérature pour un copolymère similaire ($\delta = 10$ nm pour une membrane de PMOXA-*b*-PDMS-*b*-PMOXA, M_w PDMS = 5400 g/mol).²³⁸

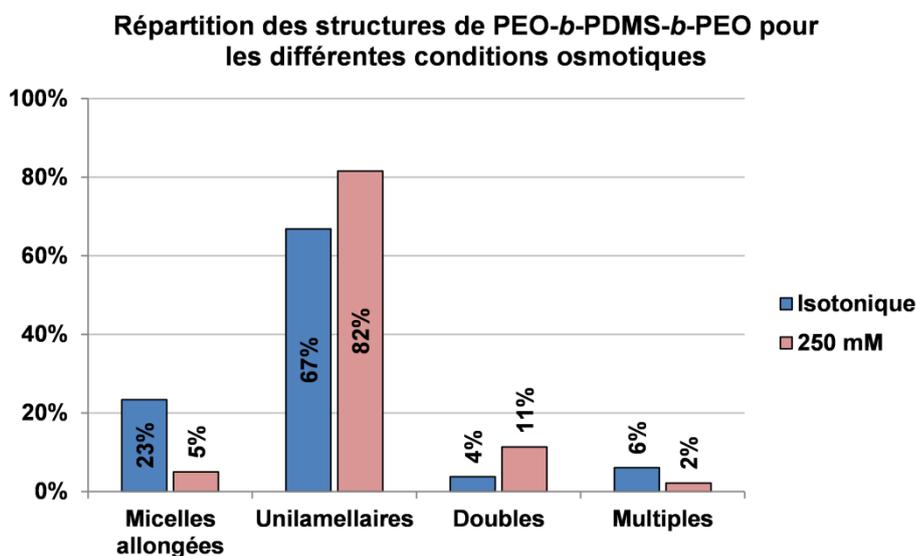


Figure 5.9. Evolution de la répartition des structures formées avec le PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇. La catégorie « Doubles » comprend l'ensemble des structures qui ont une membrane formées de deux couches de polymère, c'est-à-dire les vésicules bilamellaires (fermées) et les stomatocytes.

Les images de cryo-TEM du choc hypertonique à 250 mM (figure 5.8.B) montrent deux différences importantes : des stomatocytes sont maintenant clairement identifiables et les micelles allongées ont quasiment disparu. La nouvelle répartition des structures est 81,6% de vésicules unilamellaires, seulement 5% de micelles allongées et 11,3% de structures avec une membrane double – *i.e.* stomatocytes et vésicules bilamellaires confondus. Bien que cette dernière proportion soit au moins deux fois plus élevée qu'avant le choc hypertonique, plus de

la moitié des structures qu'elle comprend sont clairement identifiables comme étant des stomatocytes (6,4% du total des structures). Comme il y avait déjà des vésicules bilamellaires en conditions isotoniques, cette augmentation peut principalement être attribuée à l'apparition de stomatocytes et non de nouvelles vésicules bilamellaires. L'épaisseur de membrane, mesurée sur les vésicules unilamellaires, est plus importante que celle mesurée en conditions isotoniques : $\delta = 13,6 \pm 1,1$ nm (50 mesures).

5.3.2 DNPA

La figure 5.10.A montre l'intensité diffusée par les vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ en conditions isotoniques :

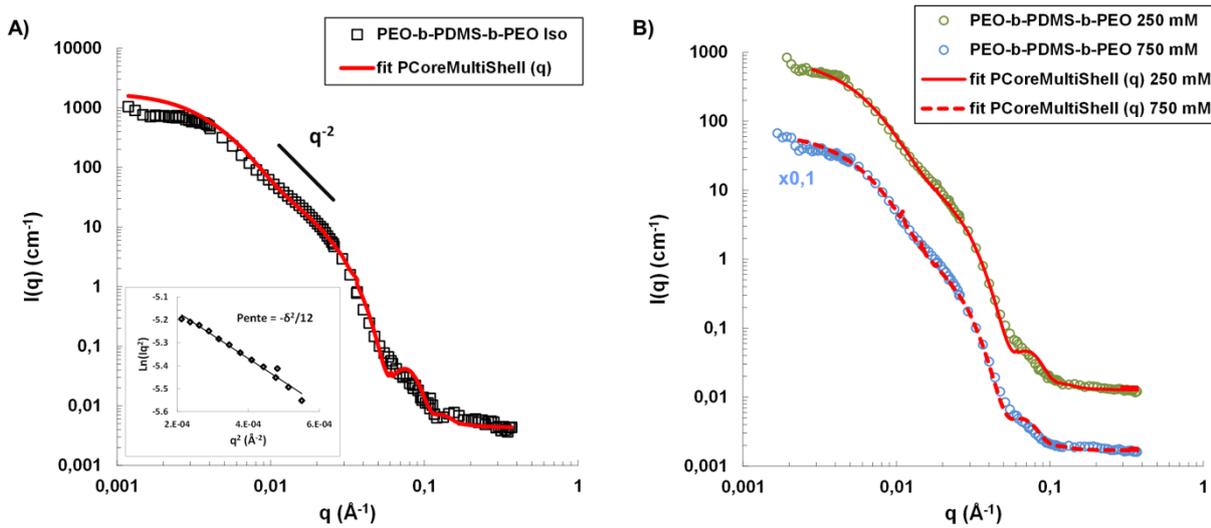


Figure 5.10. Données expérimentales de DNPA obtenues sur les nano-polymersomes de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇. (A) Conditions isotoniques, la courbe rouge représente l'ajustement d'un modèle cœur-écorce multicouches. L'insertion est la représentation de Kratky-Porod, qui permet une estimation de l'épaisseur de membrane δ_{KP} . (B) Conditions hypertoniques 250 mM et 750 mM (respectivement points verts et points bleus). La courbe rouge pleine et la courbe rouge en pointillés représentent les ajustements faits avec le modèle cœur-écorce multicouches pour les données expérimentales à 250 mM ($R_c = 10,5$ nm, $\sigma_{Rc} = 0,54$, $\delta = 11,7$ nm, $\sigma_\delta = 0,14$) et 750 mM ($R_c = 10,1$ nm, $\sigma_{Rc} = 0,55$, $\delta = 12,5$ nm, $\sigma_\delta = 0,15$) respectivement. Toutes les données relatives au choc hypertonique à 750 mM ont été translatées verticalement ($\times 0,1$) par souci de clarté de la représentation.

Comme pour les vésicules de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂, la décroissance en q^{-2} de l'intensité diffusée dans le régime des petits vecteurs d'onde q est caractéristique de la présence de morphologies vésiculaires. Cependant l'oscillation aux grands q est moins nette à cause des polydispersités importantes en tailles et morphologies mises en évidence par la cryo-TEM. La pente de la représentation $\text{Ln}(I(q) \times q^2)$ vs. q^2 dans le domaine de Kratky-Porod (insertion dans la figure 5.10.A) permet une estimation de l'épaisseur de membrane $\delta_{KP} = 11$ nm, proche de la valeur déterminée par les mesures de cryo-TEM. Les courbes de diffusion obtenues sur les échantillons

soumis à des chocs hypertoniques avec des gradients de concentration de glucose de 250 mM et 750 mM, présentés figure 5.10.B, confirment les résultats de cryo-TEM et de DLS : il y a très peu de changements, les courbes sont quasiment les mêmes qu'en conditions isotoniques.

En considérant que la majeure partie de l'intensité diffusée est due aux vésicules unilamellaires dont la membrane est composée par la succession des trois blocs du copolymère, le modèle théorique choisi pour ajuster les courbes est un modèle cœur-écorce multicouches (Core Multi Shell Model - SasView), présenté en figure 5.11. Comme expliqué pour le traitement des données du PDMS_{22-g}-PEO₁₂, les couches de PEO ne peuvent pas être distinguées en DNPA si elles sont totalement hydratées. Les couches 1 et 3 de ce modèle ne représentent donc pas les couches de PEO en entier mais seulement leur partie proche de l'interface PDMS / PEO où elles ne sont pas complètement hydratées. Cela représente donc plutôt un gradient de densité de longueur de diffusion le long des chaînes de PEO.

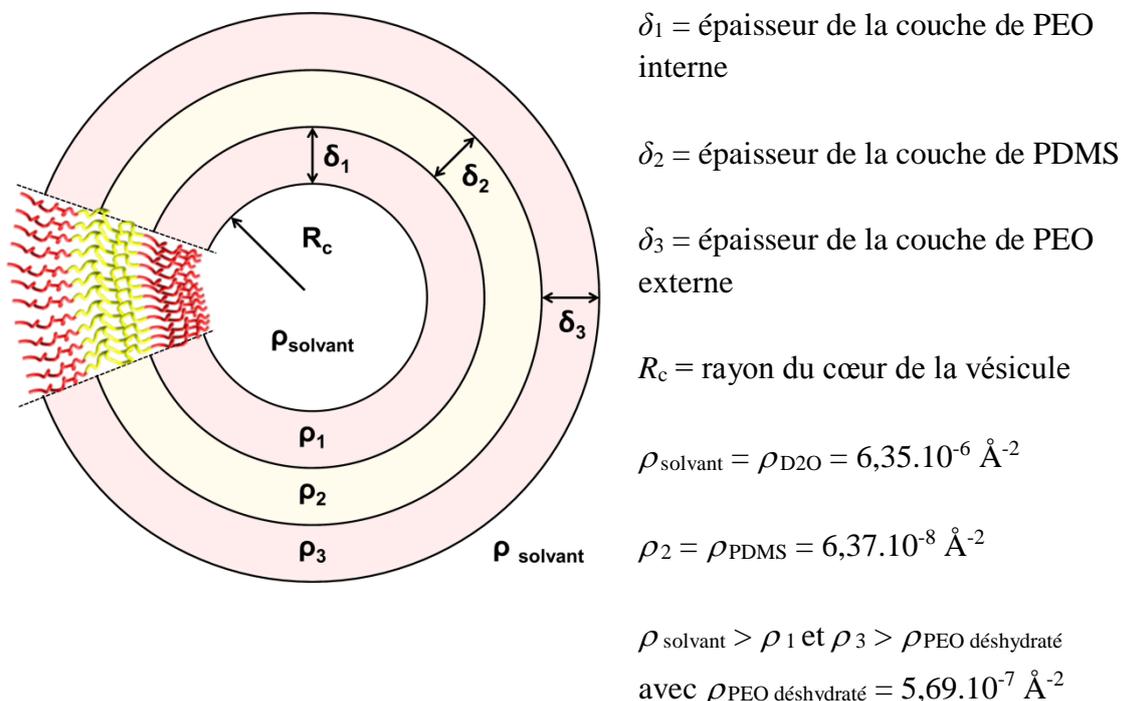


Figure 5.11. Schéma du modèle cœur-écorce (sphérique) multicouches.

| Δc | R_c (nm) | σ_{R_c} | δ_1 (Å) | ρ_1 (Å ⁻²) | δ_2 (Å) | ρ_2 (Å ⁻²) | δ_3 (Å) | ρ_3 (Å ⁻²) | δ_{tot} (Å) | σ_δ |
|------------|------------|----------------|----------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------|
| 0 mM | 14,9 | 0,54 | 10,0 | $1,8 \cdot 10^{-6}$ | 85,6 | $6,37 \cdot 10^{-8}$ | 18,7 | $8,1 \cdot 10^{-7}$ | 114 | 0,12 |
| 250 mM | 10,5 | 0,54 | 15,3 | $1,2 \cdot 10^{-6}$ | 90,9 | $6,37 \cdot 10^{-8}$ | 11,0 | $7,4 \cdot 10^{-7}$ | 117 | 0,14 |
| 750 mM | 10,1 | 0,55 | 18,1 | $1,2 \cdot 10^{-6}$ | 88,7 | $6,37 \cdot 10^{-8}$ | 17,8 | $5,69 \cdot 10^{-7}$ | 125 | 0,15 |

Tableau 5.4. Paramètres des facteurs de forme correspondants au modèle cœur-écorce multicouches déterminés lors de leur ajustement aux données expérimentales obtenues pour les vésicules de PEO_{17-b}-PDMS_{66-b}-PEO₁₇ dans les différentes conditions d'osmolarité.

Les valeurs des rayons ont peu d'influence sur les résultats à cause des polydispersités importantes en tailles et en formes. C'est la raison pour laquelle les polydispersités sur les rayons déterminées avec ce modèle sont aussi élevées (tableau 5.4). Les valeurs de densité de longueur de diffusion déterminées pour les couches 1 et 3 sont toujours proches de celles du PEO déshydraté. Si on calcule le contraste de ces couches avec le solvant, on se rend compte que la diffusion correspondante n'est pas négligeable. En effet, pour la valeur de densité de contraste de diffusion la plus élevée de ces couches « déshydratées » de PEO (le ρ_{PEO} déterminé le plus proche de $\rho_{\text{D}_2\text{O}}$, donc la couche qui diffuse le moins) on calcule un contraste $\Delta\rho^2 = (\rho_{\text{PEO}} - \rho_{\text{D}_2\text{O}})^2 = (1,8 \cdot 10^{-6} - 6,35 \cdot 10^{-6})^2 = 2,07 \cdot 10^{-11} \text{ \AA}^{-4}$, soit 52% du contraste de la couche de PDMS. L'épaisseur de membrane totale est donc la somme de l'épaisseur de ces trois couches diffusantes : $\delta_{\text{tot}} = \delta_1 + \delta_2 + \delta_3$.

En conditions isotoniques, l'épaisseur de membrane totale est $\delta = 11,4 \text{ nm}$ ($\sigma_\delta = 0,12$), en accord avec les valeurs déterminées en cryo-TEM et avec l'approximation de Kratky-Porod. Ces épaisseurs sont légèrement plus élevées pour les vésicules en conditions hypertoniques, $\delta = 11,7$ et $\delta = 12,5$ pour les chocs à 250 mM et 750 mM respectivement. Comme observé en cryo-TEM, il semble y avoir un épaississement de la membrane au cours des chocs hypertoniques. Il est possible que l'ajout de glucose dans le milieu extravésiculaire entraîne une légère déshydratation des chaînes de PEO au niveau de l'interface PDMS / PEO, ce qui expliquerai le léger épaississement de membrane observé.²³⁹

Les données de DNPA sont en accord avec les mesures de DLS et les observations de cryo-TEM car peu de changements sont observés. A la différence des vésicules de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂, les nano-vésicules préparées dans l'eau avec le copolymère tribloc PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ ne forment pas de vésicules bilamellaires quand elles sont soumises à un choc hypertonique. L'apparition de stomatocytes ainsi que la disparition des micelles allongées au cours des chocs hypertoniques, observées sur les images de cryo-TEM, ne se distingue pas sur les courbes de diffusion de neutrons.

5.4 Vésicules de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀

L'utilisation de ce copolymère va permettre de déterminer l'influence de la nature du bloc hydrophobe sur les changements de structures en conditions de déséquilibre osmotique. En effet, le bloc polybutadiène est flexible à température ambiante, sa température de transition vitreuse T_g est de -31°C , sans toutefois être aussi souple que le PDMS. De plus, l'architecture dibloc de ce copolymère pourrait mettre en évidence l'importance de la nano-structuration de la membrane. L'étude a seulement été menée par DNPA pour le moment.

L'intensité diffusée par les vésicules de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ en conditions isotoniques, présentée en figure 5.12.A, a les caractéristiques d'un signal correspondant à des vésicules unilamellaires. La représentation en $\text{Ln}(I(q) \times q^2)$ vs. q^2 dans le domaine de Kratky-Porod (insertion dans la figure 5.12.A) permet une estimation de l'épaisseur de membrane $\delta_{\text{KP}} = 12,8$ nm en conditions isotoniques, légèrement plus élevée que la valeur rapportée dans la littérature pour un copolymère similaire ($\delta = 9,6$ nm pour une membrane de PBut₄₆-*b*-PEO₂₆).⁶⁵ Le modèle utilisé pour traiter ces données est un modèle de sphères creuses polydisperses (Vesicle Model – SasView), avec une densité de longueur de diffusion $\rho_{\text{PBut}} = 4,47 \cdot 10^{-7} \text{ \AA}^{-2}$ pour les coquilles. Graphiquement, ce modèle semble très bien adapté pour le système en conditions isotoniques, ce qui tend à confirmer que les vésicules sont unilamellaires suite à leur formation. La polydispersité σ_{Rc} obtenue sur la valeur du rayon du cœur des vésicules, indiquée dans le tableau 5.5, est élevée : il y a soit une polydispersité en taille soit une polydispersité en forme au sein de l'échantillon, comme observé pour les vésicules de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ en conditions isotoniques. Dans tous les cas, la valeur du rayon influe peu sur le résultat final de l'ajustement du facteur de forme et ne reflète pas une vraie valeur moyenne du rayon du cœur des vésicules de l'échantillon. L'épaisseur de membrane déterminée est $\delta = 10$ nm, proche de la valeur rapportée dans la littérature.⁶⁵

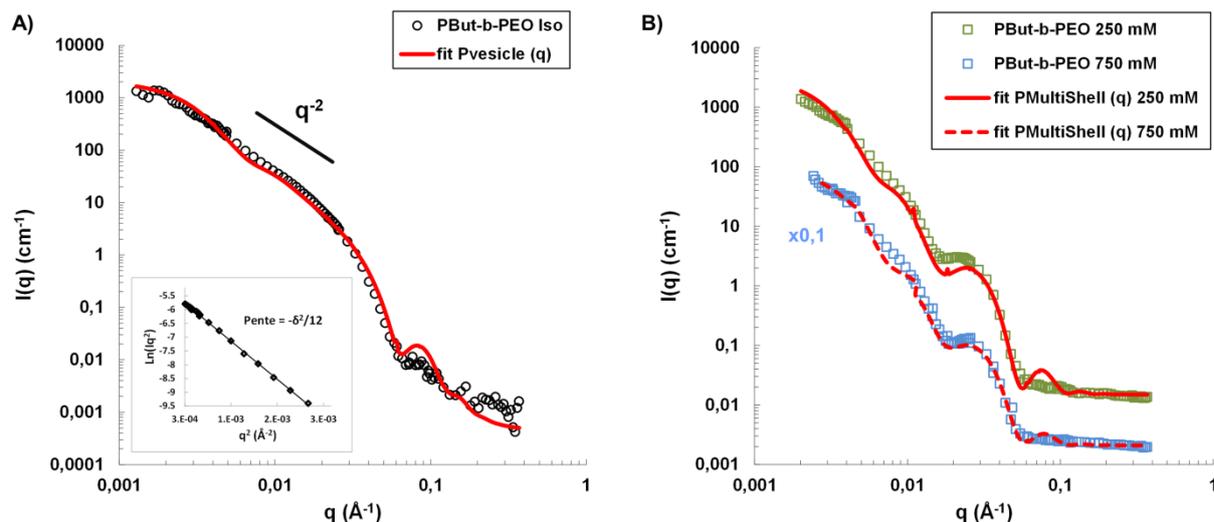


Figure 5.12. Données expérimentales de DNPA obtenues sur les nano-polymersomes de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀. (A) Conditions isotoniques, la courbe rouge représente l'ajustement d'un modèle de sphères creuses polydisperses ($R_c = 35$ nm, $\delta = 10$ nm). L'insertion est la représentation de Kratky-Porod, qui permet une estimation de l'épaisseur de membrane δ_{KP} . (B) Conditions hypertoniques 250 mM et 750 mM (respectivement points verts et points bleus). La courbe rouge pleine et la courbe rouge en pointillés représentent les ajustements faits avec le modèle de vésicules multicouches polydisperses pour les données expérimentales à 250 mM et 750 mM respectivement. Toutes les données relatives au choc hypertonique à 750 mM ont été translatées verticalement ($\times 0,1$) par souci de clarté de la représentation.

| Δc | Modèle | R_c (nm) | σ_{R_c} | δ (nm) | σ_δ | D_w (nm) | σ_{D_w} |
|------------|-------------|------------|----------------|---------------|-----------------|------------|----------------|
| 0 mM | Vesicle | 35 | 0,35 | 10,0 | 0,11 | - | - |
| 250 mM | Multi Shell | 28,2 | 0,38 | 11,3 | 0 | 6,8 | 0,44 |
| 750 mM | Multi Shell | 17,8 | 0,45 | 10,9 | 0 | 6,4 | 0,45 |

Tableau 5.5. Paramètres déterminés pour les vésicules de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ dans les différentes conditions d'osmolarité.

Une fois les échantillons soumis à des chocs hypertoniques avec des gradients de concentration de glucose de 250 mM et 750 mM, une oscillation similaire à celle observée pour les vésicules bilamellaires de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ apparaît dans le domaine des q intermédiaires (figure 5.12.B). Les membranes, initialement unilamellaires, ont probablement évolué vers des membranes bilamellaires. Afin de déterminer les nouveaux paramètres membranaires, un facteur de forme de vésicules multicouches est ajusté aux données expérimentales (figure 5.12). Comme pour les vésicules de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂, les paramètres déterminés pour la membrane sont les mêmes quel que soit le gradient de glucose appliqué lors du choc. Chaque couche de polymère qui compose la membrane bilamellaire a une épaisseur similaire à la membrane des vésicules unilamellaires, $\delta \approx 11$ nm, et l'écart entre les deux couches est $D_w \approx 6,6$ nm. Cependant, la polydispersité sur l'écart entre les deux couches σ_{D_w} est élevée pour les deux conditions hypertoniques et cela ne permet pas de suffisamment lisser la courbe modèle pour l'ajuster aux données expérimentales du choc à 250 mM. En réalité, il y a probablement de nombreuses sortes de structures en solution dans ces échantillons.

Les résultats de DNPA et de DLS (voir partie 5.1) semblent peu compatibles, les premiers indiquant un comportement similaire aux nano-vésicules de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ - qui forment des vésicules bilamellaires - et les seconds un comportement similaire aux nano-vésicules de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ qui réagissent très peu aux chocs hypertoniques. Il est possible qu'à cause de la nature du bloc hydrophobe, moins flexible, d'autres morphologies se soient formées au cours des chocs hypertoniques. Des disques plats pourraient permettre d'obtenir ces résultats car il y aurait une distance de corrélation entre les deux membranes suite au dégonflement des vésicules et la diminution de taille observée en DLS serait moins prononcée que pour la formation de vésicules bilamellaires. Cela expliquerait également pourquoi les ajustements de courbe fait avec un modèle de vésicules multicouches donnent de mauvais résultats quand les dimensions caractéristiques sondées sont supérieures à l'épaisseur de membrane (la valeur du rayon du cœur des vésicules R_c est peu influente sur le résultat final et la polydispersité σ_{R_c} est élevée).

Cela montre également les limites de la diffusion dynamique de la lumière qui est très dépendante de la polydispersité en taille des échantillons et ne donne pas d'informations sur la forme des objets. Si les objets ne sont pas sphériques les tailles mesurées ne sont pas représentatives des particules en solution car le paramètre physique mesuré avec cette technique est le coefficient de diffusion, qui dépend de la forme des particules. La taille indiquée est ensuite estimée à partir du coefficient de diffusion en utilisant la relation de Stokes-Einstein et est valable pour des particules sphériques seulement.^{240, 241}

5.5 Evolution des morphologies

5.5.1 Accord avec les modèles théoriques

La force motrice des changements de formes dans le cas de chocs hypertoniques est la diminution du volume interne des polymersomes. Le modèle ADE - « Area Difference Elasticity » - permet de prédire l'évolution de forme de vésicules fluides soumises à des chocs hypertoniques en fonction de plusieurs paramètres, tels que le volume réduit ν ou la courbure spontanée c_0 (voir partie 1.3.5.3).⁸² Le volume réduit ν correspond au rapport entre le volume interne d'un objet et le volume d'une sphère ayant la même surface. Dans le cas présent, on va considérer que la courbure spontanée est nulle car la membrane est formée avec un seul composé. La trajectoire d'évolution de forme est alors déterminée en minimisant l'énergie de courbure d'une vésicule pour différentes valeurs du volume réduit ν . Selon la trajectoire d'évolution déterminée dans ce modèle simplifié, une vésicule sphérique ($\nu = 1$) se transforme en stomatocyte une fois que son volume réduit atteint une valeur d'environ 0,59. Plus le volume réduit continue de diminuer, plus les bords de l'ouverture du stomatocyte se rapprochent jusqu'à ce qu'ils soient très proches et qu'éventuellement ils fusionnent (figure 5.13). Lors de cette transformation, qui permet de passer d'une vésicule unilamellaire à une vésicule bilamellaire, une partie de la solution extravésiculaire est encapsulée dans la vésicule double et le volume qui était à l'origine dans la vésicule devient la couche aqueuse d'épaisseur D_w qui sépare les deux couches de polymère de la membrane.

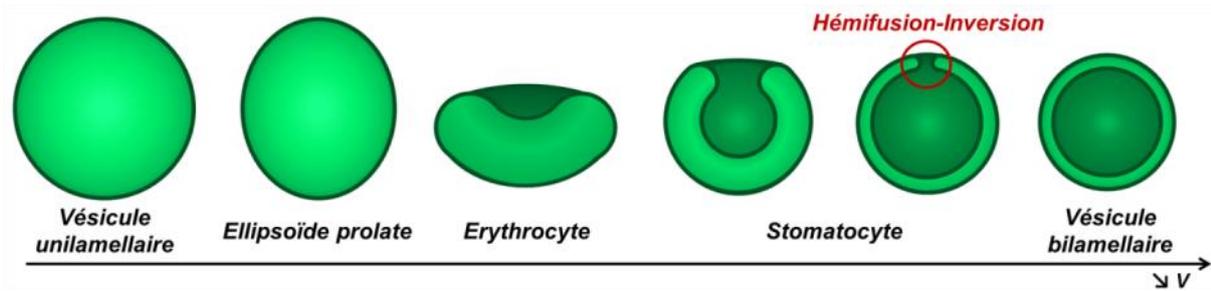


Figure 5.13. Représentation de la transformation d'une vésicule unilamellaire en vésicule bilamellaire en fonction du volume réduit v . Le vert clair et le vert foncé représentent respectivement les surfaces interne et externe de la vésicule avant transformation. Toutes les formes ont l'axe vertical comme axe de symétrie.

Bien qu'il n'ait pas été possible d'observer les structures transitoires telles que les stomatocytes, nous pensons que les nano-polymersomes de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ ont évolué en suivant cette trajectoire d'évolution de forme, comme cela a été proposé par Hubert *et al.*¹²⁸ pour des vésicules de DODAB. Les images de cryo-TEM semblent confirmer ce chemin pour le PDMS₂₂-g-PEO₁₂ car uniquement des vésicules bilamellaires (fermées) ont été observées après les chocs hypertoniques. De plus, différents défauts résultant de la fusion de membrane, telles qu'une cicatrice dans la membrane ou des bourgeonnements intravésiculaires, sont parfois visibles sur les images de cryo-TEM de ces systèmes. Des exemples sont présentés en figure 5.14, et des images supplémentaires sont présentées en annexe 5.7.3 pour que le lecteur puisse avoir plusieurs images complètes qui illustrent l'évolution de forme des vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ au cours des chocs hypertoniques.

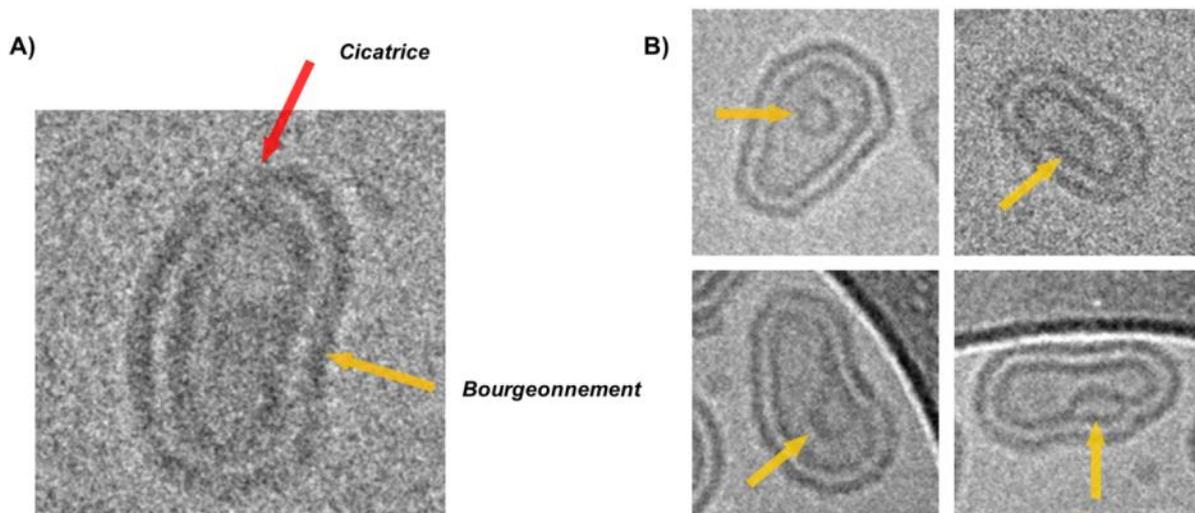


Figure 5.14. Marques résultant de la fusion de membrane sur des vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂. A) vésicule avec une cicatrice dans la membrane (flèche rouge) et B) bourgeonnements intravésiculaires (flèches oranges).

Cette trajectoire d'évolution de forme des vésicules explique également pourquoi la distance entre les deux couches de polymère qui composent les membranes bilamellaires des polymersomes de PDMS_{22-g}-PEO₁₂ est constante pour les deux chocs hypertoniques appliqués. En effet, ces polymersomes ne contenaient initialement aucun soluté donc la concentration intravésiculaire reste nulle quand leur volume réduit diminue. Ils se sont donc vidés autant que possible jusqu'à une limite minimale, qui correspond probablement à la répulsion stérique entre les chaînes de PEO hydratées qui couvrent les surfaces. Pour des vésicules préparées dans de l'eau pure, on devrait en théorie observer la formation de vésicules bilamellaires tant que l'énergie de courbure ne compense pas le gradient de pression osmotique.

Si ces vésicules avaient été préparées avec un soluté encapsulé dans le milieu intravésiculaire, leur forme aurait évolué en suivant les prédictions du modèle ADE jusqu'à atteindre le volume réduit qui correspond à l'équilibre des pressions osmotiques. Il est donc possible, en choisissant avec attention la concentration intravésiculaire initiale, de sélectionner la forme des vésicules une fois celles-ci injectées en milieu physiologique (~ 300 mOsm).²⁴²

Le comportement de ces nano-vésicules en conditions hypertoniques est différent de celui rapporté dans la littérature pour des polymersomes géants, qui forment diverses structures comme des vésicules framboises, des vésicules déformées ou même effondrées sur elle mêmes.^{36, 53} L'évolution de la morphologie est également différente de celle observée pour des polymersomes nanométriques dont les blocs hydrophobes sont rigides car ils forment des demi-sphères quand le volume réduit v est nul.^{131, 132} La connaissance de la trajectoire d'évolution de forme de ces nano-polymersomes permet de contrôler activement leur morphologie finale et donc leurs interactions avec les systèmes biologiques s'ils sont utilisés en tant que vecteurs médicamenteux.

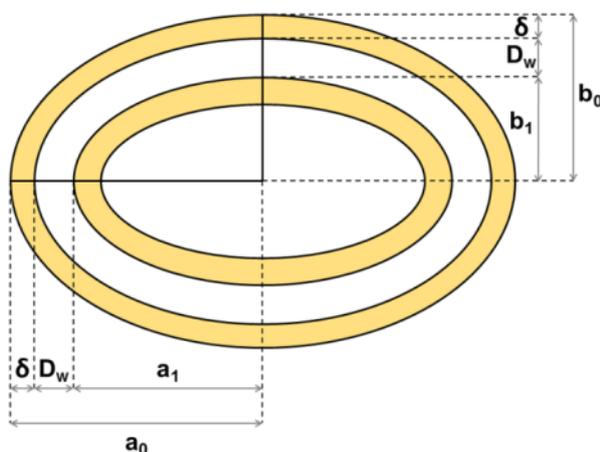
5.5.2 Limite des modèles théoriques

Une partie des résultats observés n'est pas en accord avec le modèle ADE. Les polymersomes de PEO_{17-b}-PDMS_{66-b}-PEO₁₇, qui ont un bloc hydrophobe extrêmement flexible, n'ont pas formé de polymersomes bilamellaires et même pour le PDMS_{22-g}-PEO₁₂ on observe toujours environ un quart de polymersomes unilamellaires suite aux chocs osmotiques. Les résultats des chocs hypertoniques sur les nano-vésicules de PBut_{46-b}-PEO₃₀ semblent eux aussi dévier de la trajectoire de forme prédite par le modèle ADE, la forme finale n'étant probablement pas des vésicules bilamellaires.

5.5.2.1 Epaisseur de la membrane

Une des hypothèses de base du modèle ADE est que l'épaisseur de membrane est négligeable devant le rayon de la vésicule, ce qui n'est pas vérifié ici car l'étude porte sur des nano-polymersomes. Contrairement aux études sur les vésicules géantes, la membrane ne peut donc pas être considérée comme une surface 2D dans un espace 3D. Aussi les images de cryo-TEM ont montré que les polymersomes de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ toujours unilamellaires après les chocs osmotiques semblent plus petits en moyenne que les polymersomes bilamellaires et étaient souvent étirés. Il est possible qu'à cause de leur petite taille la formation d'une invagination soit trop coûteuse en énergie (car l'énergie de courbure locale à fournir varie en $(1/R_1+1/R_2)^2$ et ces objets sont déjà très courbés), ce qui empêche l'étape de transition vers une vésicule bilamellaire. Nous avons ainsi essayé de déterminer s'il y avait un rayon initial minimal R_0^{\min} nécessaire pour former des vésicules bilamellaires lors d'un choc hypertonique.

Le rayon initial de chaque vésicule, unilamellaire et bilamellaire, peut être estimé à partir de leur quantité de surface et correspond au rayon d'une vésicule sphérique de surface équivalente. Comme les vésicules ne sont pas sphériques, ce sont des ellipsoïdes sur les images de cryo-TEM, il faut faire une hypothèse sur leur forme 3D pour être en mesure de calculer leur quantité de surface. Le modèle ADE prédit que pour un faible volume réduit les ellipsoïdes sont de forme prolates, nous avons donc fait l'hypothèse que les polymersomes unilamellaires et bilamellaires anisotropes étaient prolates. Le rayon initial R_0 de chaque vésicule peut donc être calculé comme suivant (figure 5.15) :



a_0 = demi-grand axe de la couche externe

b_0 = demi-petit axe de la couche externe

a_1 = demi-grand axe de la couche interne

$$a_1 = a_0 - (\delta + D_w)$$

b_1 = demi-petit axe de la couche interne

$$b_1 = b_0 - (\delta + D_w)$$

Figure 5.15. Schéma d'une vésicule bilamellaire et paramètres des ellipses correspondantes

L'aire totale du polymersome est la somme de l'aire de chaque ellipsoïde (5.4), avec $i = 1$ pour les polymersomes bilamellaires et $i = 0$ pour les polymersomes unilamellaires :

$$A_{\text{polymersome}} = \sum_i \left(2\pi b_i^2 + \frac{2\pi a_i b_i}{e_i} \sin^{-1}(e_i) \right) = 4\pi R_0^2 = A_{\text{sphère équivalente}} \quad (5.4)$$

avec $e_i = \frac{\sqrt{a_i^2 - b_i^2}}{a_i}$ l'excentricité de chaque ellipse.

Il vient donc :

$$R_0^2 = \frac{1}{4\pi} \sum_i \left(2\pi b_i^2 + \frac{2\pi a_i b_i}{e_i} \sin^{-1}(e_i) \right) \rightarrow R_0 = \left[\sum_i \left(\frac{b_i^2}{2} + \frac{a_i b_i}{2 e_i} \sin^{-1}(e_i) \right) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (5.5)$$

Les valeurs utilisées pour les calculs des rayons initiaux R_0 sont les paramètres des ellipses déterminés pour les rapports d'aspect de chaque vésicule et les valeurs moyennes de δ et D_w issues des analyses précédentes. Pour chaque choc hypertonique observé sur les vésicules de PDMS_{22-g}-PEO₁₂, le rayon initial minimal R_0^{\min} nécessaire pour former un polymersome bilamellaire correspond au rayon initial déterminé sur le plus petit d'entre eux. Pour le choc hypertonique à 250 mM sur les vésicules de PEO_{17-b}-PDMS_{66-b}-PEO₁₇, qui sont beaucoup moins réactives, le rayon minimal R_0^{\min} est estimé à partir des vésicules doubles déjà présentes qui donnent une indication sur la courbure minimale nécessaire pour former ce type de structures. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.6.

| Polymère | δ (nm) | D_w (nm) | Δc (mM) | R_0^{\min} (nm) | $(\delta/R_0)^{\max}$ |
|--|---------------|------------|-----------------|-------------------|-----------------------|
| PDMS _{22-g} -PEO ₁₂ | 5,75 | 3,5 | 100 | 23,7 | 0,24 |
| | | | 250 | 22,9 | 0,25 |
| PEO _{17-b} -PDMS _{66-b} -PEO ₁₇ | 11 | 5,5 * | 250 | 39,2 | 0,28 |

Tableau 5.6. Paramètres de membrane utilisés pour les calculs, valeurs de R_0^{\min} et $(\delta/R_0)^{\max}$ déterminées pour chaque choc hypertonique. *Valeur mesurée sur les 5 plus petits polymersomes bilamellaires observés après le choc hypertonique à 250 mM.

Il n'est pas surprenant de trouver un R_0^{\min} plus élevé pour les vésicules de PEO_{17-b}-PDMS_{66-b}-PEO₁₇ que pour celles de PDMS_{22-g}-PEO₁₂ car l'énergie d'une membrane refermée sur elle-même est proportionnelle à la rigidité de courbure k_c , elle-même proportionnelle à δ^2 . Si en revanche on compare les différents ratios $(\delta/R_0)^{\max}$, on trouve des valeurs très proches pour les deux systèmes.

Il y a un bon accord entre les valeurs minimales R_0^{\min} calculées pour les deux chocs hypertoniques sur les vésicules de PDMS_{22-g}-PEO₁₂ et le rayon initial R_0 estimé pour les

polymersomes après les chocs hypertoniques (figure 5.16). En effet, le rayon initial R_0 estimé pour la plupart des polymersomes qui sont restés unilamellaires est inférieur au rayon limite R_0^{\min} . Le fait que le rayon initial estimé pour certains polymersomes restés unilamellaires soit supérieur à R_0^{\min} peut provenir d'erreurs liées à l'hypothèse faite sur la forme 3D des polymersomes. En effet, la projection d'une vésicule oblate selon son axe de symétrie apparaît comme une sphère (en cryo-TEM), la surface calculée avec notre méthode sera par conséquent très surestimée.

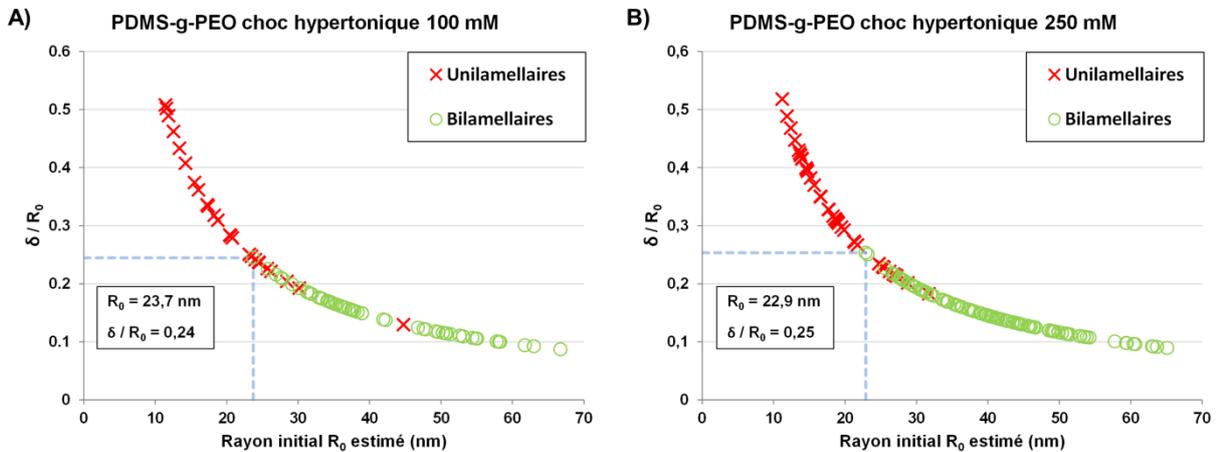


Figure 5.16. Structure finale en fonction du rayon initial déterminé pour les polymersomes de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ après le choc hypertonique à A) 100 mM et B) 250 mM.

Au-dessus d'un ratio $(\delta/R_0)^{\max}$ les vésicules ne suivent plus la même trajectoire d'évolution de forme : elles s'étirent mais ne forment pas de vésicules bilamellaires. C'est donc bien l'épaisseur de membrane non négligeable dans les conditions présentes qui explique la présence de vésicules unilamellaires après les différents chocs hypertoniques sur le PDMS₂₂-g-PEO₁₂. C'est également la raison pour laquelle peu de changements ont été observés pour les polymersomes de PEO₁₇-b-PDMS₆₆-b-PEO₁₇ : suite à la formation, la majorité d'entre eux étaient trop petits pour répondre aux chocs hypertoniques en formant une invagination.

L'utilisation de la cryo-TEM couplée avec des expériences de diffusion de neutrons a permis l'identification et la quantification d'une limite de validité des modèles théoriques, ce qui n'a pas été possible en étudiant ces systèmes par diffusion de la lumière seule^{126, 127} ou en travaillant avec des vésicules géantes.¹²² De plus, il est ainsi intéressant de noter que pour une épaisseur de membrane donnée les vésicules bilamellaires ne peuvent être obtenues que pour une certaine gamme de taille : les vésicules géantes unilamellaires forment des structures « framboise » en conditions hypertoniques (chaque invagination fait plusieurs micromètres) et les vésicules dont le rayon est plus petit que R_0^{\min} forment des ellipsoïdes (figure 5.17).

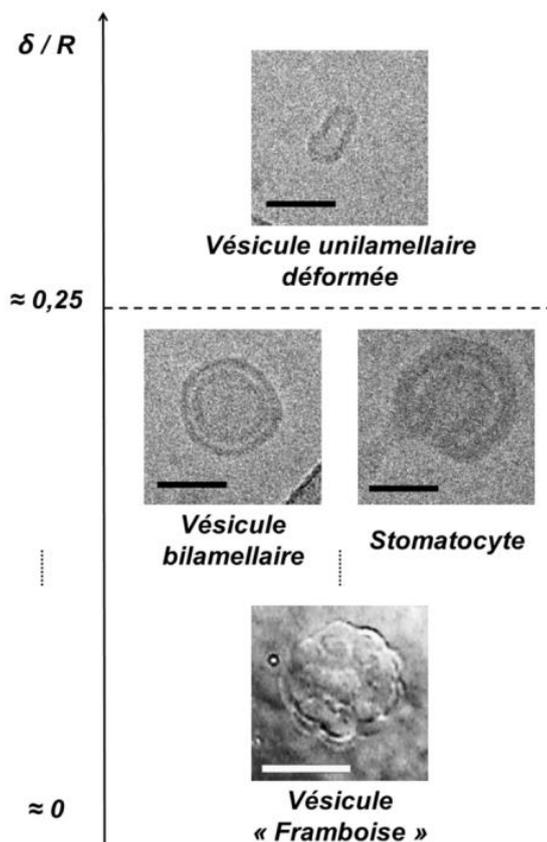


Figure 5.17. Morphologies finales attendues pour des vésicules formées dans l'eau et soumises à des chocs hypertoniques en fonction du rapport entre l'épaisseur de la membrane et le rayon initial. La figure est faite en utilisant une image cryo-TEM d'une vésicule de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ (image du milieu à gauche), des images cryo-TEM des vésicules de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ (images du haut et du milieu à droite) et une image de microscopie d'une vésicule framboise de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ (image du bas)³⁶. Les barres d'échelle noires représentent 50 nm et la barre d'échelle blanche 20 μm.

5.5.2.2 Nature de la membrane

La plupart des nano-polymersomes de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ qui ont formé une invagination sont restés sous forme de stomatocyte et n'ont pas atteint la structure de polymersomes bilamellaires, bien que le R_0 déterminé pour la plupart d'entre eux soit supérieur au R_0^{\min} . Une explication possible est l'architecture bien définie des chaînes polymères, car chaque couche de la membrane correspond à une monocouche de polymères triblocs et non à une bicouche classique de polymères diblocs. Cela défavorise la fermeture des stomatocytes car toutes les chaînes de PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ impliquées dans la fusion de la membrane auraient à passer en conformation « hairpin » lors de l'étape d'hémifusion pour éviter tout contact entre le cœur hydrophobe de la membrane et l'eau. Cela accroît le coût énergétique d'un tel évènement et le rend moins favorable (figure 5.18) :

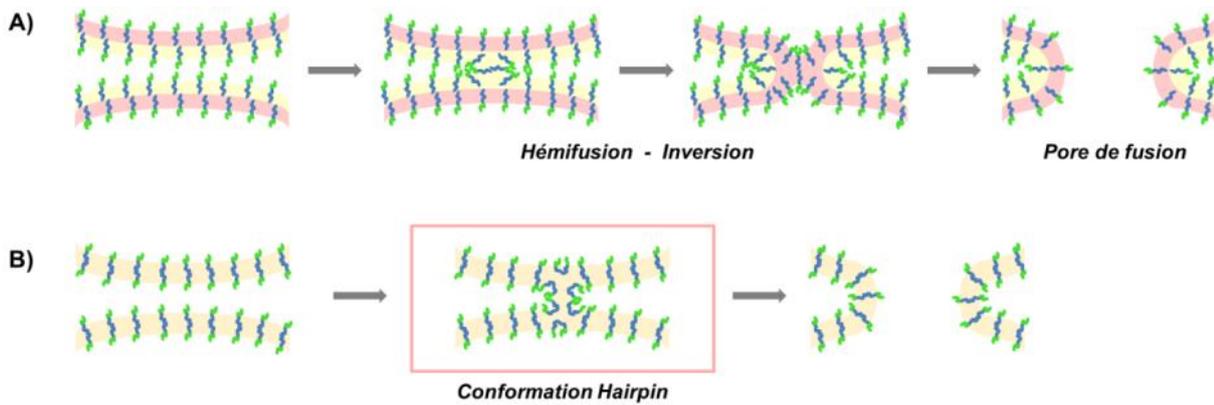


Figure 5.18. Schéma de la fusion de membrane pour des membranes formées par A) des copolymères diblocs et B) des copolymères triblocs. Nous croyons que l'étape d'hémifusion de la membrane est possible avec des copolymères formant des bicouches, tels que le PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂, mais est défavorisée pour un copolymère tribloc tel que le PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇.

La nature chimique de la membrane semble également être un paramètre déterminant. Les résultats actuels sur les nano-vésicules de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ semblent indiquer une trajectoire d'évolution de forme qui diffère de celle observée pour les vésicules dont la couche hydrophobe de la membrane est en PDMS. Ce résultat est probablement la combinaison de deux effets : il est possible que la gamme de taille étudiée soit trop restreinte et que dans le même temps la membrane ne soit plus suffisamment « fluide » à température ambiante pour permettre les changements de forme prédits par le modèle ADE. La morphologie observée serait alors une étape transitoire bloquée car les objets ne peuvent pas assez se courber.

5.5.3 Autres effets

5.5.3.1 Disparitions des micelles allongées

Les images de cryo-TEM du PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ montrent la disparition de la quasi-totalité des micelles allongées suite au choc hypertonique. Dans la description classique de l'auto-assemblage de copolymères amphiphiles en solution, le paramètre qui gouverne la morphologie finale des agrégats est la fraction massique hydrophile f du copolymère.^{9, 12} Elle représente la taille relative des blocs hydrophiles et hydrophobes qui déterminent la courbure de l'interface hydrophile / hydrophobe. Pour des copolymères coil-coil diblocs, une fraction hydrophile f entre 40 et 50 % conduit à des objets de type micelles allongées. Une fraction hydrophile plus basse, équivalente à une interface hydrophile / hydrophobe moins courbée, entraîne la formation de morphologies vésiculaires. Dans le cas présent, le copolymère utilisé est un tribloc mais la présence simultanée de vésicules et de micelles allongées en conditions isotoniques indique que nous sommes à une valeur de f intermédiaire qui ne favorise

franchement aucun des deux types de structure. Comme pour le léger épaissement de membrane observé sur ce système en conditions hypertoniques, il est possible que l'ajout de glucose entraîne une légère déshydratation des chaînes de PEO.²³⁹ Cela diminue la courbure de l'interface PDMS / PEO et favorise la formation de vésicules. C'est probablement la raison de la disparition des micelles allongées en conditions hypertoniques.

5.5.3.2 Polymersomes bilamellaires déformés

Suite à la transformation d'un polymersome unilamellaire en polymersome bilamellaire, le nouveau milieu intravésiculaire est la solution utilisée pour appliquer le choc hypertonique. Une fois la couche hydrophile entre les deux couches de polymère déshydratée, il n'y a donc plus de gradient de concentration de glucose avec le milieu extérieur et les vésicules bilamellaires se retrouvent en conditions isotoniques. Elles devraient donc être sphériques quel que soit le rapport d'aspect de la vésicule unilamellaire de départ, car cela revient simplement à changer de morphologie en suivant la même trajectoire d'évolution de forme mais en débutant avec un volume réduit inférieur à 1. Les observations faites sur les polymersomes bilamellaires de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ après le choc hypertonique à 100 mM vont bien dans ce sens. Cependant, nous ne comprenons pas encore pourquoi les mêmes vésicules bilamellaires sont déformées suite au choc hypertonique à 250 mM. Il est possible qu'à des concentrations aussi élevées en glucose, la déshydratation des chaînes de PEO modifie la courbure spontanée de la membrane, changeant légèrement la trajectoire d'évolution de forme suivie par les vésicules.

5.6 Conclusion

Des copolymères ayant différentes architectures, poids moléculaires et nature de bloc hydrophobe ont été utilisés afin de comprendre les paramètres qui gouvernent les changements de structure de vésicules polymère à l'échelle nanométrique dans des conditions de déséquilibre osmotique. La connaissance des différentes morphologies accessibles et du moyen de les atteindre permet de maîtriser la forme des vésicules et ainsi d'optimiser les performances de ces systèmes pour les applications de vectorisation.

Comme pour les polymersomes géants, les chocs hypotoniques entraînent des cycles de gonflement/dégonflement des vésicules. Cela n'implique pas de changement de la forme des vésicules, qui restent sphériques. Les chocs hypertoniques conduisent à des comportements plus compliqués. Pour des membranes très souples à température ambiante, formées avec un bloc hydrophobe de PDMS, les résultats obtenus sont les suivants :

- Les vésicules unilamellaires de PDMS₂₂-*g*-PEO₁₂ se transforment en vésicules bilamellaires dans de telles conditions d'osmolarité. Les paramètres de membrane obtenus sont les mêmes pour les deux chocs hypertoniques appliqués.
- La trajectoire d'évolution de leur forme semble en accord avec les prédictions du modèle ADE, bien que l'épaisseur de membrane ne soit pas négligeable devant la valeur du rayon des vésicules.
- Une limite de validité du modèle, mise en avant pour deux types de membranes différents (formées *via* l'auto-assemblage de copolymères greffés ou triblocs), a été identifiée : au-dessus d'un rapport épaisseur de membrane / rayon initial de la vésicule ($\delta/R \approx 0,25$), la formation d'une invagination n'est plus possible, les vésicules s'étirent mais restent unilamellaires.
- L'architecture du copolymère joue un rôle crucial sur la morphologie finale des vésicules soumises à un choc hypertonique. Les vésicules obtenues par auto-assemblage d'un copolymère tribloc (PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇) n'évoluent pas plus loin que la forme stomatocyte, l'architecture monocouche de la membrane défavorisant l'étape de fusion qui permet d'atteindre une structure bilamellaire.

La nature chimique du bloc hydrophobe semble également importante. Les résultats obtenus en appliquant des chocs hypertoniques sur des nano-vésicules de PBut₄₆-*b*-PEO₃₀ semblent indiquer que le caractère moins flexible du bloc hydrophobe impacte la trajectoire d'évolution de forme.

5.7 Annexes

5.7.1 Viscosité des solutions de glucose

Les valeurs de viscosité utilisées pour les mesures de rayon hydrodynamique ont été déterminées en ajustant une courbe polynomiale aux mesures de viscosité des différentes solutions de glucose (figure 5.19).

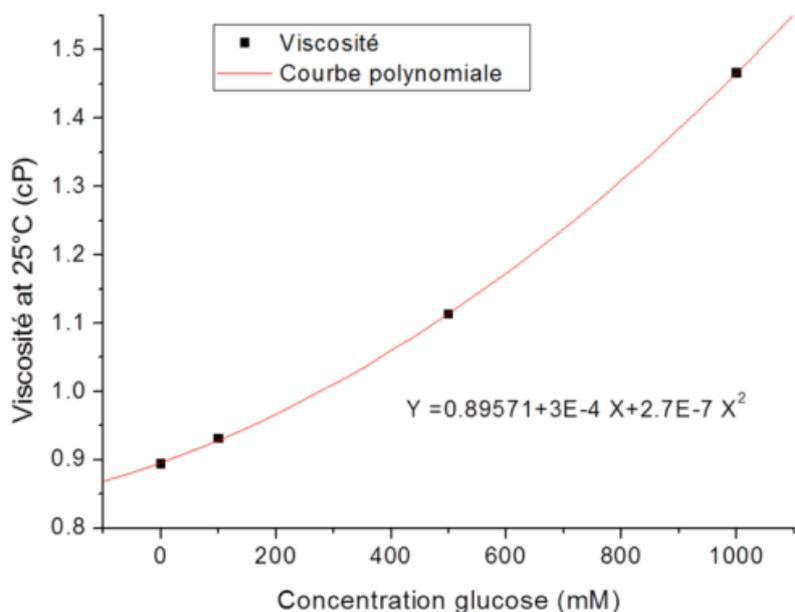


Figure 5.19. Viscosité mesurée en fonction de la concentration en glucose (0 / 0,1 / 0,5 et 1M) par viscosimétrie capillaire à 25 °C.

La viscosité des solutions de glucose pour le calcul du rayon hydrodynamique R_H a été prise en compte *via* l'équation de Stokes-Einstein, valable pour la diffusion de particules sphériques dans un liquide de faible nombre de Reynolds :

$$D = \frac{K_b T}{6\pi\eta R_h}$$

5.7.2 DNPA : choc hypotonique

Un échantillon de vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ soumises à un choc hypotonique a été étudié en diffusion de neutrons aux petits angles afin de confirmer que cela n'entraînait pas de changement de morphologie ou de réorganisation de la membrane.

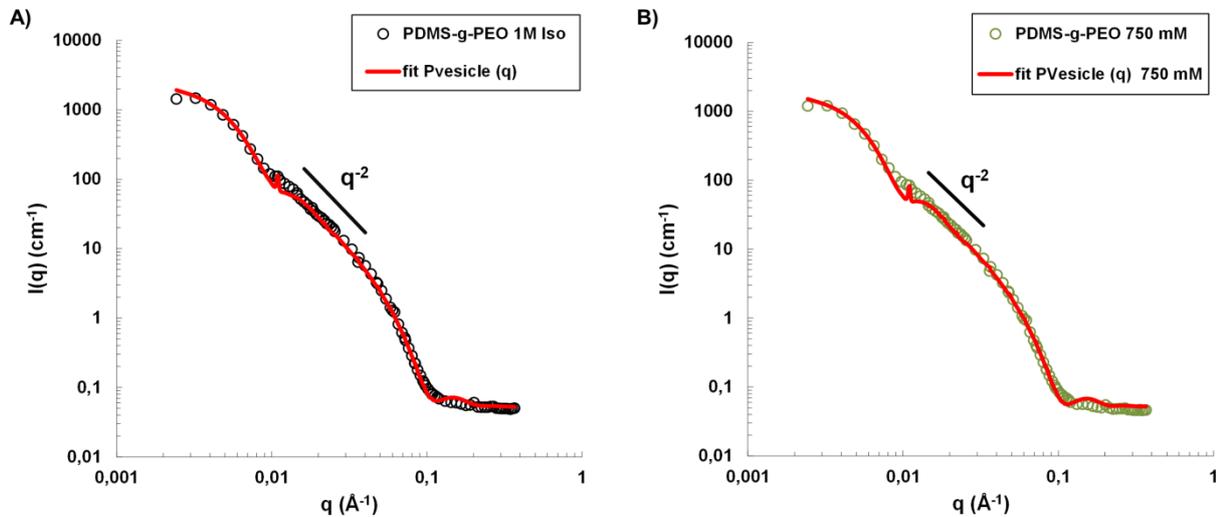


Figure 5.20. Données expérimentales de DNPA obtenues sur les nano-polymersomes de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ en conditions (A) isotoniques et (B) hypotoniques avec un gradient de concentration de glucose de 250 mM. Les courbes rouges sur les points expérimentaux représentent les ajustements obtenus avec un modèle de vésicules polydisperses.

| Echantillon | Conditions | R_c (nm) | σ_R | δ (nm) | σ_δ |
|-------------|--------------|------------|------------|---------------|-----------------|
| Dow 1M | Isotoniques | 23,2 | 0,29 | 5,6 | 0,11 |
| Dow 750 mM | Hypotoniques | 24,9 | 0,25 | 5,6 | 0,05 |

Tableau 5.7. Paramètres déterminés lors des ajustements d'un modèle de vésicules polydisperses aux vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ avant et après un choc hypotonique.

Les courbes obtenues avant et après le choc sont identiques (figures 5.20.A et 5.20.B), les polymersomes ne semblent pas changer en conditions hypotoniques. La décroissance en q^{-2} de l'intensité diffusée aux petits vecteurs d'onde q met en avant une morphologie de vésicules unilamellaires. C'est la raison pour laquelle les ajustements ont été réalisés avec un modèle de vésicules polydisperses. Les résultats déterminés (tableau 5.7), identiques, confirment l'invariance de la taille des vésicules et de l'épaisseur de membrane. Comme pour les vésicules géantes, il est probable qu'en conditions hypotoniques les nano-polymersomes soient soumis à des cycles de gonflement-dégonflement (fuite) une fois la déformation de membrane maximale atteinte. Dans ces cas-là, la forme des polymersomes reste sphérique.

5.7.3 PDMS₂₂-g-PEO₁₂ : images de cryo-TEM supplémentaires

Dans cette section, d'autres images de cryo-TEM obtenues pour les vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ dans les différentes conditions d'osmolarité sont présentées (figure 5.21) afin que le lecteur puisse avoir plusieurs images complètes qui illustrent l'évolution de forme des vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ au cours des chocs hypertoniques.

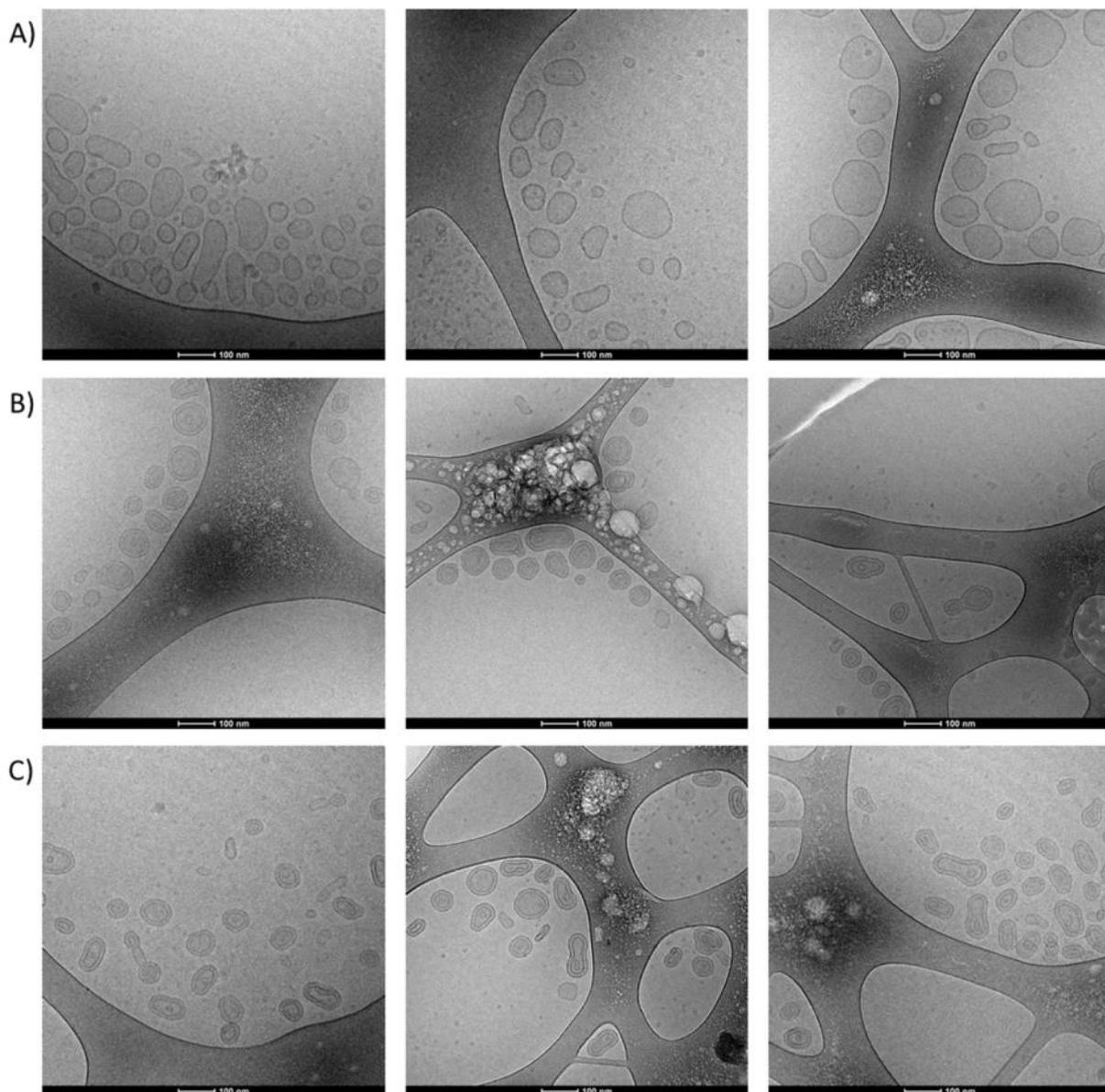


Figure 5.21. Images de cryo-TEM des nano-polymersomes de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ en conditions A) isotoniques, B) de choc hypertonique 100 mM et C) de choc hypertonique 250 mM.

Les images du système en conditions isotoniques montrent une grande majorité de vésicules unilamellaires (figure 5.21.A) alors que suite aux chocs hypertoniques il y a de nombreuses vésicules bilamellaires (figures 5.21.B et 5.21.C).

5.7.4 Complémentarité cryo-TEM / DNPA

Il est primordial d'utiliser des techniques complémentaires telles que la cryo-TEM et la DNPA pour caractériser le comportement d'objets à l'échelle nanométrique. En plus de pouvoir utiliser des données statistiques de cryo-TEM pour améliorer le traitement des courbes de diffusion de neutrons, les deux techniques se valident mutuellement.

Avant d'obtenir les résultats présentés dans ce chapitre, y compris les images de cryo-TEM, les courbes de diffusion de neutrons avaient été traitées en utilisant d'autres modèles (un exemple est donné en figure 5.22.A). Dans ces modèles, de nombreuses petites sphères de rayon r_s avaient été collées aux parois d'une vésicule mère (côtés interne et/ou externe, sur la surface ou à partir du centre de la membrane). Cela permettait de représenter des replis de la membrane et ainsi modéliser l'équivalent d'une forme « framboise » à l'échelle nanométrique. L'oscillation qui apparaît dans le domaine des q intermédiaires aurait alors été due à la distance moyenne entre les sphères.

Les résultats obtenus semblaient crédibles tant d'un point de vue graphique que pour la majeure partie des paramètres déterminés (figure 5.22.B). La seule incohérence provenait du taux de recouvrement de la surface (rapport du nombre de sphères greffées à la surface de la vésicule mère et de la quantité de sphères qu'il est possible de greffer) qui était légèrement supérieur à 1.

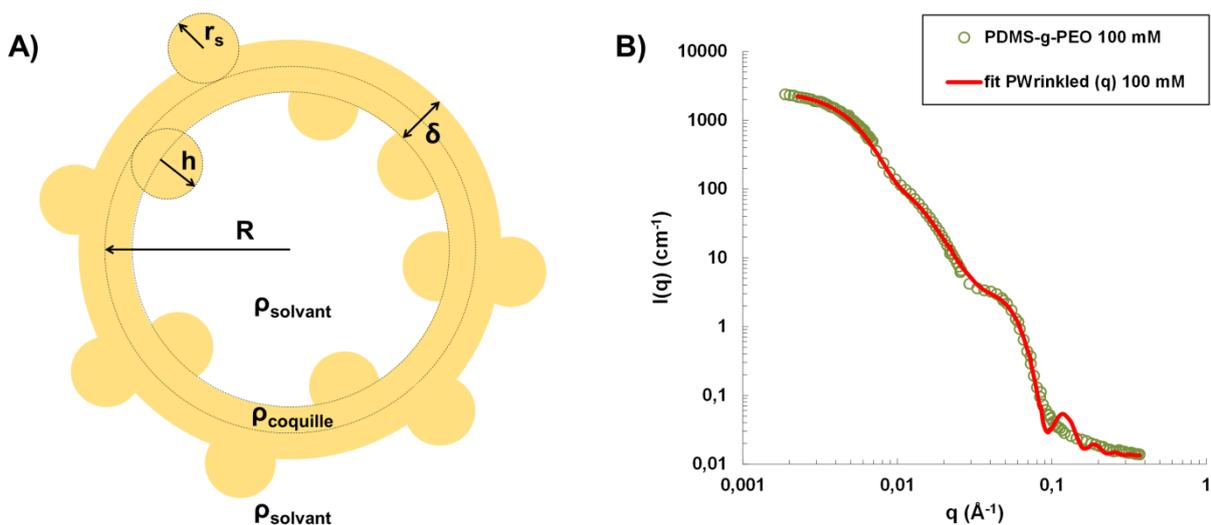


Figure 5.22. A) Modèle de vésicule « ridée » qui consiste en une vésicule de rayon R avec N sphères de rayon r_s collées au centre de la membrane d'épaisseur δ . B) Meilleure courbe obtenue avec ce modèle. Les images de cryo-TEM ont montré que ce modèle était inadapté pour traiter les données de DNPA.

Ce sont les images de cryo-TEM qui ont révélé que les modèles utilisés n'étaient pas représentatifs du système. Il est donc très important d'avoir une visualisation directe des structures obtenues pour confirmer ou infirmer les différents modèles théoriques qui peuvent correspondre aux données expérimentales.

D'un autre côté, il est aussi arrivé d'avoir des artefacts sur certaines images de cryo-TEM liés à la préparation de l'échantillon. Il y a, par exemple, des images de vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ en conditions isotoniques où on observe une majorité de structures ayant une double membrane dont de nombreux stomatocytes, facilement différenciables des vésicules bilamellaires fermées (figure 5.23).

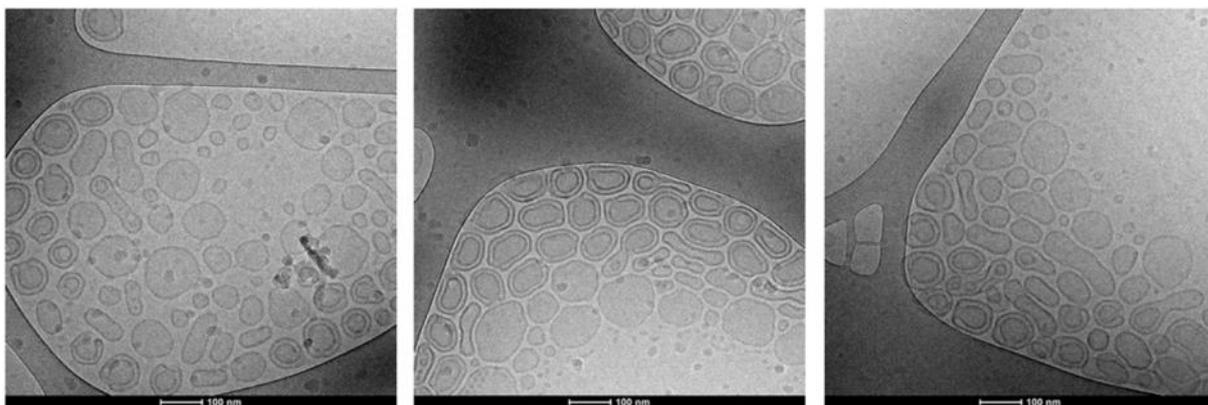


Figure 5.23. Images de cryo-TEM avec de nombreux stomatocytes, qui sont des artefacts liés à la préparation de l'échantillon.

Un premier signe qui laisse penser que ce sont des artefacts est qu'il y a une ségrégation entre les structures : les vésicules ayant une double membrane sont toujours proches de la grille alors qu'en s'éloignant des parois on retrouve des vésicules unilamellaires. Cet effet est vraisemblablement lié à un cisaillement qui apparaîtrait lors de la formation de la glace sur certains échantillons. Ce sont les données de DNPA qui ont permis d'écarter ces images car le traitement des courbes a confirmé que les vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ sont majoritairement unilamellaires suite à leur formation.

Il faut donc les deux techniques pour obtenir une caractérisation complète des différentes structures à l'échelle nanométrique, tant au niveau de la mesure des divers paramètres physiques que pour valider les observations et les modèles choisis.

5.7.5 Polydispersité en forme équivalente à polydispersité sur le rayon

Les images de cryo-TEM des nano-polymersomes de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ ont mis en avant une polydispersité en forme en plus d'une polydispersité en taille. Il était important de vérifier les répercussions que cela implique pour le traitement des données de DNPA. La méthode suivie a été de simuler la courbe qui serait obtenue pour une solution d'ellipsoïdes ayant différents rapports d'aspect et de la comparer avec celle d'une solution de vésicules sphériques. Le signal de diffusion correspondant à des vésicules sphériques a été obtenu avec un modèle de vésicules qui utilise les paramètres déterminés pour les nano-polymersomes de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ en conditions isotoniques : $R_c = 33$ nm et $\delta = 5,75$ nm (les polydispersités sur ces paramètres sont volontairement fixées à zéro). Le signal de diffusion de chaque type d'ellipsoïdes a été simulé avec un modèle d'ellipsoïdes cœur-écorce. L'épaisseur de l'écorce est $\delta = 5,75$, comme pour les vésicules sphériques, et les tailles des différents rayons du cœur ont été calculées pour différents rapports d'aspect r tout en conservant la même surface que les vésicules sphériques. Le rapport d'aspect r est défini comme le rapport entre le demi-petit axe b et le demi grand-axe a des ellipsoïdes de révolution.

Pour des ellipsoïdes de forme prolata, le demi-grand axe a est le rayon polaire et le demi-petit axe b le rayon équatorial. On peut calculer a en fonction du rayon du cœur de la sphère R_c de même surface et du rapport d'aspect r souhaité comme suivant :

$$a_{prolate} = R_c \sqrt{\frac{2e}{e r^2 + r \sin^{-1}(e)}}$$

Avec $e = \sqrt{1 - r^2}$ l'excentricité de l'ellipse.

Pour des ellipsoïdes de forme oblate, le demi-grand axe a est le rayon équatorial et le demi-petit b axe le rayon polaire. La valeur de a est alors :

$$a_{oblate} = \left[\frac{4e R_c^2}{2e + r^2 \ln\left(\frac{1+e}{1-e}\right)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Les courbes obtenues pour les ellipsoïdes de différents rapports d'aspect sont (figure 5.24) :

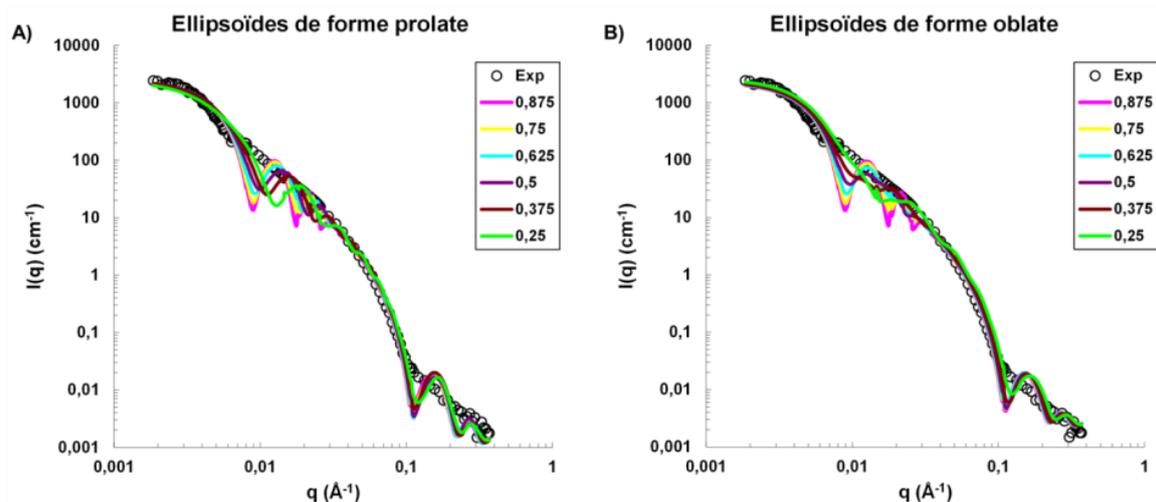


Figure 5.24. Courbes simulées avec un modèle d’ellipsoïdes cœur-écorce pour des ellipsoïdes de forme A) prolate et B) oblate ayant différents rapports d’aspect. Les données expérimentales correspondent aux vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ en conditions isotoniques.

Pour obtenir les courbes de diffusion des solutions d’ellipsoïdes, chaque courbe simulée par rapport d’aspect est pondérée en utilisant la distribution déterminée en cryo-TEM sur les vésicules de PDMS₂₂-g-PEO₁₂ en conditions isotoniques. Les courbes totales sont comparées à deux courbes obtenues avec le modèle de vésicules : sans polydispersité et avec une polydispersité $\sigma_{Rc} = 0,1$.

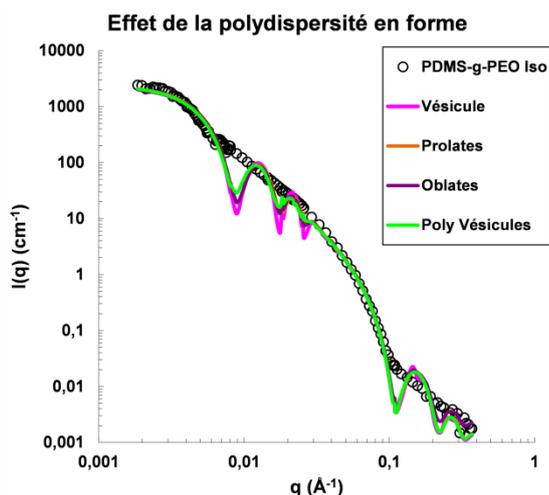


Figure 5.25. Comparaison des courbes simulées pour les mélanges d’ellipsoïdes de formes prolates (courbe orange) et oblates (courbe violette) avec les courbes simulées par un modèle de vésicules sans polydispersité (courbe rose) et avec une polydispersité de 0,1 sur le rayon (courbe verte).

Les deux courbes de mélange d’ellipsoïdes ressemblent à la courbe obtenue avec un modèle de vésicules sans polydispersité à laquelle on aurait légèrement atténué les oscillations. C’est équivalent à une légère polydispersité sur la valeur du rayon des vésicules, inférieure à 0,1 comme on le voit sur la figure 5.25.

5.7.6 PEO₁₇-*b*-PDMS₃₉-*b*-PEO₁₇

L'étude de ce système a seulement été réalisée par DNPA, et les structures formées par auto-assemblage ne semblent pas être des vésicules de taille nanométrique. Différents modèles ont été utilisés pour traiter les données expérimentales et les meilleurs résultats ont été obtenus pour un facteur de forme de cylindres flexibles (figure 5.26).

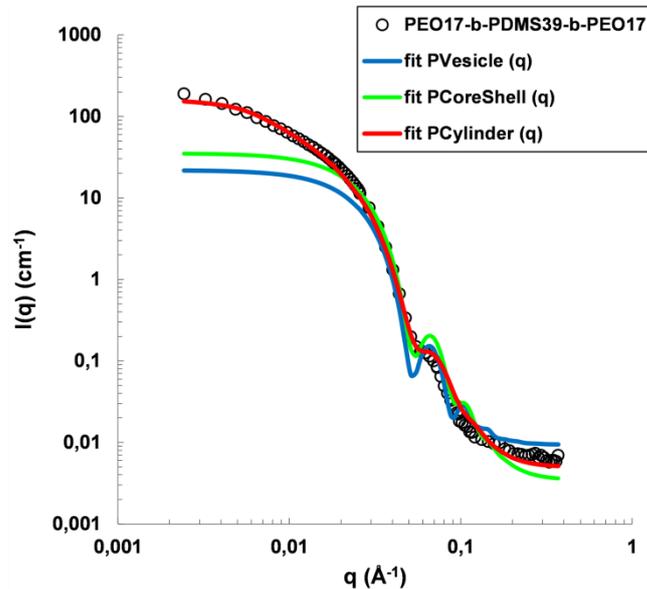


Figure 5.26. Données expérimentales de DNPA pour les structures de PEO₁₇-*b*-PDMS₃₉-*b*-PEO₁₇ en conditions isotoniques.

Ces résultats sont en accord avec les observations cryo-TEM des structures formées avec le PEO₁₇-*b*-PDMS₆₆-*b*-PEO₁₇ (bloc hydrophobe de poids moléculaire plus élevé) où un mélange de vésicules et de micelles allongées avait été obtenu en conditions isotoniques. Dans le cas présent, la longueur de la chaîne hydrophobe est plus courte donc la fraction hydrophile f du tribloc plus élevée. L'interface hydrophile / hydrophobe est plus courbée et la formation de micelles allongées est favorisée par rapport à la formation de structures vésiculaires.

Conclusion générale

Conclusion générale

Au cours de ces travaux de thèse, de multiples voies permettant la modulation des propriétés de membrane des vésicules ont été explorées afin d'élucider les relations structure membranaires / propriétés de ces systèmes auto-assemblés et ainsi rationaliser leur conception. Pour cela, différents copolymères à blocs amphiphiles ont été synthétisés et leur auto-assemblage en solution étudié afin de pouvoir explorer les propriétés de membrane et leur modulation *via* des approches de formulation. L'influence des paramètres moléculaires des copolymères amphiphiles, qui forment la membrane, sur l'évolution de forme de vésicules nanométriques a ensuite été étudiée.

Deux blocs hydrophiles ont été sélectionnés pour la préparation de nouveaux copolymères amphiphiles : le poly(oxyde d'éthylène) PEO et le poly(acide-L-glutamique) PGA. Ils sont tous deux biocompatibles, l'un neutre et l'autre chargé négativement afin de moduler la charge de surface des vésicules et donc modifier les propriétés de nucléation vis-à-vis du carbonate de calcium lors d'expériences de minéralisation. Les stratégies de synthèse choisies ont permis d'utiliser des chaînes de poly(diméthylsiloxane) diamminées H₂N-PDMS-NH₂ pour les deux types de réaction, ces composés jouant à la fois le rôle de blocs hydrophobes finaux et de réactifs. Les polymérisations par ouverture de cycle des monomères N-Carboxy Anhydride de Benzyle-L-Glutamate BLG-NCA à partir des amines primaires portées par les macro-amorceurs ont conduit aux copolymères PBLG-*b*-PDMS-*b*-PBLG, et leur caractérisation a montré que les degrés de polymérisation visés avaient été obtenus. Le clivage des groupements benzyles par hydrolyse basique a ensuite permis l'obtention des copolymères amphiphiles PGA-*b*-PDMS-*b*-PGA. Bien que la mise en œuvre de ces copolymères se soit avérée difficile - seuls deux d'entre eux ont pu être dispersés à l'échelle moléculaire - il a toutefois été possible de former des vésicules géantes par électroformation, prouvant ainsi que ces amphiphiles sont adaptés à la formation de structures vésiculaires. En revanche, ces vésicules n'ont pas encore pu être récupérées intactes afin de mener à bien l'étude de leurs propriétés de membrane et de déterminer l'influence que pourraient avoir les groupements carboxyliques sur diverses applications. L'utilisation de systèmes microfluidiques pour former des vésicules géantes est une perspective très prometteuse pour cette classe d'amphiphiles, car elle permet de s'affranchir des difficultés liées à la récupération des vésicules tout en autorisant l'encapsulation de concentrations salines suffisantes, une autre limitation de la technique d'électroformation.

Les copolymères utilisant le PEO comme composant hydrophile ont été préparés avec succès par couplages entre les chaînes de PDMS diamminées $\text{H}_2\text{N-PDMS-NH}_2$ et des blocs de PEO fonctionnalisés avec un groupement ester N-hydroxysuccinimide PEO-NHS. La technique d'électroformation s'est révélée efficace pour former des vésicules géantes unilamellaires, particulièrement avec le $\text{PEO}_{17}\text{-}b\text{-PDMS}_{66}\text{-}b\text{-PEO}_{17}$ dont la fraction massique hydrophile est de 23,4%.

En plus de la modulation espérée des propriétés de membrane, l'étude de la formation de vésicules « hybrides » avec le copolymère précédent a tout d'abord mis en avant l'influence de la masse molaire du copolymère utilisé dans le mélange polymère / lipide (DPPC ou POPC) sur la structuration de la membrane. Des vésicules hybrides stables présentant une répartition statistique des composants dans la membrane (sans domaines) ont été obtenues pour une large gamme de compositions molaires. Par comparaison à un polymère commercial permettant de former des domaines lipidiques dans les membranes, le $\text{PDMS}_{22}\text{-}g\text{-PEO}_{12}$, il apparaît que le $\text{PEO}_{17}\text{-}b\text{-PDMS}_{66}\text{-}b\text{-PEO}_{17}$ ne possède pas une mobilité latérale suffisante pour autoriser une séparation de phase spontanée, donc la formation de domaines à l'échelle micrométrique, et ce quelle que soit la fluidité de la phase lipidique. Les mesures des coefficients de perméabilité à l'eau des polymersomes et des vésicules hybrides 75% molaire copolymère / 25% molaire lipide n'ont pas montré d'évolution significative liée à l'inclusion de lipides : au moins pour cette composition, la perméabilité à l'eau apparaît comme étant limitée par celle de la matrice polymère. La formation des domaines lipidiques fluides semble donc nécessaire pour modifier la perméabilité à l'eau des vésicules hybrides. Par ailleurs, il n'a pas été possible d'étudier des compositions plus riches en lipides avec la méthode employée, *i.e.* des chocs hypotoniques en piège microfluidique, car les vésicules ainsi formées semblent plus fluides et ne sont pas retenues par les pièges. Pour confirmer et compléter ces résultats, il sera nécessaire d'explorer ces mélanges avec des techniques de manipulation en micropipette.

L'utilisation d'un transporteur ionique, la calcimycine, augmente la perméabilité des polymersomes de $\text{PEO}_{17}\text{-}b\text{-PDMS}_{66}\text{-}b\text{-PEO}_{17}$ aux ions calcium. Ces vésicules étant par nature très peu perméables aux espèces ioniques, cela permet leur utilisation comme réacteur de minéralisation. De façon intéressante, pour les faibles concentrations en calcimycine, la cinétique de précipitation intravésiculaire du carbonate de calcium semble dépendre de la quantité d'ionophore utilisée.

En parallèle à ce travail sur les vésicules géantes, des copolymères ayant différentes masses molaires, nature de bloc hydrophobe et architectures ont été utilisés afin de comprendre

les paramètres qui gouvernent les changements de forme de vésicules polymères à l'échelle nanométrique. En effet, la trajectoire d'évolution de forme des vésicules fluides est connue pour les vésicules géantes mais était inexplorée pour les polymersomes nanométriques. Pourtant, la forme des particules influence leurs interactions avec les systèmes biologiques et ce sont des objets nanométriques qui sont utilisés pour la vectorisation de principes actifs ; il est donc important de maîtriser leurs formes pour optimiser leurs performances.

Les vésicules nanométriques ont été préparées par émulsion double – évaporation suivie d'une étape d'extrusion, et leurs changements de forme ont été provoqués par des contraintes osmotiques. Il apparaît que les chocs hypotoniques entraînent des cycles de gonflement / dégonflement, comme pour les vésicules géantes. Les chocs hypertoniques conduisent quant à eux à des comportements plus complexes qui ont été étudiés par diffusion de neutrons aux petits angles DNPA et cryo-TEM. Cette combinaison d'expériences permettant une information statistique et individuelle sur des échelles d'observation différentes et une analyse combinée dans l'espace direct et réciproque, a permis une analyse fine et inédite de ces changements de forme des polymersomes à l'échelle nanométrique. Pour des membranes très fluides formées avec du PDMS comme bloc hydrophobe, les vésicules unilamellaires remplies d'eau changent de forme *via* l'apparition d'une invagination. Celle-ci va conduire soit à une vésicule bilamellaire pour le PDMS_{22-g}-PEO₁₂, soit à un stomatocyte pour le PEO_{17-b}-PDMS_{66-b}-PEO₁₇ car la structure monocouche de la membrane formée par ce copolymère tribloc défavorise l'étape de fusion qui permet d'atteindre la morphologie bilamellaire. De plus, il apparaît que cette trajectoire d'évolution de forme, qui est en accord avec les prédictions théoriques du modèle ADE, est uniquement valable quand le rapport épaisseur de membrane / rayon initial de la vésicule (δ/R) est inférieur à 0,25. Au-delà de cette valeur limite la formation d'une invagination n'est plus possible, les vésicules s'étirent mais restent unilamellaires. La nature chimique du bloc hydrophobe semble également importante. Les résultats obtenus en appliquant des chocs hypertoniques sur des nano-vésicules de PBut_{46-b}-PEO₃₀ semblent indiquer que le caractère moins flexible du bloc hydrophobe impacte la trajectoire d'évolution de forme. Des analyses complémentaires sont en cours afin de déterminer avec précision la structure finale obtenue et ainsi comprendre les différents phénomènes qui régissent l'évolution de forme de ces objets à l'échelle nanométrique.

A court terme, une des suites logiques de ce travail serait de mener une étude sur la formation de vésicules géantes de PGA-*b*-PDMS-*b*-PGA en utilisant un système microfluidique. Ces copolymères étant adaptés à la formation de membranes et pouvant être

rendus perméables aux ions calcium, il serait ainsi possible de déterminer l'influence de la nature chimique du bloc hydrophile comme partenaire de nucléation dans les processus de minéralisation intravésiculaire. Ces résultats apporteraient une pierre à l'édifice qu'est la conception des matériaux de demain, le poly(acide glutamique) présentant un intérêt particulier car il permet de mimer les glycoprotéines acides adsorbées sur la matrice organique entourant les cristaux de carbonate de calcium dans la nacre. La perméabilité aux ions calcium semblant dépendre de la quantité de calcimycine utilisée, il est également possible d'envisager des études combinant les influences du bloc hydrophile et de la cinétique de précipitation, sur le polymorphisme des précipités par exemple.

Aussi, les résultats sur l'évolution de forme des vésicules nanométriques ouvrent de nouvelles perspectives quant à leur utilisation pour la vectorisation de principes actifs. Une étude systématique de l'influence de chaque paramètre moléculaire mais également de la taille des vésicules devrait permettre d'identifier les déviations qu'il existe par rapport au modèles théoriques à cette échelle. A terme, cela devrait permettre d'anticiper et de contrôler la forme des vecteurs une fois injectés en milieu physiologique afin d'étudier le rôle que joue la morphologie des polymersomes sur leur profil de biodistribution. Ces connaissances pourraient permettre d'améliorer les performances des systèmes de vectorisation et ainsi avoir des répercussions directes sur l'efficacité des traitements.

Références

Références

1. Economie-Finance, C. d. d. <http://www.economie.gouv.fr/cedef/dossier-documentaire-nanotechnologies>. (accessed 01/11/2013).
2. Sanson, C.; Diou, O.; Thévenot, J.; Ibarboure, E.; Soum, A.; Brûlet, A.; Miraux, S.; Thiaudière, E.; Tan, S.; Brisson, A., *et al.* Doxorubicin Loaded Magnetic Polymersomes: Theranostic Nanocarriers for MR Imaging and Magneto-Chemotherapy. *ACS Nano* **2011**, *5*, 1122-1140.
3. Renggli, K.; Baumann, P.; Langowska, K.; Onaca, O.; Bruns, N.; Meier, W. Selective and Responsive Nanoreactors. *Advanced Functional Materials* **2011**, *21*, 1241-1259.
4. Picker, A.; Nuss, H.; Guenoun, P.; Chevillard, C. Polymer Vesicles as Microreactors for Bioinspired Calcium Carbonate Precipitation. *Langmuir* **2011**, *27*, 3213-3218.
5. Nicolas, J.; Mura, S.; Brambilla, D.; Mackiewicz, N.; Couvreur, P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 1147-1235.
6. Le Meins, J. F.; Sandre, O.; Lecommandoux, S. Recent trends in the tuning of polymersomes' membrane properties. *Eur. Phys. J. E* **2011**, *34*, 1-17.
7. Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 6288-6308.
8. Zhu, W.; Lin, J.; Cai, C.; Lu, Y. Biomimetic mineralization of calcium carbonate mediated by a polypeptide-based copolymer. *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1*, 841-849.
9. Discher, D. E.; Ahmed, F. Polymersomes. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2006**, *8*, 323-341.
10. Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* **1976**, *72*, 1525-1568.
11. Zhang, J.; Li, X.; Li, X. Stimuli-triggered structural engineering of synthetic and biological polymeric assemblies. *Progress in Polymer Science* **2012**, *37*, 1130-1176.
12. Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces, Second Edition: With Applications to Colloidal and Biological Systems (Colloid Science)*. Academic Press: 1992.
13. Antonietti, M.; Förster, S. Vesicles and Liposomes: A Self-Assembly Principle Beyond Lipids. *Advanced Materials* **2003**, *15*, 1323-1333.
14. Rodríguez-Hernández, J.; Lecommandoux, S. Reversible Inside-Out Micellization of pH-responsive and Water-Soluble Vesicles Based on Polypeptide Diblock Copolymers. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 2026-2027.
15. Jain, S.; Bates, F. S. On the Origins of Morphological Complexity in Block Copolymer Surfactants. *Science* **2003**, *300*, 460-464.
16. Wikipedia. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane_\(biologie\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane_(biologie)). (accessed 01/11/2013).
17. Bangham, A. D.; Horne, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology* **1964**, *8*, 660-668.
18. Marsh, D. *CRC handbook of lipid bilayers*. CRC Press: 1990.
19. Lipowsky, R.; Sackmann, E. *Structure and Dynamics of Membranes*. Elsevier Science: 1995.

20. Lorin, A.; Flore, C.; Thomas, A.; Brasseur, R. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **2004**, *8*, 163-176.
21. Nuss, H. Système de minéralisation biomimétique: précipitation inorganique dans des vésicules polymériques. Université de Versailles, Saint-Quentin-en Yvelines, 2012.
22. Zhang, L.; Eisenberg, A. Multiple Morphologies of "Crew-Cut" Aggregates of Polystyrene-*b*-poly(acrylic acid) Block Copolymers. *Science* **1995**, *268*, 1728-1731.
23. Discher, B. M.; Won, Y.-Y.; Ege, D. S.; Lee, J. C.-M.; Bates, F. S.; Discher, D. E.; Hammer, D. A. Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. *Science* **1999**, *284*, 1143-1146.
24. Hadjichristidis, N.; Pispas, S.; Floudas, G. *Block Copolymers: Synthetic Strategies, Physical Properties, and Applications*. Wiley: 2003.
25. Meng, F.; Zhong, Z.; Feijen, J. Stimuli-Responsive Polymersomes for Programmed Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 197-209.
26. Mabrouk, E.; Cuvelier, D.; Brochard-Wyart, F.; Nassy, P.; Li, M.-H. Bursting of sensitive polymersomes induced by curling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 7294-7298.
27. Peters, R. J. R. W.; Louzao, I.; van Hest, J. C. M. From polymeric nanoreactors to artificial organelles. *Chemical Science* **2012**, *3*, 335-342.
28. Marguet, M.; Bonduelle, C.; Lecommandoux, S. Multicompartmentalized polymeric systems: towards biomimetic cellular structure and function. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 512-529.
29. Winterhalter, M.; Hilty, C.; Bezrukov, S. M.; Nardin, C.; Meier, W.; Fournier, D. Controlling membrane permeability with bacterial porins: application to encapsulated enzymes. *Talanta* **2001**, *55*, 965-971.
30. Kumar, M.; Grzelakowski, M.; Zilles, J.; Clark, M.; Meier, W. Highly permeable polymeric membranes based on the incorporation of the functional water channel protein Aquaporin Z. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 20719-20724.
31. Marguet, M.; Sandre, O.; Lecommandoux, S. Polymersomes in "Gelly" Polymersomes: Toward Structural Cell Mimicry. *Langmuir* **2011**, *28*, 2035-2043.
32. Nardin, C.; Hirt, T.; Leukel, J.; Meier, W. Polymerized ABA Triblock Copolymer Vesicles. *Langmuir* **1999**, *16*, 1035-1041.
33. Zhao, W.; Chen, D.; Hu, Y.; Grason, G. M.; Russell, T. P. ABC Triblock Copolymer Vesicles with Mesh-Like Morphology. *ACS Nano* **2010**, *5*, 486-492.
34. Lee, J. S.; Feijen, J. Biodegradable polymersomes as carriers and release systems for paclitaxel using Oregon Green® 488 labeled paclitaxel as a model compound. *Journal of Controlled Release* **2012**, *158*, 312-318.
35. Wang, Y.; Grayson, S. M. Approaches for the preparation of non-linear amphiphilic polymers and their applications to drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 852-865.
36. Carlsen, A.; Glaser, N.; Le Meins, J.-F.; Lecommandoux, S. Block Copolymer Vesicle Permeability Measured by Osmotic Swelling and Shrinking. *Langmuir* **2011**, *27*, 4884-4890.
37. LoPresti, C.; Lomas, H.; Massignani, M.; Smart, T.; Battaglia, G. Polymersomes: nature inspired nanometer sized compartments. *Journal of Materials Chemistry* **2009**, *19*, 3576-3590.
38. Walde, P. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. American Scientific Publishers: 2004; Vol. vol. 9.
39. Reeves, J. P.; Dowben, R. M. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *Journal of Cellular Physiology* **1969**, *73*, 49-60.
40. Walde, P.; Cosentino, K.; Engel, H.; Stano, P. Giant Vesicles: Preparations and Applications. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 848-865.

41. Yow, H. N.; Routh, A. F. Formation of liquid core-polymer shell microcapsules. *Soft Matter* **2006**, *2*, 940-949.
42. Deng, L.; Shi, K.; Zhang, Y.; Wang, H.; Zeng, J.; Guo, X.; Du, Z.; Zhang, B. Synthesis of well-defined poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(L-glutamic acid) by a versatile approach and micellization. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *323*, 169-175.
43. Howse, J. R.; Jones, R. A. L.; Battaglia, G.; Ducker, R. E.; Leggett, G. J.; Ryan, A. J. Templated formation of giant polymer vesicles with controlled size distributions. *Nat Mater* **2009**, *8*, 507-511.
44. Weinberger, A.; Tsai, F.-C.; Koenderink, Gijssje H.; Schmidt, Thais F.; Itri, R.; Meier, W.; Schmatko, T.; Schröder, A.; Marques, C. Gel-Assisted Formation of Giant Unilamellar Vesicles. *Biophysical Journal* **2013**, *105*, 154-164.
45. Angelova, M. I.; Dimitrov, D. S. Liposome electroformation. *Faraday Discussions of the Chemical Society* **1986**, *81*, 303-311.
46. Angelova, M. I.; Soléau, S.; Méléard, P.; Faucon, F.; Bothorel, P. Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. In *Trends in Colloid and Interface Science VI*, Helm, C.; Lösche, M.; Möhwald, H., Eds. Steinkopff: 1992; Vol. 89, pp 127-131.
47. Mathivet, L.; Cribier, S.; Devaux, P. F. Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophysical Journal* **1996**, *70*, 1112-1121.
48. Luisi, P. L.; Walde, P. *Giant Vesicles: Perspectives in Supramolecular Chemistry*. Wiley: 2008.
49. Estes, D. J.; Mayer, M. Electroformation of giant liposomes from spin-coated films of lipids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2005**, *42*, 115-123.
50. Bucher, P.; Fischer, A.; Luisi, P. L.; Oberholzer, T.; Walde, P. Giant Vesicles as Biochemical Compartments: The Use of Microinjection Techniques. *Langmuir* **1998**, *14*, 2712-2721.
51. Wyman, I.; Njikang, G.; Liu, G. When emulsification meets self-assembly: The role of emulsification in directing block copolymer assembly. *Progress in Polymer Science* **2011**, *36*, 1152-1183.
52. Hayward, R. C.; Utada, A. S.; Dan, N.; Weitz, D. A. Dewetting Instability during the Formation of Polymersomes from Block-Copolymer-Stabilized Double Emulsions. *Langmuir* **2006**, *22*, 4457-4461.
53. Lorenceau, E.; Utada, A. S.; Link, D. R.; Cristobal, G.; Joanicot, M.; Weitz, D. A. Generation of Polymerosomes from Double-Emulsions. *Langmuir* **2005**, *21*, 9183-9186.
54. Perro, A.; Nicolet, C. I.; Angly, J.; Lecommandoux, S. b.; Le Meins, J.-F. o.; Colin, A. Mastering a Double Emulsion in a Simple Co-Flow Microfluidic to Generate Complex Polymerosomes. *Langmuir* **2010**, *27*, 9034-9042.
55. Shum, H. C.; Zhao, Y.-j.; Kim, S.-H.; Weitz, D. A. Multicompartment Polymerosomes from Double Emulsions. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 1648-1651.
56. Shum, H. C.; Kim, J.-W.; Weitz, D. A. Microfluidic Fabrication of Monodisperse Biocompatible and Biodegradable Polymerosomes with Controlled Permeability. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 9543-9549.
57. Pautot, S.; Frisken, B. J.; Weitz, D. A. Engineering asymmetric vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 10718-10721.
58. Abkarian, M.; Loiseau, E.; Massiera, G. Continuous droplet interface crossing encapsulation (cDICE) for high throughput monodisperse vesicle design. *Soft Matter* **2011**, *7*, 4610-4614.
59. Lim Soo, P.; Eisenberg, A. Preparation of block copolymer vesicles in solution. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **2004**, *42*, 923-938.

60. Galindo-Rodriguez, S.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharm Res* **2004**, *21*, 1428-1439.
61. Sanson, C.; Schatz, C.; Le Meins, J. F.; Brûlet, A.; Soum, A.; Lecommandoux, S. Biocompatible and Biodegradable Poly(trimethylene carbonate)-b-Poly(l-glutamic acid) Polymersomes: Size Control and Stability. *Langmuir* **2009**, *26*, 2751-2760.
62. Rawicz, W.; Olbrich, K. C.; McIntosh, T.; Needham, D.; Evans, E. Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* **2000**, *79*, 328-339.
63. Bermúdez, H.; Hammer, D. A.; Discher, D. E. Effect of Bilayer Thickness on Membrane Bending Rigidity. *Langmuir* **2003**, *20*, 540-543.
64. Dimova, R.; Seifert, U.; Pouligny, B.; Förster, S.; Döbereiner, H. G. Hyperviscous diblock copolymer vesicles. *Eur. Phys. J. E* **2002**, *7*, 241-250.
65. Bermudez, H.; Brannan, A. K.; Hammer, D. A.; Bates, F. S.; Discher, D. E. Molecular Weight Dependence of Polymersome Membrane Structure, Elasticity, and Stability. *Macromolecules* **2002**, *35*, 8203-8208.
66. Srinivas, G.; Discher, D. E.; Klein, M. L. Self-assembly and properties of diblock copolymers by coarse-grain molecular dynamics. *Nat Mater* **2004**, *3*, 638-644.
67. Jain, S.; Bates, F. S. Consequences of Nonergodicity in Aqueous Binary PEO-PB Micellar Dispersions. *Macromolecules* **2004**, *37*, 1511-1523.
68. Battaglia, G.; Ryan, A. J.; Tomas, S. Polymeric Vesicle Permeability: A Facile Chemical Assay. *Langmuir* **2006**, *22*, 4910-4913.
69. Lee, J. C. M.; Santore, M.; Bates, F. S.; Discher, D. E. From Membranes to Melts, Rouse to Reptation: Diffusion in Polymersome versus Lipid Bilayers. *Macromolecules* **2001**, *35*, 323-326.
70. Marrink, S. J.; Risselada, J.; Mark, A. E. Simulation of gel phase formation and melting in lipid bilayers using a coarse grained model. *Chemistry and Physics of Lipids* **2005**, *135*, 223-244.
71. Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F. Lipid bilayers: thermodynamics, structure, fluctuations, and interactions. *Chemistry and Physics of Lipids* **2004**, *127*, 3-14.
72. Kraske, W. V.; Mountcastle, D. B. Effects of cholesterol and temperature on the permeability of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers near the chain melting phase transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2001**, *1514*, 159-164.
73. Corvera, E.; Mouritsen, O. G.; Singer, M. A.; Zuckermann, M. J. The permeability and the effect of acyl-chain length for phospholipid bilayers containing cholesterol: theory and experiment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1992**, *1107*, 261-270.
74. Xiang, T.-X.; Anderson, B. D. Phase structures of binary lipid bilayers as revealed by permeability of small molecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1998**, *1370*, 64-76.
75. McMullen, T. P. W.; Lewis, R. N. A. H.; McElhaney, R. N. Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. *Biochemistry* **1993**, *32*, 516-522.
76. Huang, T. H.; Lee, C. W. B.; Das Gupta, S. K.; Blume, A.; Griffin, R. G. A carbon-13 and deuterium nuclear magnetic resonance study of phosphatidylcholine/cholesterol interactions: Characterization of liquid-gel phases. *Biochemistry* **1993**, *32*, 13277-13287.
77. Eeman, M.; Deleu, M. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **2010**, *14*, 719-736.
78. Vist, M. R.; Davis, J. H. Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: deuterium nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry* **1990**, *29*, 451-464.

79. Battaglia, G.; Ryan, A. J. Bilayers and Interdigitation in Block Copolymer Vesicles. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 8757-8764.
80. Discher, D. E.; Eisenberg, A. Polymer Vesicles. *Science* **2002**, *297*, 967-973.
81. Evans, E. A. Bending Resistance and Chemically Induced Moments in Membrane Bilayers. *Biophysical Journal* **1974**, *14*, 923-931.
82. Seifert, U. Configurations of fluid membranes and vesicles. *Advances in Physics* **1997**, *46*, 13-137.
83. Helfrich, W. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Zeitschrift fur Naturforschung. Teil C: Biochemie, Biophysik, Biologie, Virologie* **1973**, *28*, 693-703.
84. Boroske, E.; Elwenspoek, M.; Helfrich, W. Osmotic shrinkage of giant egg-lecithin vesicles. *Biophysical Journal* **1981**, *34*, 95-109.
85. Claessens, M. M. A. E.; Leermakers, F. A. M.; Hoekstra, F. A.; Stuart, M. A. C. Osmotic shrinkage and reswelling of giant vesicles composed of dioleoylphosphatidylglycerol and cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2008**, *1778*, 890-895.
86. Ménager, C.; Cabuil, V. Reversible Shrinkage of Giant Magnetoliposomes under an Osmotic Stress. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 7913-7918.
87. Li, W.; Aurora, T. S.; Haines, T. H.; Cummins, H. Z. Elasticity of synthetic phospholipid vesicles and submitochondrial particles during osmotic swelling. *Biochemistry* **1986**, *25*, 8220-8229.
88. Miyamoto, S.; Maeda, T.; Fujime, S. Change in membrane elastic modulus on activation of glucose transport system of brush border membrane vesicles studied by osmotic swelling and dynamic light scattering. *Biophysical Journal* **1988**, *53*, 505-512.
89. Chen, P. Y.; Pearce, D.; Verkman, A. S. Membrane water and solute permeability determined quantitatively by self-quenching of an entrapped fluorophore. *Biochemistry* **1988**, *27*, 5713-5718.
90. Mathai, J. C.; Sprott, G. D.; Zeidel, M. L. Molecular Mechanisms of Water and Solute Transport across Archaeobacterial Lipid Membranes. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 27266-27271.
91. Potma, E. O.; de Boeij, W. P.; van Haastert, P. J. M.; Wiersma, D. A. Real-time visualization of intracellular hydrodynamics in single living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, 1577-1582.
92. Bloom, M.; Evans, E.; Mouritsen, O. G. Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1991**, *24*, 293-397.
93. Needham, D.; Zhelev, D. V. *Vesicles*. (éd.) M. Rosoff, Marcel Dekker, New York: 1996.
94. Leson, A.; Filiz, V.; Förster, S.; Mayer, C. Water permeation through block-copolymer vesicle membranes. *Chemical Physics Letters* **2007**, *444*, 268-272.
95. Bauer, A.; Kopschütz, C.; Stolzenburg, M.; Förster, S.; Mayer, C. The effect of ethanol on the permeability of block copolymer vesicle membranes. *Journal of Membrane Science* **2006**, *284*, 1-4.
96. Vriezema, D. M.; Garcia, P. M. L.; Sancho Oltra, N.; Hatzakis, N. S.; Kuiper, S. M.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E.; van Hest, J. C. M. Positional Assembly of Enzymes in Polymersome Nanoreactors for Cascade Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 7378-7382.
97. Louzao, I.; van Hest, J. C. M. Permeability Effects on the Efficiency of Antioxidant Nanoreactors. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 2364-2372.
98. Huster, D.; Jin, A. J.; Arnold, K.; Gawrisch, K. Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by ¹⁷O NMR. *Biophysical Journal* **1997**, *73*, 855-864.

99. Olbrich, K.; Rawicz, W.; Needham, D.; Evans, E. Water Permeability and Mechanical Strength of Polyunsaturated Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* **2000**, *79*, 321-327.
100. Leson, A.; Hauschild, S.; Rank, A.; Neub, A.; Schubert, R.; Förster, S.; Mayer, C. Molecular Exchange through Membranes of Poly(2-vinylpyridine-block-ethylene oxide) Vesicles. *Small* **2007**, *3*, 1074-1083.
101. Cai, C.; Zhang, L.; Lin, J.; Wang, L. Self-Assembly Behavior of pH- and Thermosensitive Amphiphilic Triblock Copolymers in Solution: Experimental Studies and Self-Consistent Field Theory Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*, 12666-12673.
102. Peterlin, P.; Arrigler, V. Electroformation in a flow chamber with solution exchange as a means of preparation of flaccid giant vesicles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2008**, *64*, 77-87.
103. Paula, S.; Volkov, A. G.; Van Hoek, A. N.; Haines, T. H.; Deamer, D. W. Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophysical Journal* **1996**, *70*, 339-348.
104. Rossignol, M.; Uso, T.; Thomas, P. Relationship between fluidity and ionic permeability of bilayers from natural mixtures of phospholipids. *J. Membrane. Biol.* **1985**, *87*, 269-275.
105. Bernard, A.-L.; Guedeau-Boudeville, M.-A.; Jullien, L.; di Meglio, J.-M. Raspberry vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2002**, *1567*, 1-5.
106. Rivers, R. L.; Williams, J. C. Effect of solute permeability in determination of elastic modulus using the vesicular swelling method. *Biophysical Journal* **1990**, *57*, 627-631.
107. Champion, J. A.; Katare, Y. K.; Mitragotri, S. Making polymeric micro- and nanoparticles of complex shapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 11901-11904.
108. Xu, J.; Wong, D. H. C.; Byrne, J. D.; Chen, K.; Bowerman, C.; DeSimone, J. M. Future of the Particle Replication in Nonwetting Templates (PRINT) Technology. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 6580-6589.
109. Canton, I.; Battaglia, G. Endocytosis at the nanoscale. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 2718-2739.
110. Perrault, S. D.; Walkey, C.; Jennings, T.; Fischer, H. C.; Chan, W. C. W. Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design. *Nano Letters* **2009**, *9*, 1909-1915.
111. Decuzzi, P.; Pasqualini, R.; Arap, W.; Ferrari, M. Intravascular Delivery of Particulate Systems: Does Geometry Really Matter? *Pharm Res* **2009**, *26*, 235-243.
112. Sharma, G.; Valenta, D. T.; Altman, Y.; Harvey, S.; Xie, H.; Mitragotri, S.; Smith, J. W. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *Journal of Controlled Release* **2010**, *147*, 408-412.
113. Decuzzi, P.; Ferrari, M. The adhesive strength of non-spherical particles mediated by specific interactions. *Biomaterials* **2006**, *27*, 5307-5314.
114. Champion, J. A.; Mitragotri, S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 4930-4934.
115. Decuzzi, P.; Ferrari, M. The Receptor-Mediated Endocytosis of Nonspherical Particles. *Biophysical Journal* **2008**, *94*, 3790-3797.
116. Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters* **2006**, *6*, 662-668.
117. Chauhan, V. P.; Popović, Z.; Chen, O.; Cui, J.; Fukumura, D.; Bawendi, M. G.; Jain, R. K. Fluorescent Nanorods and Nanospheres for Real-Time In Vivo Probing of Nanoparticle Shape-Dependent Tumor Penetration. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 11417-11420.

118. Mui, B. L.; Cullis, P. R.; Evans, E. A.; Madden, T. D. Osmotic properties of large unilamellar vesicles prepared by extrusion. *Biophysical Journal* **1993**, *64*, 443-453.
119. Jin, A. J.; Huster, D.; Gawrisch, K.; Nossal, R. Light scattering characterization of extruded lipid vesicles. *Eur Biophys J* **1999**, *28*, 187-199.
120. Ertel, A.; Marangoni, A. G.; Marsh, J.; Hallett, F. R.; Wood, J. M. Mechanical properties of vesicles. I. Coordinated analysis of osmotic swelling and lysis. *Biophysical Journal* **1993**, *64*, 426-434.
121. Lin, C.-M.; Wu, D. T.; Tsao, H.-K.; Sheng, Y.-J. Membrane properties of swollen vesicles: growth, rupture, and fusion. *Soft Matter* **2012**, *8*, 6139-6150.
122. Käs, J.; Sackmann, E. Shape transitions and shape stability of giant phospholipid vesicles in pure water induced by area-to-volume changes. *Biophysical Journal* **1991**, *60*, 825-844.
123. Wintz, W.; Döbereiner, H.-G.; Seifert, U. Starfish vesicles. *Europhysical Letters* **1996**, *33*, 403-408.
124. Yuan, H.; Huang, C.; Zhang, S. Dynamic shape transformations of fluid vesicles. *Soft Matter* **2010**, *6*, 4571-4579.
125. Li, X.; Pivkin, I. V.; Liang, H.; Karniadakis, G. E. Shape Transformations of Membrane Vesicles from Amphiphilic Triblock Copolymers: A Dissipative Particle Dynamics Simulation Study. *Macromolecules* **2009**, *42*, 3195-3200.
126. Beney, L.; Linares, E.; Ferret, E.; Gervais, P. Influence of the shape of phospholipid vesicles on the measurement of their size by photon correlation spectroscopy. *Eur Biophys J* **1998**, *27*, 567-574.
127. Pencer, J.; White, G. F.; Hallett, F. R. Osmotically Induced Shape Changes of Large Unilamellar Vesicles Measured by Dynamic Light Scattering. *Biophysical Journal* **2001**, *81*, 2716-2728.
128. Hubert, D. H. W.; Jung, M.; Frederik, P. M.; Bomans, P. H. H.; Meuldijk, J.; German, A. L. Morphology Transformations of DODAB Vesicles Reminiscent of Endocytosis and Vesicular Traffic. *Langmuir* **2000**, *16*, 8973-8979.
129. Saveyn, P.; Bomans, P.; Frederik, P.; De Cuyper, M.; Van der Meeren, P. Osmotically Induced Morphological Changes of Extruded Dioctadecyldimethylammonium Chloride (DODAC) Dispersions. *Langmuir* **2007**, *23*, 4775-4781.
130. Kim, K. T.; Zhu, J.; Meeuwissen, S. A.; Cornelissen, J. J. L. M.; Pochan, D. J.; Nolte, R. J. M.; van Hest, J. C. M. Polymersome Stomatocytes: Controlled Shape Transformation in Polymer Vesicles. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 12522-12524.
131. Meeuwissen, S. A.; Kim, K. T.; Chen, Y.; Pochan, D. J.; van Hest, J. C. M. Controlled Shape Transformation of Polymersome Stomatocytes. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 7070-7073.
132. Azzam, T.; Eisenberg, A. Fully Collapsed (Kippah) Vesicles: Preparation and Characterization. *Langmuir* **2010**, *26*, 10513-10523.
133. Quilliet, C. Depressions at the surface of an elastic spherical shell submitted to external pressure. *Physical Review E* **2006**, *74*, 046608.
134. Tu, Z. C.; Ge, L. Q.; Li, J. B.; Ou-Yang, Z. C. Elasticity of polymer vesicles by osmotic pressure: An intermediate theory between fluid membranes and solid shells. *Physical Review E* **2005**, *72*, 021806.
135. Seifert, U.; Berndl, K.; Lipowsky, R. Shape transformations of vesicles: Phase diagram for spontaneous-curvature and bilayer-coupling models. *Physical Review A* **1991**, *44*, 1182-1202.
136. Sheetz, M. P.; Singer, S. J. Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1974**, *71*, 4457-4461.

137. Svetina, S.; Ottova-Leitmannová, A.; Glaser, R. Membrane bending energy in relation to bilayer couples concept of red blood cell shape transformations. *Journal of Theoretical Biology* **1982**, *94*, 13-23.
138. Miao, L.; Seifert, U.; Wortis, M.; Döbereiner, H.-G. Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: The effect of area-difference elasticity. *Physical Review E* **1994**, *49*, 5389-5407.
139. Döbereiner, H. G.; Evans, E.; Kraus, M.; Seifert, U.; Wortis, M. Mapping vesicle shapes into the phase diagram: A comparison of experiment and theory. *Physical Review E* **1997**, *55*, 4458-4474.
140. Chécot, F.; Lecommandoux, S.; Klok, H. A.; Gnanou, Y. From supramolecular polymersomes to stimuli-responsive nano-capsules based on poly(diene-b-peptide) diblock copolymers. *Eur. Phys. J. E* **2003**, *10*, 25-35.
141. Discher, B. M.; Bermudez, H.; Hammer, D. A.; Discher, D. E.; Won, Y.-Y.; Bates, F. S. Cross-linked Polymersome Membranes: Vesicles with Broadly Adjustable Properties. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 2848-2854.
142. Gaitzsch, J.; Appelhans, D.; Wang, L.; Battaglia, G.; Voit, B. Synthetic Bio-nanoreactor: Mechanical and Chemical Control of Polymersome Membrane Permeability. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 4448-4451.
143. Du, J.; Armes, S. P. pH-Responsive Vesicles Based on a Hydrolytically Self-Cross-Linkable Copolymer. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12800-12801.
144. Du, J.; Armes, S. P. Preparation of Biocompatible Zwitterionic Block Copolymer Vesicles by Direct Dissolution in Water and Subsequent Silicification within Their Membranes. *Langmuir* **2009**, *25*, 9564-9570.
145. Spulber, M.; Najer, A.; Winkelbach, K.; Glaied, O.; Waser, M.; Pielers, U.; Meier, W.; Bruns, N. Photoreaction of a Hydroxyalkylphenone with the Membrane of Polymersomes: A Versatile Method To Generate Semipermeable Nanoreactors. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 9204-9212.
146. Meier, W.; Nardin, C.; Winterhalter, M. Reconstitution of Channel Proteins in (Polymerized) ABA Triblock Copolymer Membranes. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 4599-4602.
147. Ranquin, A.; Versées, W.; Meier, W.; Steyaert, J.; Van Gelder, P. Therapeutic Nanoreactors: Combining Chemistry and Biology in a Novel Triblock Copolymer Drug Delivery System. *Nano Letters* **2005**, *5*, 2220-2224.
148. Broz, P.; Driamov, S.; Ziegler, J.; Ben-Haim, N.; Marsch, S.; Meier, W.; Hunziker, P. Toward Intelligent Nanosize Bioreactors: A pH-Switchable, Channel-Equipped, Functional Polymer Nanocontainer. *Nano Letters* **2006**, *6*, 2349-2353.
149. Nardin, C.; Thoeni, S.; Widmer, J.; Winterhalter, M.; Meier, W. Nanoreactors based on (polymerized) ABA-triblock copolymer vesicles. *Chemical Communications* **2000**, 1433-1434.
150. Graff, A.; Sauer, M.; Van Gelder, P.; Meier, W. Virus-assisted loading of polymer nanocontainer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 5064-5068.
151. Nallani, M.; Onaca, O.; Gera, N.; Hildenbrand, K.; Hoheisel, W.; Schwaneberg, U. A nanophosphor-based method for selective DNA recovery in Synthosomes. *Biotechnology Journal* **2006**, *1*, 828-834.
152. Ihle, S.; Onaca, O.; Rigler, P.; Hauer, B.; Rodriguez-Roper, F.; Fioroni, M.; Schwaneberg, U. Nanocompartments with a pH release system based on an engineered OmpF channel protein. *Soft Matter* **2011**, *7*, 532-539.
153. Choi, H.-J.; Montemagno, C. D. Artificial Organelle: ATP Synthesis from Cellular Mimetic Polymersomes. *Nano Letters* **2005**, *5*, 2538-2542.
154. Graff, A.; Frayse-Ailhas, C.; Palivan, C. G.; Grzelakowski, M.; Friedrich, T.; Vebert, C.; Gescheidt, G.; Meier, W. Amphiphilic Copolymer Membranes Promote NADH:Ubiquinone

- Oxidoreductase Activity: Towards an Electron-Transfer Nanodevice. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2010**, *211*, 229-238.
155. Stoenescu, R.; Graff, A.; Meier, W. Asymmetric ABC-Triblock Copolymer Membranes Induce a Directed Insertion of Membrane Proteins. *Macromolecular Bioscience* **2004**, *4*, 930-935.
156. Kumar, M.; Habel, J. E. O.; Shen, Y.-x.; Meier, W. P.; Walz, T. High-Density Reconstitution of Functional Water Channels into Vesicular and Planar Block Copolymer Membranes. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 18631-18637.
157. Pata, V.; Dan, N. The Effect of Chain Length on Protein Solubilization in Polymer-Based Vesicles (Polymersomes). *Biophysical Journal* **2003**, *85*, 2111-2118.
158. Kim, A. J.; Kaucher, M. S.; Davis, K. P.; Peterca, M.; Imam, M. R.; Christian, N. A.; Levine, D. H.; Bates, F. S.; Percec, V.; Hammer, D. A. Proton Transport from Dendritic Helical-Pore-Incorporated Polymersomes. *Advanced Functional Materials* **2009**, *19*, 2930-2936.
159. Sauer, M.; Haeefe, T.; Graff, A.; Nardin, C.; Meier, W. Ion-carrier controlled precipitation of calcium phosphate in giant ABA triblock copolymer vesicles. *Chemical Communications* **2001**, 2452-2453.
160. Pfeiffer, D. R.; Reed, P. W.; Lardy, H. A. Ultraviolet and fluorescent spectral properties of the divalent cation ionophore A23187 and its metal ion complexes. *Biochemistry* **1974**, *13*, 4007-4014.
161. Stanish, I.; Monbouquette, H. G. Selective, carrier-mediated uptake of dilute aqueous heavy metal ions by metal-sorbing vesicles in the presence of excess Mg^{2+} and Ca^{2+} . *Journal of Membrane Science* **2000**, *179*, 127-136.
162. Wang, E.; Taylor, R. W.; Pfeiffer, D. R. Mechanism and Specificity of Lanthanide Series Cation Transport by Ionophores A23187, 4-BrA23187, and Ionomycin. *Biophysical Journal* **1998**, *75*, 1244-1254.
163. Erdahl, W. L.; Chapman, C. J.; Taylor, R. W.; Pfeiffer, D. R. Effects of pH conditions on Ca^{2+} transport catalyzed by ionophores A23187, 4-BrA23187, and ionomycin suggest problems with common applications of these compounds in biological systems. *Biophysical Journal* **1995**, *69*, 2350-2363.
164. Schulz, M.; Olubummo, A.; Binder, W. H. Beyond the lipid-bilayer: interaction of polymers and nanoparticles with membranes. *Soft Matter* **2012**, *8*, 4849-4864.
165. Ahmed, F.; Discher, D. E. Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles. *Journal of Controlled Release* **2004**, *96*, 37-53.
166. LoPresti, C.; Massignani, M.; Fernyhough, C.; Blanazs, A.; Ryan, A. J.; Madsen, J.; Warren, N. J.; Armes, S. P.; Lewis, A. L.; Chirasatitsin, S., *et al.* Controlling Polymersome Surface Topology at the Nanoscale by Membrane Confined Polymer/Polymer Phase Separation. *ACS Nano* **2011**, *5*, 1775-1784.
167. Christian, D. A.; Tian, A.; Ellenbroek, W. G.; Levental, I.; Rajagopal, K.; Janmey, P. A.; Liu, A. J.; Baumgart, T.; Discher, D. E. Spotted vesicles, striped micelles and Janus assemblies induced by ligand binding. *Nature Materials* **2009**, *8*, 843-849.
168. Spinler, K.; Tian, A.; Christian, D. A.; Pantano, D. A.; Baumgart, T.; Discher, D. E. Dynamic Domains in Polymersomes: Mixtures of Polyanionic and Neutral Diblocks Respond More Rapidly to Changes in Calcium than to pH. *Langmuir* **2013**, *29*, 7499-7508.
169. Nikova, A. T.; Gordon, V. D.; Cristobal, G.; Talingting, M. R.; Bell, D. C.; Evans, C.; Joanicot, M.; Zasadzinski, J. A.; Weitz, D. A. Swollen Vesicles and Multiple Emulsions from Block Copolymers. *Macromolecules* **2004**, *37*, 2215-2218.
170. Ruyschaert, T.; Sonnen, A. F. P.; Haeefe, T.; Meier, W.; Winterhalter, M.; Fournier, D. Hybrid Nanocapsules: Interactions of ABA Block Copolymers with Liposomes. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 6242-6247.

171. Nam, J.; Vanderlick, T. K.; Beales, P. A. Formation and dissolution of phospholipid domains with varying textures in hybrid lipo-polymersomes. *Soft Matter* **2012**, *8*, 7982-7988.
172. Nam, J.; Beales, P. A.; Vanderlick, T. K. Giant Phospholipid/Block Copolymer Hybrid Vesicles: Mixing Behavior and Domain Formation. *Langmuir* **2010**, *27*, 1-6.
173. Cheng, Z.; Tsourkas, A. Paramagnetic Porous Polymersomes. *Langmuir* **2008**, *24*, 8169-8173.
174. Cheng, Z.; Elias, D. R.; Kamat, N. P.; Johnston, E. D.; Poloukhine, A.; Popik, V.; Hammer, D. A.; Tsourkas, A. Improved Tumor Targeting of Polymer-Based Nanovesicles Using Polymer-Lipid Blends. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22*, 2021-2029.
175. Lim, S.; de Hoog, H.-P.; Parikh, A.; Nallani, M.; Liedberg, B. Hybrid, Nanoscale Phospholipid/Block Copolymer Vesicles. *Polymers* **2013**, *5*, 1102-1114.
176. Schulz, M.; Glatte, D.; Meister, A.; Scholtysek, P.; Kerth, A.; Blume, A.; Bacia, K.; Binder, W. H. Hybrid lipid/polymer giant unilamellar vesicles: effects of incorporated biocompatible PIB-PEO block copolymers on vesicle properties. *Soft Matter* **2011**, *7*, 8100-8110.
177. Olubummo, A.; Schulz, M.; Lechner, B.-D.; Scholtysek, P.; Bacia, K.; Blume, A.; Kressler, J.; Binder, W. H. Controlling the Localization of Polymer-Functionalized Nanoparticles in Mixed Lipid/Polymer Membranes. *ACS Nano* **2012**, *6*, 8713-8727.
178. Schulz, M.; Werner, S.; Bacia, K.; Binder, W. H. Controlling Molecular Recognition with Lipid/Polymer Domains in Vesicle Membranes. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 1829-1833.
179. Chemin, M.; Brun, P. M.; Lecommandoux, S.; Sandre, O.; Le Meins, J. F. Hybrid polymer/lipid vesicles: fine control of the lipid and polymer distribution in the binary membrane. *Soft Matter* **2012**, *8*, 2867-2874.
180. Winzen, S.; Bernhardt, M.; Schaeffel, D.; Koch, A.; Kappl, M.; Koynov, K.; Landfester, K.; Kroeger, A. Submicron hybrid vesicles consisting of polymer-lipid and polymer-cholesterol blends. *Soft Matter* **2013**, *9*, 5883-5890.
181. King, J. W. *Supercritical fluid technology for lipid extraction, fractionation and reactions*. Marcel Dekker: 2002; p 663-687.
182. Roth, M. Solubility parameter of poly(dimethyl siloxane) as a function of temperature and chain length. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **1990**, *28*, 2715-2719.
183. Brandrup, J.; Immergut, E. H.; Grulke, E. A.; Abe, A.; Bloch, D. R. *Polymer Handbook* (4th Edition). John Wiley & Sons.
184. Boehler, B. A.; De Gier, J.; Van Deenen, L. L. M. The effect of gramicidin a on the temperature dependence of water permeation through liposomal membranes prepared from phosphatidylcholines with different chain lengths. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1978**, *512*, 480-488.
185. Mathai, J. C.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F.; Zeidel, M. L. Structural Determinants of Water Permeability through the Lipid Membrane. *The Journal of General Physiology* **2008**, *131*, 69-76.
186. Hill, R. M.; He, M.; Lin, Z.; Davis, H. T.; Scriven, L. E. Lyotropic liquid crystal phase behavior of polymeric siloxane surfactants. *Langmuir* **1993**, *9*, 2789-2798.
187. Nam, J.; Santore, M. M. Adhesion Plaque Formation Dynamics between Polymer Vesicles in the Limit of Highly Concentrated Binding Sites. *Langmuir* **2007**, *23*, 7216-7224.
188. Lin, Z.; Hill, R. M.; Davis, H. T.; Scriven, L. E.; Talmon, Y. Cryo transmission electron microscopy study of vesicles and micelles in siloxane surfactant aqueous solutions. *Langmuir* **1994**, *10*, 1008-1011.
189. <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/D22910?CID=search-product>. (accessed 21/10/2013).

190. http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&id=1018&Itemid=216&catnumber=810146. (accessed 21/10/2013).
191. http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=185&Itemid=193. (accessed 21/10/2013).
192. Nuss, H.; Chevillard, C.; Guenoun, P.; Malloggi, F. Microfluidic trap-and-release system for lab-on-a-chip-based studies on giant vesicles. *Lab on a Chip* **2012**, *12*, 5257-5261.
193. Van Elburg, H. J.; Kuypers, L. C.; Decraemer, W. F.; Dirckx, J. J. J. Improved correction of axial geometrical distortion in index-mismatched fluorescent confocal microscopic images using high-aperture objective lenses. *Journal of Microscopy* **2007**, *228*, 45-54.
194. Taubert, A.; Napoli, A.; Meier, W. Self-assembly of reactive amphiphilic block copolymers as mimetics for biological membranes. *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, *8*, 598-603.
195. Carlsen, A.; Lecommandoux, S. Self-assembly of polypeptide-based block copolymer amphiphiles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2009**, *14*, 329-339.
196. Holowka, E. P.; Sun, V. Z.; Kamei, D. T.; Demin, T. J. Polyarginine segments in block copolypeptides drive both vesicular assembly and intracellular delivery. *Nature Materials* **2007**, *6*, 52-57.
197. Halperin, A. Rod-coil copolymers: their aggregation behavior. *Macromolecules* **1990**, *23*, 2724-2731.
198. Reenders, M.; ten Brinke, G. Compositional and Orientational Ordering in Rod-Coil Diblock Copolymer Melts. *Macromolecules* **2002**, *35*, 3266-3280.
199. Chou, P. Y.; Fasman, G. D. Prediction of protein conformation. *Biochemistry* **1974**, *13*, 222-245.
200. Babin, J.; Rodriguez-Hernandez, J.; Lecommandoux, S.; Klok, H.-A.; Achard, M.-F. Self-assembled nanostructures from peptide-synthetic hybrid block copolymers: Complex, stimuli-responsive rod-coil architectures. *Faraday Discussions* **2005**, *128*, 179-192.
201. Iatrou, H.; Frielinghaus, H.; Hanski, S.; Ferderigos, N.; Ruokolainen, J.; Ikkala, O.; Richter, D.; Mays, J.; Hadjichristidis, N. Architecturally Induced Multiresponsive Vesicles from Well-Defined Polypeptides. Formation of Gene Vehicles. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2173-2181.
202. Gebhardt, K. E.; Ahn, S.; Venkatachalam, G.; Savin, D. A. Role of secondary structure changes on the morphology of polypeptide-based block copolymer vesicles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *317*, 70-76.
203. Huang, J.; Heise, A. Stimuli responsive synthetic polypeptides derived from N-carboxyanhydride (NCA) polymerisation. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 7373-7390.
204. Kukula, H.; Schlaad, H.; Antonietti, M.; Förster, S. The Formation of Polymer Vesicles or "Peptosomes" by Polybutadiene-block-poly(l-glutamate)s in Dilute Aqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 1658-1663.
205. Chécot, F.; Lecommandoux, S.; Gnanou, Y.; Klok, H.-A. Water-Soluble Stimuli-Responsive Vesicles from Peptide-Based Diblock Copolymers. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1339-1343.
206. Rodríguez-Hernández, J.; Babin, J.; Zappone, B.; Lecommandoux, S. Preparation of Shell Cross-Linked Nano-Objects from Hybrid-Peptide Block Copolymers. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2213-2220.
207. Sanson, C.; Schatz, C.; Le Meins, J.-F.; Soum, A.; Thévenot, J.; Garanger, E.; Lecommandoux, S. A simple method to achieve high doxorubicin loading in biodegradable polymersomes. *Journal of Controlled Release* **2010**, *147*, 428-435.
208. Knoop, R. J. I.; de Geus, M.; Habraken, G. J. M.; Koning, C. E.; Menzel, H.; Heise, A. Stimuli Responsive Peptide Conjugated Polymer Nanoparticles. *Macromolecules* **2010**, *43*, 4126-4132.

209. Lin, J.; Zhu, J.; Chen, T.; Lin, S.; Cai, C.; Zhang, L.; Zhuang, Y.; Wang, X.-S. Drug releasing behavior of hybrid micelles containing polypeptide triblock copolymer. *Biomaterials* **2009**, *30*, 108-117.
210. Agut, W.; Brûlet, A.; Schatz, C.; Taton, D.; Lecommandoux, S. b. pH and Temperature Responsive Polymeric Micelles and Polymersomes by Self-Assembly of Poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]-b-Poly(glutamic acid) Double Hydrophilic Block Copolymers. *Langmuir* **2010**, *26*, 10546-10554.
211. Agut, W.; Brûlet, A.; Taton, D.; Lecommandoux, S. Thermoresponsive Micelles from Jeffamine-b-poly(l-glutamic acid) Double Hydrophilic Block Copolymers. *Langmuir* **2007**, *23*, 11526-11533.
212. Rao, J.; Luo, Z.; Ge, Z.; Liu, H.; Liu, S. "Schizophrenic" Micellization Associated with Coil-to-Helix Transitions Based on Polypeptide Hybrid Double Hydrophilic Rod-Coil Diblock Copolymer. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3871-3878.
213. Young, J. R.; Henriksen, K. Biomineralization Within Vesicles: The Calcite of Coccoliths. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **2003**, *54*, 189-215.
214. Eanes, E. D.; Heywood, B. R. *Liposome Technology in Biomineralisation Research*. Karger: Basel, Switzerland: 1989.
215. Farre, B.; Dauphin, Y. Lipids from the nacreous and prismatic layers of two Pteriomorpha Mollusc shells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2009**, *152*, 103-109.
216. Addadi, L.; Weiner, S. Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985**, *82*, 4110-4114.
217. Naka, K.; Chujo, Y. Control of Crystal Nucleation and Growth of Calcium Carbonate by Synthetic Substrates. *Chemistry of Materials* **2001**, *13*, 3245-3259.
218. Harris, J. M.; Chess, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat.Rev.Drug Discov.* **2003**, *2*, 214-221.
219. Harris, J. M.; Martin, N.; Modi, M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* **2001**, *40*, 539-551.
220. Nakanishi, T.; Fukushima, S.; Okamoto, K.; Suzuki, M.; Matsumura, Y.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. *Journal of Controlled Release* **2001**, *74*, 295-302.
221. Joralemon, M. J.; McRae, S.; Emrick, T. PEGylated polymers for medicine: from conjugation to self-assembled systems. *Chemical Communications* **2010**, *46*, 1377-1393.
222. Cheng, J.; Deming, T. Synthesis of Polypeptides by Ring-Opening Polymerization of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides. In *Peptide-Based Materials*, Deming, T., Ed. Springer Berlin Heidelberg: 2012; Vol. 310, pp 1-26.
223. Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. Living Polypeptides. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1653-1656.
224. Hope, M. J.; Bally, M. B.; Webb, G.; Cullis, P. R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1985**, *812*, 55-65.
225. Burchard, W.; Patterson, G. D. *Light Scattering from Polymers*. Springer London, Limited: 1983.
226. Floudas, G.; Papadopoulos, P.; Klok, H. A.; Vandermeulen, G. W. M.; Rodriguez-Hernandez, J. Hierarchical Self-Assembly of Poly(γ -benzyl-l-glutamate)-Poly(ethylene glycol)-Poly(γ -benzyl-l-glutamate) Rod-Coil-Rod Triblock Copolymers. *Macromolecules* **2003**, *36*, 3673-3683.

227. Hirst, L. S.; Ossowski, A.; Fraser, M.; Geng, J.; Selinger, J. V.; Selinger, R. L. B. Morphology transition in lipid vesicles due to in-plane order and topological defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 3242-3247.
228. Lasic, D. D. *Liposomes: from physics to applications*. Elsevier: 1993.
229. Andersson, M.; Hammarstroem, L.; Edwards, K. Effect of Bilayer Phase Transitions on Vesicle Structure, and its Influence on the Kinetics of Viologen Reduction. *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 14531-14538.
230. Chapman, D. Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1975**, *8*, 185-235.
231. Marsh, D. Cholesterol-induced fluid membrane domains: A compendium of lipid-raft ternary phase diagrams. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2009**, *1788*, 2114-2123.
232. Veatch, S. L.; Keller, S. L. Separation of Liquid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol. *Biophysical Journal* **2003**, *85*, 3074-3083.
233. Veatch, S. L.; Keller, S. L. Organization in Lipid Membranes Containing Cholesterol. *Physical Review Letters* **2002**, *89*, 268101.
234. Dominak, L. M.; Keating, C. D. Polymer Encapsulation within Giant Lipid Vesicles. *Langmuir* **2007**, *23*, 7148-7154.
235. Jyothi, G.; Surolia, A.; Easwaran, K. R. K. A23187—Channel behaviour: Fluorescence study. *J Biosci* **1994**, *19*, 277-282.
236. Salva, R.; Le Meins, J.-F.; Sandre, O.; Brûlet, A.; Schmutz, M.; Guenoun, P.; Lecommandoux, S. Polymersome Shape Transformation at the Nanoscale. *ACS Nano* **2013**, *7*, 9298-9311.
237. Pedersen, J. S. Analysis of small-angle scattering data from colloids and polymer solutions: modeling and least-squares fitting. *Advances in Colloid and Interface Science* **1997**, *70*, 171-210.
238. Nardin, C.; Winterhalter, M.; Meier, W. Giant Free-Standing ABA Triblock Copolymer Membranes. *Langmuir* **2000**, *16*, 7708-7712.
239. Sarkar, B.; Ravi, V.; Alexandridis, P. Micellization of amphiphilic block copolymers in binary and ternary solvent mixtures. *Journal of Colloid and Interface Science* **2013**, *390*, 137-146.
240. Sharma, S.; Pal, N.; Chowdhury, P. K.; Sen, S.; Ganguli, A. K. Understanding Growth Kinetics of Nanorods in Microemulsion: A Combined Fluorescence Correlation Spectroscopy, Dynamic Light Scattering, and Electron Microscopy Study. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 19677-19684.
241. Vasanthi, R.; Ravichandran, S.; Bagchi, B. Needlelike motion of prolate ellipsoids in the sea of spheres. *The Journal of Chemical Physics* **2001**, *114*, 7989-7992.
242. Roselli, R.; Diller, K. Macroscopic Approach for Biofluid Transport. In *Biotransport: Principles and Applications*, Springer New York: 2011; pp 169-317.

Résumé

Les vésicules sont des structures auto-assemblées formant des compartiments clos à l'échelle nanométrique ou micrométrique. Les différentes applications envisagées pour ces objets vont de la vectorisation de principes actifs à leur utilisation en tant que nano/micro-réacteur. Elles nécessitent donc un contrôle fin des propriétés de perméabilité des membranes vésiculaires. Au cours de cette thèse, des vésicules dont les membranes sont formées par des copolymères à blocs amphiphiles, vésicules appelées polymersomes, ont été formulées et étudiées. Pour répondre au mieux aux applications mentionnées, nous avons synthétisé de nouveaux copolymères amphiphiles capables de s'auto-assembler sous forme de vésicules pour étudier l'influence de l'architecture moléculaire sur les propriétés de membrane. Différentes stratégies pouvant permettre de moduler la perméabilité de ces assemblages ont ainsi été mises au point et étudiées : la formation de membranes hybrides polymère / lipide pour l'eau et l'utilisation d'un transporteur ionique pour les ions calcium. Finalement, l'influence de l'architecture macromoléculaire du copolymère sur l'évolution de forme des vésicules sous l'action d'un stress osmotique a été déterminée. Cette étude, alliant des analyses par diffusion de lumière et de neutrons ainsi que des études en microscopie électronique, a permis d'établir une modélisation complète.

Summary

Vesicles are self-assembled structures which form closed compartments at the nanometric or micrometric scale. These synthetic objects can be used for several kinds of applications, ranging from drug delivery to nano / microreactor for confined chemical reactions. The need to precisely control the vesicle membrane permeability is common to all these applications. In this thesis, vesicles resulting from the self-assembly of amphiphilic block copolymers, namely polymersomes, were prepared and studied. For this purpose, we synthesized new amphiphilic copolymers that can self-assemble into vesicles to study the influence of macromolecular parameters on the membrane properties. The formation of polymer / lipid hybrid vesicles for the water permeability and the use of an ion carrier selective for divalent cations have been studied as different methods which should allow the tuning of the membrane permeability. Finally, the influence of the copolymer architecture, molecular weight and hydrophobic chemical nature on the shape evolution of vesicles submitted to an osmotic stress has been studied. This study, combining light and neutron scattering with electron microscopy, allowed us to establish a complete modelisation of the shape evolution trajectory.