

Les liposomes : description, fabrication et applications

Aurélien Lorin, Christelle Flore, Annick Thomas, Robert Brasseur

Centre de Biophysique moléculaire numérique. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : lorin.a@fsagx.ac.be

Reçu le 20 février 2004, accepté le 14 mai 2004.

Les liposomes sont des vésicules sphériques de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre. Ces vésicules sont composées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques qui permet(tent) de séparer un milieu intravésiculaire d'un milieu extérieur. Au sein de ces bicouches, tout comme dans les membranes biologiques, les mouvements des phospholipides sont observés. Les liposomes sont faciles à préparer. L'hydratation de film phospholipidique permet d'obtenir des liposomes multilamellaires. Pour obtenir des liposomes unilamellaires, des étapes supplémentaires sont nécessaires. Les liposomes sont employés dans l'industrie comme vecteurs de substances cosmétologiques. Ils sont aussi parfois utilisés comme vecteurs de thérapie génique, pour délivrer des médicaments ou encore comme supports de vaccins. Les liposomes constituent surtout un bon modèle membranaire et sont largement employés pour mieux comprendre les mécanismes intervenant au niveau de la membrane, comme la perméabilité, la fluidité, l'ancrage de protéines ou encore la fusion de deux membranes. Cette dernière est plus particulièrement expliquée dans cet article.

Mots-clés. Bicouche, phospholipide, mouvements, application, fusion, préparation.

Liposomes: description, preparation and applications. Liposomes are spherical vesicles with a diameter ranging from 20 nm to a few thousands nm. These vesicles consist of one or several bilayers which separate an intravesicular from an external medium. Within these bilayers, like in the biological membrane, motion of phospholipids is observed. Liposomes are easy to prepare. The hydration of a phospholipidic film leads to the formation of multilamellar liposomes. Additional steps are required to form unilamellar liposomes. Liposomes are used for industrial purposes, such as the targeting of cosmetological compounds. They may also be used as therapy vectors, for drug delivery or as vaccine supports. Liposomes are good models for membranes and are widely used for improving the understanding of biological events that occur in cell membranes, such as permeability, fluidity, protein anchoring and fusion of membranes. This paper mainly emphasizes membrane fusion.

Keywords. Bilayer, phospholipid, motion, application, fusion, preparation.

1. QU'EST-CE QU'UN LIPOSOME ?

La première personne à avoir volontairement fabriqué des liposomes est Bangham en 1965 (Bangham *et al.*, 1965). Les liposomes sont des structures fermées constituées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques organisées entre deux compartiments aqueux (**Figure 1A**) (Bangham *et al.*, 1965 ; Johnson *et al.*, 1971). Leur taille varie de 20 nm à plusieurs dizaines de μm . Lorsque des protéines sont insérées dans leur matrice, on parle alors de protéoliposomes (Rigaud, 2002).

À l'exception des lysophospholipides et de quelques phospholipides acides, les phospholipides naturels forment spontanément des liposomes en milieu aqueux (Poznansky, Weglicki, 1974 ; Lebed' *et al.*, 1989). Les phospholipides sont des molécules amphiphiles qui possèdent une tête polaire et une queue apolaire. En milieu aqueux, l'organisation la

plus stable est celle qui permet de minimiser les interactions entre composantes hydrophobes et molécules d'eau. Les lipides s'organisent le plus souvent en bicouches avec les queues apolaires au centre de la bicouche non accessible à l'eau et les têtes polaires exposées au milieu aqueux (**Figure 1B**). Cette structure est refermée sur elle-même en une vésicule, qui isole un compartiment interne aqueux. Le libre passage de macromolécules d'un compartiment à l'autre est empêché, au contraire de celui de quelques solutés hydrophobes ou de petits solutés hydrophiles qui diffusent librement au travers de la bicouche (Inoue, 1974 ; Naoi *et al.*, 1977 ; Deamer, Bramhall, 1986). L'épaisseur d'une bicouche est plus ou moins égale à deux fois la longueur des plus grands lipides qui la composent. Le contenu de la bicouche, et notamment la présence de protéines, peut en augmenter l'épaisseur, qui reste toutefois inférieure à 10 nm (Callow, McGrath, 1985 ; Tahara, Fujiyoshi, 1994).

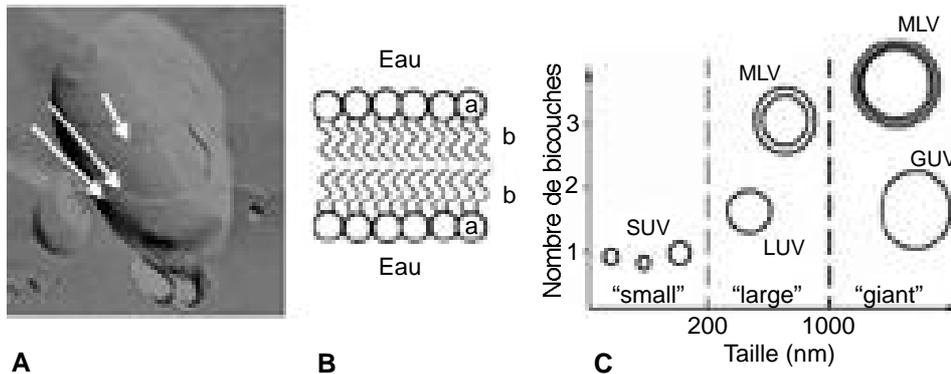


Figure 1. A. Photographie d'un liposome multilamellaire obtenu par fracture par Gabriel Peranzi (IBSERM U 410). Les flèches blanches indiquent les différentes bicouches lipidiques—*Photograph of a multilamellar liposome prepared by fracture by Gabriel Peranzi (IBSERM U 410).* The white arrows indicate a phospho-lipidic bilayer; **B.** Représentation d'une bicouche lipidique—*Diagram of a lipidic bilayer*

(a) tête polaire — *polar head*, (b) queue hydrophobe — *hydrophobic tail*; **C.** Classification des liposomes selon leur nombre de bicouches et leur taille — *Classification of the liposomes according to size and number of bilayers.*

On classe les liposomes selon leur taille et leur nombre de bicouches. On distingue les liposomes multilamellaires (MLV), les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV), les liposomes unilamellaires de grande taille (LUV) et les liposomes géants (GUV) (Figure 1C).

2. MOUVEMENTS DES LIPIDES DANS UN LIPOSOME

2.1. Rotation des chaînes latérales et fluidité membranaire

Une rotation est possible autour des liaisons C-C des chaînes hydrocarbonées des queues apolaires des phospholipides. La configuration *trans* est la plus stable (Keweloh, Heipieper, 1996). Dans une situation où toutes les configurations autour des liaisons C-C sont de type *trans*, la chaîne est étirée au maximum (Figure 2A). Deux autres configurations des liaisons C-C sont possibles : les configurations gauche + et gauche -. Des configurations gauches dans une chaîne provoquent un changement de direction (Figure 2B). Le passage d'une configuration *trans* à une configuration gauche autour d'une liaison C-C nécessite de l'énergie (Berde *et al.*, 1980). Il peut aussi y avoir des doubles liaisons *cis* au niveau de la chaîne (Cevc, 1991). La double liaison *cis* conduit également à un changement de direction.

À une température suffisamment faible, la plupart des chaînes carbonées des lipides sont *trans*. Les chaînes sont parallèles les unes aux autres et la conformation de la bicouche est de type *gel* (Figure 2C). Une élévation de température entraîne un accroissement de la mobilité moléculaire (Schechter, 2002). La probabilité d'une isomérisation *trans* → gauche augmente. Dans une bicouche lipidique, les liaisons *cis* et gauches rendent le parallélisme des chaînes plus difficile (Berde *et al.*, 1980 ; Cevc, 1991). Au-delà d'une température donnée, appelée température de

transition, une transition coopérative est observée, qui fait passer la conformation ordonnée à une conformation désordonnée (Figure 2D). Dans la conformation désordonnée, appelée *fluide*, les chaînes oscillent autour d'un axe moyen perpendiculaire au plan de la membrane. Les chaînes ne sont plus étirées au maximum et l'épaisseur de la bicouche diminue (Cevc, 1991). Le contact entre chaînes est moins étroit et les lipides sont plus séparés les uns des autres. Ainsi, au cours de la transition, une expansion latérale des lipides dans la bicouche est observée, aux dépens de l'épaisseur. La surface occupée à l'interface est plus importante.

Tout ce qui s'oppose à l'expansion latérale des lipides s'oppose à la transition de l'état ordonné vers l'état désordonné. Plus le nombre d'interactions inter-lipidiques est grand, moins l'expansion latérale est grande. Ainsi,

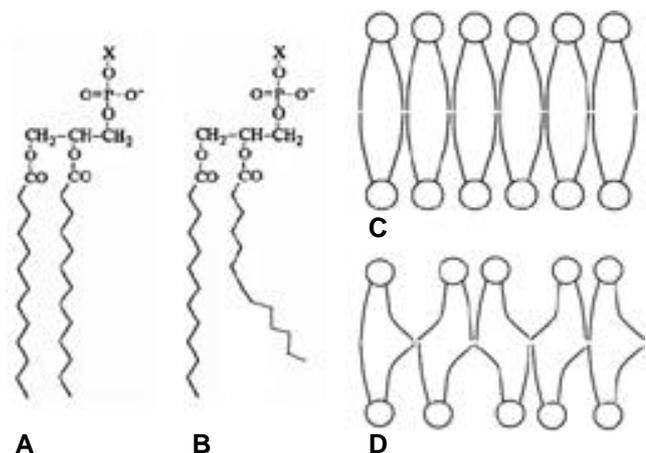


Figure 2. A. Phospholipide Tout-*trans* — *All-trans phospholipid*; **B.** Phospholipide avec une liaison gauche — *Phospholipid with a "gauche" bond*; **C.** Membrane en conformation *gel* — *Bilayer in gel conformation*; **D.** Membrane en conformation *fluide* — *Bilayer in fluid conformation.*

la température de transition augmente avec le nombre d'interactions entre lipides, notamment les interactions hydrophobes (Seydel *et al.*, 1981). Le nombre d'interactions hydrophobes augmentent avec la longueur des chaînes acyles des lipides. La température de transition augmente donc proportionnellement à la longueur des chaînes acyles (**Tableau 1**). Par contre, les insaturations *cis* défavorisent les interactions entre chaînes. La température de transition diminue donc fortement avec le nombre d'insaturations *cis* (**Tableau 1**). La température de transition dépend ainsi de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acides gras constituant les lipides de la membrane. Il y a donc une relation linéaire entre la température de fusion des acides gras d'un lipide et la température de transition d'une membrane composée de ce lipide (**Tableau 1**) (Chaudhury, Ohki, 1981).

Des mouvements autres que l'expansion latérale interviennent aussi au niveau des phospholipides des bicouches lipidiques. En effet, les lipides tournent autour de leur axe perpendiculairement au plan de la membrane (**Figure 3A**). Les chaînes hydrocarbonées sont flexibles et animées d'un mouvement de balancier plus ou moins prononcé ; ces mouvements confèrent à la membrane une certaine fluidité et un mouvement de diffusion latérale (**Figure 3B**) ; cette diffusion est relativement lente (Kornberg, McConnell, 1971a ; Devaux, McConnell, 1972 ; Gaede, Gawrisch, 2003).

La fluidité membranaire dépend de la température mais aussi de la conformation des chaînes lipidiques

Tableau 1. Températures de transition de lipides et températures de fusion des acides gras composant ces lipides selon la longueur de leurs chaînes acyles et le nombre d'insaturations en configuration *cis* (Schechter, 2002). 18 :1 correspond à une chaîne acyle de 18 carbones, contenant une insaturation — *Lipid transition temperatures and melting temperatures of their constitutive fatty acids according to length of acyl chains and the number of cis unsaturations (Schechter, 2002). 18:1 stands for one acyl chain of 18 carbons and one unsaturation.*

Phospholipide	Température (°C)	
	transition	fusion des acides gras
Longueur de chaîne		
12 :0, 12 :0 (DLPC)	-2	44
14 :0, 14 :0 (DMPC)	25	54
16 :0, 16 :0 (DPPC)	41	63
18 :0, 18 :0 (DSPC)	55	70
Saturation des chaînes		
18 :0, 18 :0 PE	108	70
18 :1, 18 :1 PE	10	13
18 :2, 18 :2 PE	-20	-5
18 :3, 18 :3 PE	-30	-11

composant la vésicule (**Figure 4**) (Schechter, 2002). Lorsque celles-ci sont ordonnées, leurs interactions sont fortes et la fluidité est faible. Le passage d'un état de la bicouche du liposome à un état s'accompagne d'une brusque augmentation de la fluidité (**Figure 4**). Pour les mêmes raisons que la température de transition, à une même température, la fluidité est plus importante pour une bicouche composée de phospholipides à courtes chaînes acyles que pour une bicouche composée de phospholipides à longues chaînes acyles. Par contre, la présence de liaisons gauches ou *cis*, qui contrarient le parallélisme des chaînes acyles, accroît la fluidité.

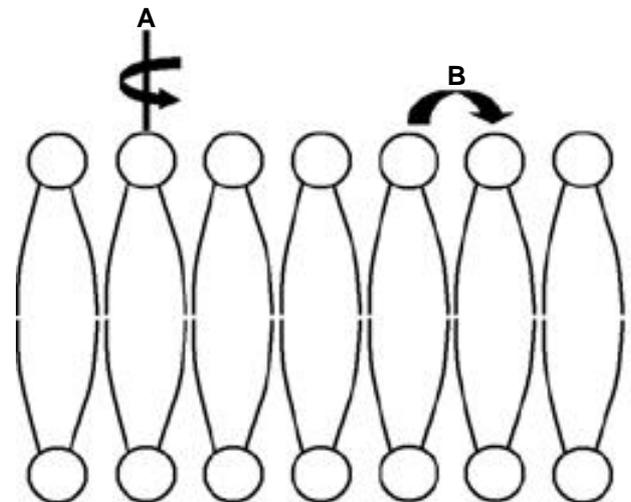


Figure 3. Représentation du mouvement des lipides — *Schematic lipid motions.*

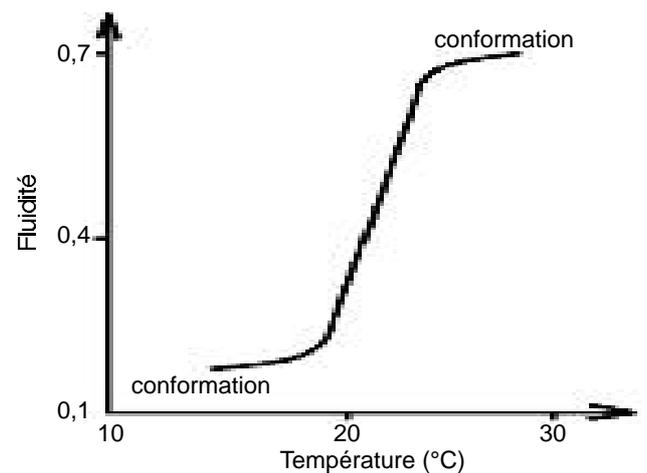


Figure 4. Mesure de la fluidité de la DiméthylPhosphatidylCholine (DMPC) en fonction de la température — *Temperature depending on the fluidity measurement for DimethylPhosphatidylCholine (DMPC).*

2.2. Asymétrie et diffusion transversale des lipides dans un liposome

Les lipides sont capables de passer d'une monocouche à l'autre. Il s'agit d'une diffusion transversale également appelée "flip-flop" (**Figure 5**). Un lipide diffuse d'une monocouche à l'autre ; la diffusion transversale d'un lipide implique le passage de sa partie polaire à travers la membrane d'une interface à l'autre (Kornberg, McConnell, 1971b ; Kirby, Green, 1977 ; Middelkoop *et al.*, 1986). Le "flip-flop" est un processus peu fréquent ; on estime qu'il faut plusieurs jours pour qu'un flip-flop se produise (Rothman, Dawidowicz, 1975). Dans les protéoliposomes, cette diffusion peut être facilitée par des protéines membranaires intégrales, la partie polaire du lipide évitant le contact avec la partie hydrophobe de la membrane (Barsukov *et al.*, 1982).

3. PRÉPARATION DE LIPOSOMES

La méthode la plus simple pour préparer des liposomes consiste à évaporer le solvant organique dans lequel sont dissous les lipides, puis à les remettre en suspension dans un solvant aqueux (Bangham *et al.*, 1965). Cette opération doit se dérouler dans des conditions de température dépendant de la nature du (des) lipide(s) choisi(s). En effet, les liposomes ne se forment qu'à une température supérieure à celle de leur transition de phase. Une agitation est souvent nécessaire pour améliorer les résultats. Dans un milieu aqueux, le film lipidique s'hydrate et les phospholipides s'associent de manière à ne pas exposer leurs chaînes acyles au solvant : il en résulte la formation de bicouches, qui se referment en emprisonnant du solvant. Des bicouches peuvent enfermer d'autres bicouches de plus petite taille. Ainsi, lors de cette préparation, des liposomes multilamellaires se constituent en bicouches lipidiques concentriques et séparées, les unes des autres, par des couches d'eau (MLV). Ces liposomes ont des tailles très hétérogènes et possèdent un volume aqueux interne relativement faible par rapport au poids du lipide (**Figure 1C**).

Un traitement physique doit être appliqué aux MLV pour les transformer en vésicules de taille

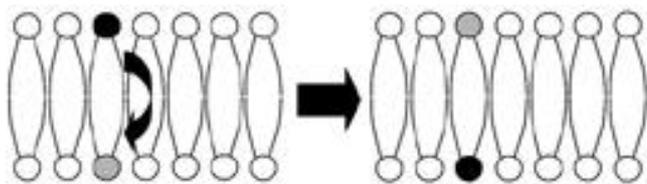


Figure 5. Représentation du mouvement flip-flop — *Flip-flop motion*.

homogène, formées d'une seule bicouche lipidique entourant un milieu aqueux. Suivant le traitement appliqué, les vésicules peuvent être de petite taille (SUV) ou de grande taille (LUV). Les SUV (**Figure 1C**) s'obtiennent le plus fréquemment en soumettant une suspension de MLV aux ultrasons (50 W pendant cinq minutes) (Lorin *et al.*, en préparation). Lors de cette étape, la suspension de liposomes doit être maintenue à une température supérieure à celle de transition. Pendant la sonication, les phospholipides risquent de s'oxyder (au niveau des liaisons C=C) et même de s'hydrolyser (Klein, 1970 ; Hauser, 1971 ; Huang, Charlton, 1972). Pour éviter la dégradation, un certain nombre de précautions doivent être prises en soniquant à basse fréquence, durant un temps court et sous atmosphère d'azote ou d'argon (Lorin *et al.*, en préparation). La tête de sonication produit des fragments de titane, qui sont éliminés en même temps que les MLV résiduels, soit par centrifugation (10.000 g pendant deux minutes), soit par tamisage moléculaire sur Sépharose (Elorza *et al.*, 1993 ; Lorin *et al.*, en préparation). Par définition, les SUV ont un diamètre inférieur à 200 nm.

En vue de préparer des LUV (**Figure 1C**), la solution de MLV est soumise à des cycles de congélation/décongélation, ce qui fragilise la membrane et permet de reconstruire des liposomes unilamellaires (Pillot *et al.*, 1996). Les MLV résiduels et les LUV de trop grande taille sont éliminés par filtration (pore de 100 nm). Du fait du grand diamètre des LUV, l'organisation des phospholipides est identique dans chacune des monocouches (Schieren *et al.*, 1978).

Des liposomes peuvent aussi être préparés par la technique de l'inversion de phase (Papahadjopoulos, Watkins, 1967) ou par dialyse de détergents contenant les phospholipides (Luna, McConnell, 1977).

4. APPLICATIONS DES LIPOSOMES

4.1. Applications thérapeutiques

Les liposomes peuvent véhiculer des médicaments dans l'organisme. Suivant la nature du médicament, sa localisation au niveau du liposome est différente. Si le médicament est soluble dans l'eau, il est encapsulé dans le volume intraliposomal, alors que s'il est hydrophobe, il est dissous dans la phase lipidique (Bouffieux, 1995 ; Yu, Lin, 2000 ; Redziniak, 2003). S'il est amphiphile, le composé est localisé au niveau de l'interface tête polaire/queue hydrophobe des phospholipides (Bouffieux, 1995 ; Espuelas *et al.*, 2003). Dans les trois cas, le principe actif peut être véhiculé dans l'organisme par simple injection (Gregoriadis, 1981). Dans la circulation, les liposomes fusionnent avec des membranes cellulaires ou sont

endocytés (Pagano, Weinstein, 1978). Le principe actif est alors délivré dans la cellule. La firme Theralipids Inc. a créé, en 1996, un liposome pouvant fusionner avec les parois bactériennes (http://www.theralipids.com/fr/strategy_fr.htm). Ces liposomes, qui peuvent être administrés directement par inhalation, favorisent de façon marquée la pénétration de l'agent antimicrobien (comme la tobramycine) dans les micro-organismes et améliorent l'efficacité de celui-ci en prolongeant sa durée de vie.

Le médicament peut être aussi délivré lentement et de manière continue par le liposome vers les cellules cibles sans qu'il y ait pénétration des liposomes dans les cellules. Ainsi, la morphine, composé amphiphile, peut être encapsulée dans des liposomes multilamellaires (Bouffieux, 1995). Après injection de ces liposomes à l'endroit où l'on désire l'anesthésie, la morphine diffuse lentement au travers des nombreuses bicouches des MLV avant d'être libérée de façon passive et continue dans le milieu. L'emploi de liposomes permet de prolonger l'action de la morphine et de réduire sa concentration locale et donc sa toxicité et ses effets secondaires (Bouffieux, 1995).

Les liposomes sont rapidement éliminés de la circulation par les macrophages (Schwendener *et al.*, 1984). Ils s'accumulent dans le foie et la rate, ce qui limite leur utilisation pour traiter des affections au niveau d'autres organes (Hinkle *et al.*, 1978 ; van Rooijen, van Nieuwmegen, 1984). Par contre, le traitement des affections spécifiques du foie et de la rate est plus facile *via* les liposomes. Pour augmenter le temps de vie des liposomes dans la circulation, une composition lipidique spéciale doit être utilisée afin d'éviter la phagocytose. L'addition de gangliosides ou de polyéthylène glycol augmente le temps de circulation (Klibanov *et al.*, 1990 ; Correa *et al.*, 1993).

Les liposomes peuvent encapsuler un gène ou un plasmide (Dimitriadis, 1979 ; Perrie, Gregoriadis, 2000). Dans ce cas, le liposome est utilisé comme vecteur de thérapie génique. Après injection, le liposome est endocyté au niveau de la membrane cellulaire (Zhou, Huang, 1994 ; Li *et al.*, 1996). Puis, le liposome fusionne avec l'endosome, permettant la libération de l'ADN. L'ADN peut alors s'exprimer dans la cellule. Pour cette utilisation, le liposome doit satisfaire à plusieurs conditions. Il doit tout d'abord présenter à sa surface un promoteur de fusion, qui permet une meilleure intégration dans les cellules cibles. Ce promoteur est fréquemment une glycoprotéine virale de surface (ex : protéine F du virus de Sendai) (Kunisawa, Mayumi, 2001 ; Kim, Park, 2002). Le liposome est aussi composé de certains phospholipides et/ou protéines qui diminuent leur capture par les cellules macrophages et permettent un ciblage tissulaire (Torchilin *et al.*, 1980 ; Moghimi,

Szebeni, 2003). Enfin, les liposomes employés en thérapie génique sont sensibles au pH (Leventis *et al.*, 1987). En effet, si le liposome est absorbé par la cellule, il se retrouve dans le lysosome à un pH acide. S'il est sensible au pH, il peut y avoir fusion avec le lysosome et libération du matériel génétique dans le cytoplasme de la cellule. Certains liposomes portent des charges cationiques en surface, qui permettent de déstabiliser la membrane des endosomes (Zhou, Huang, 1994 ; Noguchi *et al.*, 1998 ; Briane *et al.*, 2002). Malgré les avancées effectuées ces dernières années, l'emploi de liposomes comme vecteurs de matériel génétique reste limité. L'efficacité de transfection est plus faible qu'avec les vecteurs viraux (<http://www.medespace.com/cancero/doc/therageni.html>), en particulier des problèmes de ciblage du noyau sont observés et le temps d'expression du gène est souvent trop court. Néanmoins, certaines firmes fournissent des liposomes conçus pour transporter du matériel génétique et transfecter des cellules. Ainsi, le "Transfast Transfection Reagent" est un liposome composé d'un lipide cationique synthétique en association avec un lipide neutre, le DOPE, qui permet de transfecter des cultures primaires neuronales (<http://www.promega.com/fr/promegazette/Prom26/prom7.pdf>). Selon la firme qui le commercialise, ce liposome assure une transfection rapide (en 30 à 60 minutes), élevée (5 % des cellules neuronales traitées), stable, moyennant une relative facilité d'emploi.

Les liposomes sont aussi employés pour exposer des protéines à leur surface. Dans le cas de glycoprotéines virales, ces liposomes sont appelés virosomes (Almeida *et al.*, 1975 ; Kapczynski, Tumpey, 2003). Après injection, les virosomes sont en grande partie captés par les cellules macrophages (Wijburg *et al.*, 1998). Ils exposent ainsi directement l'agent antigène et activent le système immunitaire (<http://www.exopol.com/fr/base3.fr.html> ; Wijburg *et al.*, 1998). Ces virosomes sont donc employés comme vaccins. Leur avantage est de ne pas contenir de matériel génétique infectieux tout en présentant la molécule antigénique.

4.2. Applications cosmétologiques

De nombreuses substances utilisées en cosmétologie (antioxydants, collagène, etc.) sont en général appliquées localement sous forme d'émulsion huileuse ou de solution alcoolique. L'huile et l'alcool peuvent endommager la peau en cas d'application prolongée. L'encapsulation dans des liposomes permet de contourner ce problème (Lasic, 1998 ; Schechter, 2002 ; Redziniak, 2003). Aussi, en plus de la diffusion passive et continue du produit au travers des bicouches des liposomes, ceux-ci peuvent fusionner avec les

cellules de la peau et libérer le principe actif dans la cellule et augmenter son efficacité.

4.3. Applications biochimiques et biophysiques

Les liposomes sont largement utilisés pour l'étude des propriétés membranaires. En effet, ils constituent un modèle membranaire qui tente de reproduire la structure et les propriétés des membranes biologiques. L'avantage de leur utilisation réside dans la possibilité de moduler les conditions expérimentales pour mettre en évidence l'influence de certains facteurs sur les propriétés membranaires. L'effet de paramètres tels que la composition lipidique, la température, la force ionique, l'asymétrie lipidique et le pH du milieu peut être étudié (Szoka, Papahadjopoulos, 1980 ; Tonkonog *et al.*, 1982 ; Carrión *et al.*, 1994 ; Nacka *et al.*, 2001). Un large éventail de techniques a été développé. La plupart s'appliquent à l'étude de membranes biologiques (Owen, 1980 ; Struck *et al.*, 1981 ; Hoekstra *et al.*, 1984 ; Ehrenberg, 1986 ; Hong *et al.*, 1988 ; Hope *et al.*, 1989 ; Schanck *et al.*, 1992 ; Fenske, 1993 ; Winterhalter, Lasic, 1993). Elles donnent accès à des informations diverses, telles que la perméabilité, la fluidité ou encore l'organisation des vésicules.

Il importe cependant de rester vigilant avant d'extrapoler aux membranes biologiques les résultats obtenus avec des liposomes. Ces derniers ne miment pas parfaitement la complexité des structures membranaires. Ils ne reproduisent que pauvrement l'implication des facteurs extramembranaires dans la régulation de leurs fonctions. La matrice lipidique des liposomes peut assez bien correspondre à celle des membranes biologiques. Par contre, il est difficile de prendre en considération des éléments comme la variabilité des chaînes d'acides gras ou la présence de certains lipides et glycolipides dans les membranes biologiques. De plus, les membranes biologiques sont entourées par des milieux complexes et différents de part et d'autre, alors que les liposomes sont généralement dans un tampon de pH et de contenu ionique déterminés mais homogènes.

Toutefois, les liposomes constituent de bons modèles pour étudier ce qui se déroule au niveau membranaire lors de différents processus tels que la fusion (Martin, Ruysschaert, 2000).

4.4. Un exemple d'application biochimique : mesure de la fusion de membranes

La fusion membranaire est un mécanisme biologique important intervenant dans des processus aussi variés que la fécondation (fusion de deux cellules), la fusion virale, la division cellulaire, l'endocytose et l'exocytose. Elle implique le rapprochement, la

coalescence de deux bicouches lipidiques et une réorganisation structurale de ces bicouches. Lors de cette fusion, il y a mélange des lipides et des milieux aqueux de chaque vésicule.

Détection expérimentale de la fusion. Idéalement, la fusion entre deux liposomes s'effectue sans qu'il y ait contact entre le contenu des liposomes et le milieu extérieur.

Mélange de lipides. La technique la plus utilisée pour suivre le mélange de lipides consécutif à une fusion est le transfert d'énergie par résonance entre deux sondes de fluorescence (Hoekstra, 1982). En pratique, les donneurs et accepteurs utilisés sont, le plus souvent, des dérivés fluorescents de phospholipides. Le couple NBD/Rh (N[7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl]/N[lissamine rhodamine B sulfonyle]) est un exemple (formule fournie à la **figure 7**). Dans ce couple, le NBD (= longueur d'onde ; excitation = 460 nm ; émission = 535 nm) est le donneur d'énergie et le Rh (excitation = 563 nm ; émission = 585 nm) est l'accepteur (**Figure 6**). Le chromophore peut être attaché à la partie polaire ou à une chaîne hydrocarbonée du lipide, comme la phosphatidyl-éthanolamine ; le couple est alors NBD-PE/Rh-PE.

Les deux sondes sont fluorescentes. Excité à 460 nm, le NBD retourne à l'état fondamental en émettant à une longueur d'onde de 535 nm. Il faut exciter le Rh à 563 nm pour mesurer sa fluorescence à 585 nm (**Figure 6A**). Lorsqu'ils sont éloignés de plus de 2 nm, l'énergie libérée par l'excitation de NBD ne permet pas d'exciter le Rh. À plus courte distance, l'accepteur Rh est capable d'absorber l'énergie de fluorescence du donneur NBD. L'excitation du donneur suivie de son retour à l'état fondamental peut donc s'accompagner d'une excitation du receveur. Il s'agit d'un transfert d'énergie par résonance. On observe alors, en n'excitant que le donneur, l'apparition d'une fluorescence du receveur. L'efficacité du transfert d'énergie dépend de la distance entre le donneur et le receveur. Elle est nulle pour une distance supérieure à 2 nm. Le transfert d'énergie entre deux sondes fluorescentes nécessite, au moins de manière partielle, le recouvrement entre le spectre d'émission (fluorescence) du donneur et le spectre d'excitation (absorption) de l'accepteur.

Les deux dérivés lipidiques sont insérés dans des liposomes différents et aucun transfert d'énergie n'est possible avant fusion. La fusion s'accompagne d'un rapprochement des deux dérivés au sein d'une même membrane. L'émission à 460 nm excite alors le NBD qui transmet son énergie au Rh (**Figure 6B**). L'excitation de celui-ci provoque une émission mesurable à 585 nm. S'il y a fusion, la fluorescence du Rh-PE augmente sous l'application d'une excitation à

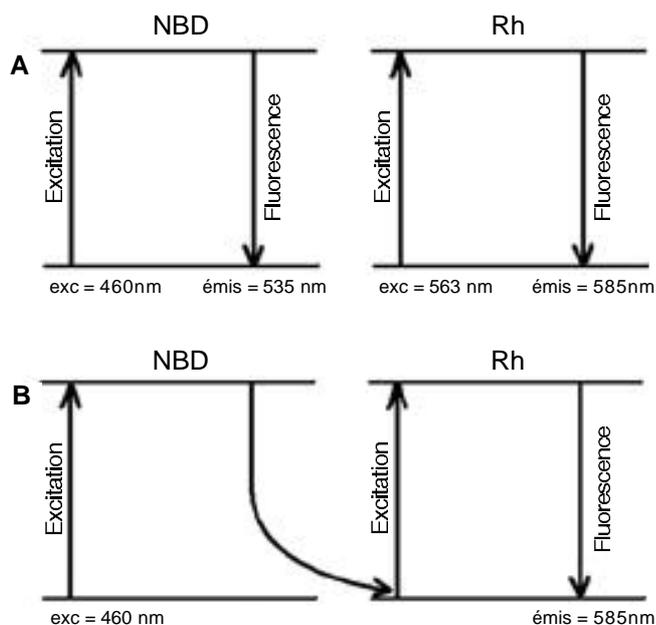


Figure 6. Principe du transfert d'énergie par résonance — *Principle of energy transfer by resonance.*

A. Les deux molécules fluorescentes sont à une distance qui ne permet pas le transfert d'énergie. Excitation à des longueurs d'onde différentes du NBD et de Rh — *The two fluorescent molecules are not close enough to allow energy transfer to occur. Excitation at different wavelengths of Rh and NBD.* **B.** Les deux molécules fluorescentes sont à une distance qui permet le transfert d'énergie. Excitation du NBD à 460 nm. Transfert d'énergie du NBD vers le Rh non excité. Excitation du Rh suivie de sa fluorescence mesurable à 585 nm — *The two fluorescent molecules are close enough for the energy transfer to occur. Excitation of NBD at 460 nm. Transfer of energy from NBD to non excited Rh. Excitation of Rh and emission measured at 585 nm.*

460 nm. Par contre, celle du NBD-PE diminue (**Figure 7**).

Par cette méthode, il n'est toutefois pas facile de distinguer la fusion de liposomes d'une simple agrégation. Cette dernière s'accompagne également d'un rapprochement des deux sondes.

Cette difficulté peut être contournée en insérant initialement les deux sondes dans une même population de vésicules et en suivant la fusion avec des vésicules dénuées de sondes fluorescentes. La simple agrégation avec des vésicules dénuées de sonde ne conduit pas à une variation du transfert d'énergie. Seule la fusion avec des liposomes dénués de dérivés fluorescents s'accompagne d'une augmentation de la distance moyenne des dérivés fluorescents, donc d'une diminution du transfert d'énergie. Excité à 460 nm, la fluorescence du Rh-PE diminue, alors que celle du NBD-PE augmente (**Figure 8**).

Dans d'autres essais, un dérivé d'acide gras fluorescent, tel que l'octadecylrhodamine B, peut être

inséré dans la membrane de liposomes (**Figure 9**) (Ellens *et al.*, 1985). À fortes concentrations de la sonde, une extinction de fluorescence est observée. La fusion avec des liposomes ne contenant pas la sonde conduit à sa dilution et donc à une augmentation de fluorescence.

Mélange des contenus intravésiculaires. La fusion de deux membranes peut également être suivie par le mélange des compartiments aqueux (Ellens *et al.*, 1985). Pour cela, deux composés dont les propriétés diffèrent selon qu'ils sont séparés ou mélangés, sont encapsulés séparément dans le compartiment aqueux de deux populations de liposomes. Le plus fréquemment, on encapsule une sonde fluorescente dans les compartiments d'une première population de liposomes et un "quencher" de cette sonde dans une seconde population. La fluorescence de la première population est notée avant la fusion. Lorsque la fusion a lieu, les deux compartiments aqueux se mélangent (**Figure 10**). Le "quencher" provoque alors l'extinction de la fluorescence de la sonde. L'ANTS est la sonde la plus fréquemment employée pour ce test, alors que le "quencher" utilisé est le DPX.

Les liposomes : utiles pour la compréhension des étapes de la fusion. Ces tests de fusion de liposomes ont permis d'étudier de nombreux mécanismes intervenant lors de la fusion.

L'analyse de la fusion des liposomes a tout d'abord montré que les deux bicouches devaient entrer en contact avant la fusion, impliquant au moins de manière transitoire un réarrangement de la bicouche et l'adoption par les lipides d'une structure d'énergie plus élevée (Wilschut, Hoekstra, 1986 ; White, 1992 ; Zimmerberg, Chernomordik, 1999). Cette augmentation d'énergie a été observée lors de l'analyse de la fusion de liposomes ou de bicouches (Wilschut, Hoekstra, 1986 ; Chernomordik, Kozlov, 2003). Cet assemblage ne se réalise pas spontanément. La présence de catalyseurs est nécessaire. Dans le cas de la fusion virale, il a été clairement montré, par analyse de fusion de liposomes, que le catalyseur pouvait être un petit fragment d'une glycoprotéine de surface virale, appelé peptide de fusion (White, 1992 ; Epand, 2003). C'est l'addition du peptide de fusion à des liposomes qui assure leur fusion (White, 1992 ; Glushakova *et al.*, 1992 ; Bailey *et al.*, 1997). Ces études ont permis de mieux caractériser la structure des peptides de fusion et leur mode d'action sur les bicouches. Ces segments protéiques agissent en s'insérant obliquement, sous forme hélicoïdale, dans la membrane (Tatulian *et al.*, 1995 ; Pereira *et al.*, 1995 ; Martin, Ruysschaert, 2000 ; Brasseur, 2000 ; Han *et al.*, 2001 ; Gordon *et al.*, 2002). L'insertion perturberait le parallélisme des chaînes acyles des

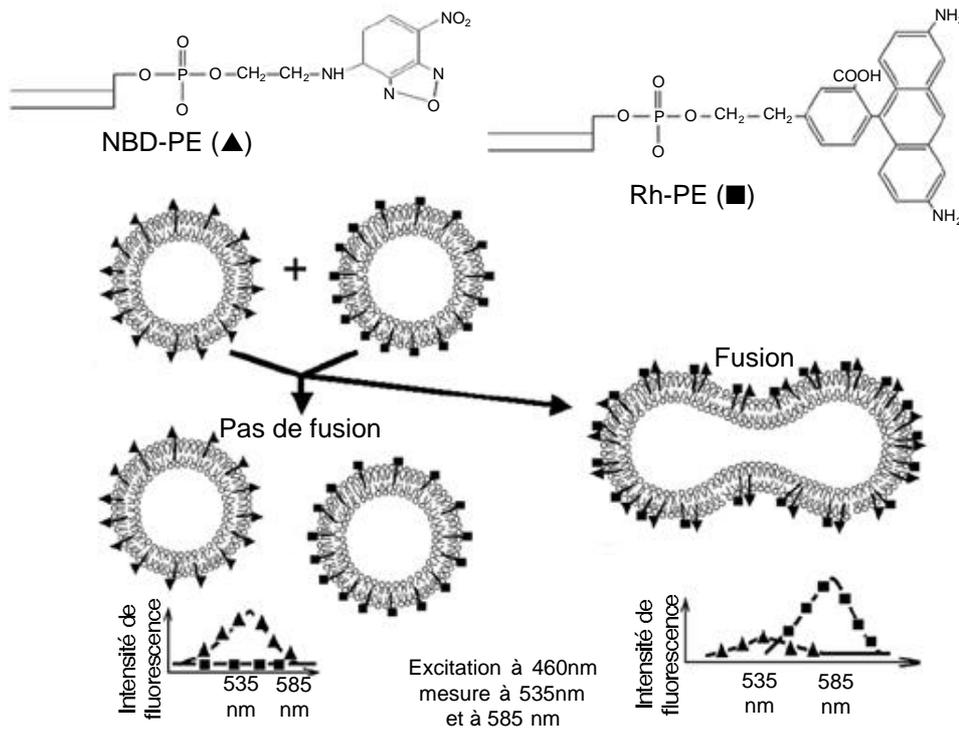


Figure 7. Analyse de la fusion par la méthode de transfert d'énergie par résonance entre deux sondes de fluorescence préalablement insérées dans deux populations de liposomes différentes — *Fusion analysis by the energy transfer method, by resonance between two fluorescence probes incorporated into two distinct populations of liposomes.*

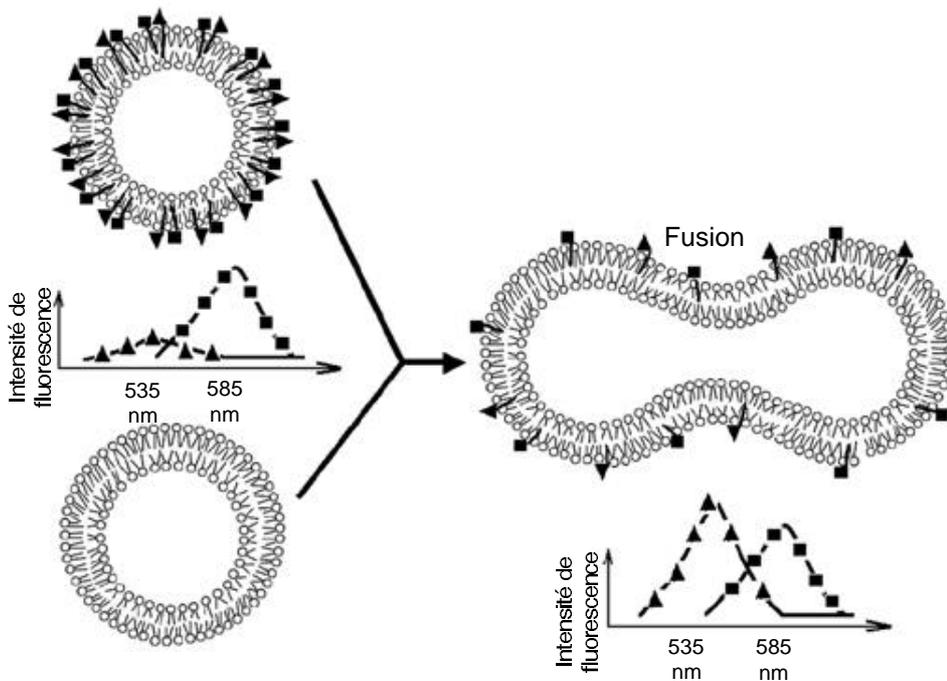


Figure 8. Analyse de la fusion par la méthode de transfert d'énergie par résonance entre deux sondes de fluorescence préalablement insérées dans la même population de liposomes — *Fusion analysis by the energy transfer method, by resonance between two probes of fluorescence incorporated into the same liposome population.*

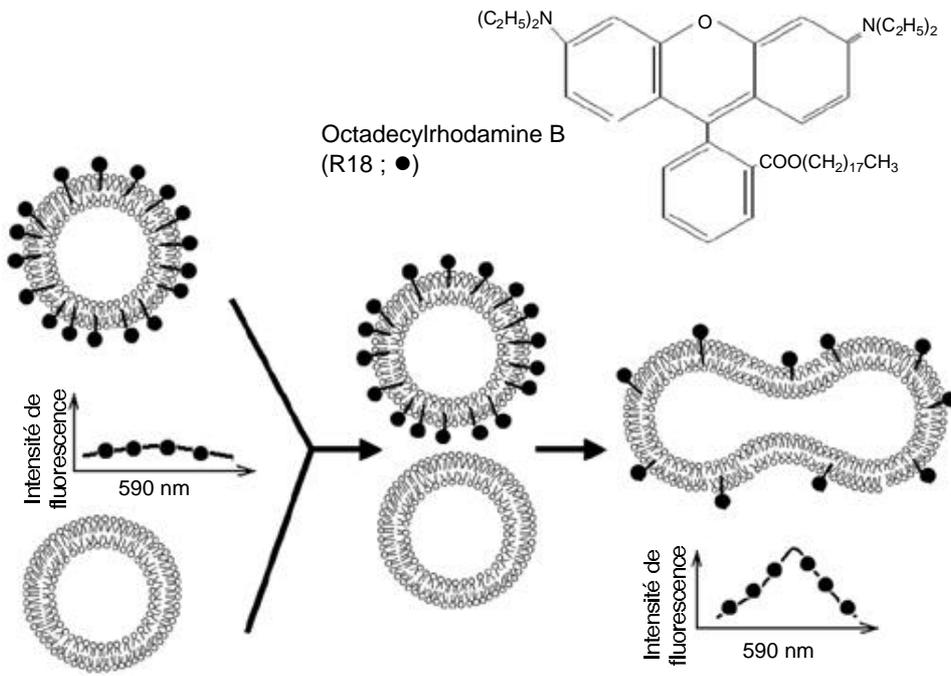


Figure 9. Analyse de la fusion par la méthode d'inhibition de fluorescence d'une sonde préalablement insérée dans une population de liposomes — *Fusion analysis by fluorescence quenching of a probe incorporated into a liposome population.*

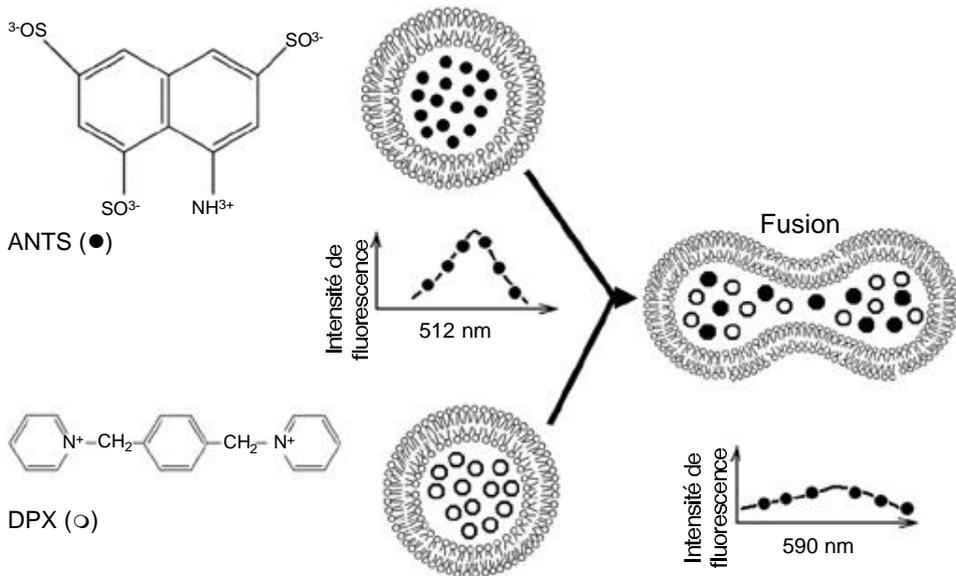


Figure 10. Analyse de la fusion par la méthode de transfert d'énergie par résonance entre deux sondes de fluorescence préalablement insérées dans le milieu aqueux de deux populations de liposomes — *Fusion analysis by the energy transfer method, by resonance between two probes of fluorescence incorporated into the aqueous medium of two distinct liposome populations.*

phospholipides (Brasseur, 2000), qui se réorganisent autour des peptides de fusion (Siegel, Epanand, 2000). Après rapprochement des deux bicouches, la fusion entre les zones déstabilisées peut s'opérer. Les deux membranes mélangent leurs composants et fusionnent (White, 1992). Les fusions sont toujours contrôlées par des protéines (Hooft van Huijsduijnen, 1998 ; Myles, Primakoff, 1997 ; Stegmann, 2000). Ces protéines déstabilisent la bicouche lipidique et jouent ainsi un rôle catalytique.

Ces études réalisées sur le liposome, moins complexe que la membrane cellulaire, ont permis de mieux comprendre les étapes de fusion, comme schématisé à la **figure 11** (Schechter, 2002).

Pour qu'une fusion puisse avoir lieu, il est nécessaire qu'un contact s'établisse entre les monocouches externes des deux liposomes. Dans la région de contact, l'équivalent de deux lamelles lipidiques séparées par une couche d'eau se formerait (**Figure 11A**). L'enroulement des deux monocouches externes conduirait à la formation d'une micelle inversée (**Figure 11B**) (Bentz, Ellens, 1987 ; Chernomordik, 1996 ; Lee, Lentz, 1997). Cette micelle est caractérisée par un contact étroit des têtes polaires englobant un volume aqueux. La rupture coordonnée des deux monocouches internes en contact avec la micelle conduirait à un pore reliant les liposomes initiaux : c'est le pore de fusion (**Figure 11C**) (Bentz, Ellens, 1987). La dilatation de ce pore conduirait à la fusion complète : les deux liposomes n'en font plus qu'un (**Figure 11D**). Les lipides sont de nouveau structurés en bicouches (Chernomordik, 1996).

Un autre mécanisme de fusion a été proposé. Dans celui-ci, le contact des monocouches externes conduirait à l'amorçage de deux micelles inversées,

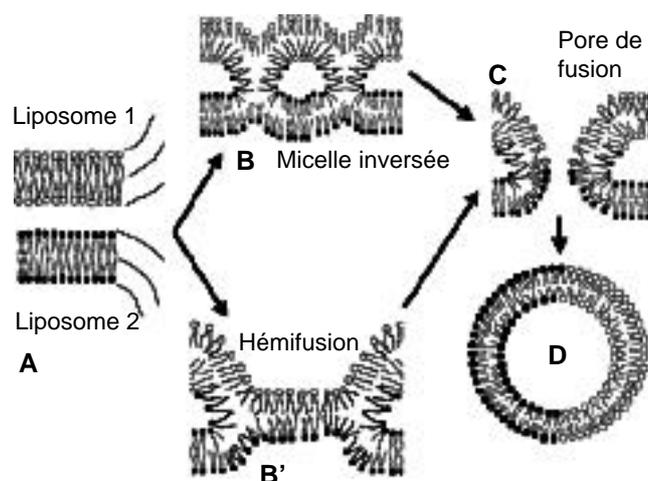


Figure 11. Structures adoptées par les lipides lors de la fusion — *Lipid structures during the fusion process.*

mais les micelles ne se formeraient pas entièrement (**Figure 11B'**) (Chernomordik, 1996 ; Hed, Safran, 2003). Ce premier contact forcerait plutôt un contact entre les monocouches internes. La rupture ultérieure des deux monocouches internes pourrait conduire au pore de fusion puis à la fusion des deux liposomes. Plusieurs études sur les liposomes soutiennent ce mécanisme (Bentz, Ellens, 1987 ; Chernomordik, 1996 ; Hed, Safran, 2003).

Les deux mécanismes postulent, entre le contact initial et la fusion, une étape de micelle inverse, appelée micelle de type III. Le passage par cet intermédiaire nécessite de franchir une barrière énergétique.

L'efficacité de la fusion dépend de la nature des lipides dans la zone de contact entre les deux liposomes. La composition de cette zone ne correspond pas nécessairement à la valeur moyenne attendue. En effet, les lipides sont animés d'une diffusion latérale importante, telle que la zone de contact est enrichie en lipides, tels que le cholestérol et les sphingolipides, qui ont tendance à adopter une organisation hexagonale favorable à la fusion (Wolf *et al.*, 2001 ; Shaikh *et al.*, 2003 ; Byström, Lindblom, 2003).

Bien que le mécanisme de la fusion soit de mieux en mieux compris, des questions persistent. Par quel mécanisme les bicouches se rapprochent-elles ? La déstabilisation d'une seule monocouche est-elle suffisante pour induire la fusion ? Comment le système permet-il une augmentation de l'énergie, même temporaire ? Comment le pore s'élargit-il ? Nul doute qu'un nouvel effort de recherche apportera des réponses à ces questions.

Liste des abréviations — Abbreviation list

- ANTS : acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique
- DOPE : dioléolphosphatidyl-éthanolamine
- DLPC : dilauréolphosphatidylcholine
- DMPC : diméthylphosphatidylcholine
- DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine
- DPX : bromure dip-xylène-bis-pyridinium
- DSPC : distéaroylphosphatidylcholine
- GUV : Liposome unilamellaire géant — *Giant Unilamellar Vesicle*
- LUV : Liposome unilamellaire de grande taille — *Large Unilamellar Vesicle*
- MLV : Liposome multilamellaire — *Multilamellar Vesicle*
- NBD : N[7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl]
- PE : phosphatidyléthanolamine
- Rh : N[lissamine rhodamine B sulfonyle]
- R18 : octadécylrhodamine B
- SUV : Liposome unilamellaire de petite taille — *Small Unilamellar Vesicle*.

Bibliographie

- Almeida JD., Edwards DC., Brand CM., Heath TD. (1975). Formation of virosomes from influenza subunits and liposomes. *Lancet* **2**, p. 899–901.
- Bailey AL., Monck MA., Cullis PR. (1997). pH-induced destabilization of lipid bilayers by a lipopeptide derived from influenza hemagglutinin. *Biochim. Biophys. Acta* **1324**, p. 232–244.
- Bangham AD., Standish MM., Watkins JC. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, p. 238–252.
- Barsukov LI., Kulikov VI., Bachmanova GI., Archakov AI., Bergelson LD. (1982). Cytochrome P-450 facilitates phosphatidylcholine flip-flop in proteoliposomes. *FEBS Lett.* **144**, p. 337–340.
- Bentz J., Ellens H. (1987). Membrane fusion: Kinetics and mechanisms. *Colloid. Surf.* **30**, p. 65–112.
- Berde CB., Andersen HC., Hudson BS. (1980). A theory of the effects of head-group structure and chain unsaturation on the chain melting transition of phospholipid dispersions. *Biochemistry* **19**, p. 4279–4293.
- Bouffieux O. (1995). *Utilisation des modèles moléculaires numériques dans la recherche industrielle pharmaceutique*. Travail de fin d'études. Bruxelles : Institut supérieur industriel de Bruxelles, 65 p.
- Brasseur R. (2000) Tilted peptides: a motif for membrane destabilization (hypothesis). *Mol. Membr. Biol.* **17**, p. 31–40.
- Briane D., Lesage D., Cao A., Coudert R., Lievre N., Salzmann JL., Taillandier E. (2002). Cellular pathway of plasmids vectorized by cholesterol-based cationic liposomes. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, p. 983–991.
- Byström T., Lindblom G. (2003). Molecular packing in sphingomyelin bilayers and sphingomyelin/phospholipid mixtures. *Spectrochim. Acta A* **59**, p. 2191–2195.
- Callow RA., McGrath JJ. (1985). Thermodynamic modeling and cryomicroscopy of cell-size, unilamellar, and paucilamellar liposomes. *Cryobiology* **22**, p. 251–267.
- Carrión FJ., De La Maza A., Parra JL. (1994). The influence of ionic strength and lipid bilayer charge on the stability of liposomes. *J. Colloid Interf. Sci.* **164**, p. 78–87.
- Cevc G. (1991). How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of unsaturation: an effective chain-length model. *Biochemistry* **30**, p. 7186–7193.
- Chaudhury MK., Ohki S. (1981) Correlation between membrane expansion and temperature-induced membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **642**, p. 365–374.
- Chernomordik L. (1996). Non-bilayer lipids and biological fusion intermediates. *Chem. Phys. Lipids* **81**, p. 203–213.
- Chernomordik LV., Kozlov MM. (2003). Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Ann. Rev. Biochem.* **72**, p. 175–207.
- Correa SG., Rivero VE., Yranzo-Volonté N., Romero-Piffiguer M., Ferro ME., Riera CM. (1993). Effect of gangliosides in the autoimmune response induced by liposome-associated antigens. *Autoimmunity* **15**, p. 195–200.
- Deamer DW., Bramhall J. (1986). Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. *Chem. Phys. Lipids* **40**, p. 167–188.
- Devaux P., McConnell HM. (1972). Lateral diffusion in spin-labeled phosphatidylcholine multilayers. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, p. 4475–4481.
- Dimitriadis GJ. (1979). Entrapment of plasmid DNA in liposomes. *Nucleic Acids Res.* **6**, p. 2697–2705.
- Ehrenberg B. (1986). Spectroscopic methods for the determination of membrane surface charge density. *Methods Enzymol.* **127**, p. 678–696.
- Ellens H., Bentz J., Szoka FC (1985). H⁺- and Ca²⁺-induced fusion and destabilization of liposomes. *Biochemistry* **24**, p. 3099–3106.
- Elorza B., Elorza MA., Sainz MC., Chantres JR. (1993). Analysis of the particle size distribution and internal volume of liposomal preparations. *J. Pharma. Sci.* **82**, p. 1160–1163.
- Epand RM. (2003). Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**, p. 116–121.
- Espuelas S., Haller P., Schuber F., Frisch B. (2003). Synthesis of an amphiphilic tetraantennary mannosyl conjugate and incorporation into liposome carriers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, p. 2557–2560.
- Fenske DB. (1993). Structural and motional properties of vesicles as revealed by nuclear magnetic resonance. *Chem. Phys. Lipids* **64**, p. 143–162.
- Gaede HC., Gawrisch K. (2003). Lateral diffusion rates of lipid, water, and a hydrophobic drug in a multilamellar liposome. *Biophys. J.* **85**, p. 1734–1740.
- Glushakova SE., Omelyanenko VG., Lukashevitch IS., Bogdanov AA.Jr., Moshnikova AB., Kozytch AT., Torchilin VP. (1992). The fusion of artificial lipid membranes induced by the synthetic arenavirus 'fusion peptide'. *Biochim. Biophys. Acta* **1110**, p. 202–208.
- Gordon LM., Mobley PW., Pilpa R., Sherman MA., Waring AJ. (2002). Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in membrane environments using (13)C-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1559**, p. 96–120.
- Gregoriadis G. (1981). Targeting of drugs: implications in medicine. *Lancet* **2**, p. 241–246.
- Han X., Bushweller JH., Cafiso DS., Tamm LK. (2001). Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat. Struct. Biol.* **8**, p. 715–720.

- Hauser HO. (1971). The effect of ultrasonic irradiation on the chemical structure of egg lecithin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, p. 1049–1055.
- Hed G., Safran SA. (2003). Initiation and dynamics of hemifusion in lipid bilayers. *Biophys. J.* **85**, p. 381–389.
- Hinkle GH., Born GS., Kessler W., Shaw SM. (1978). Preferential localization of radiolabeled liposomes in liver. *J. Pharma. Sci.* **67**, p. 795–798.
- Hoekstra D. (1982). Kinetics of intermixing of lipids and mixing of aqueous contents during vesicle fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **692**, p. 171–175.
- Hoekstra D., de Boer T., Klappe K., Wilschut J. (1984). Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes. *Biochemistry* **23**, p. 5675–5681.
- Hong K., Baldwin PA., Allen TM., Papahadjopoulos D. (1988). Fluorometric detection of the bilayer-to-hexagonal phase transition in liposomes. *Biochemistry* **27**, p. 3947–3955.
- Hooft van Huijsdijnen R. (1998). ADAM 20 and 21; two novel human testis-specific membrane metalloproteases with similarity to fertilin- α . *Gene* **206**, p. 273–282.
- Hope MJ., Redelmeier TE., Wong KF., Rodriguez W., Cullis PR. (1989). Phospholipid asymmetry in large unilamellar vesicles induced by transmembrane pH gradients. *Biochemistry* **28**, p. 4181–4187.
- Huang C., Charlton JP. (1972). Studies on the state of phosphatidylcholine molecules before and after ultrasonic and gel-filtration treatments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, p. 1660–1666.
- Inoue K. (1974). Permeability properties of liposomes prepared from dipalmitoyllecithin, dimyristoyllecithin, egg lecithin, rat liver lecithin and beef brain sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta* **339**, p. 390–402.
- Johnson SM., Bangham AD., Hill MW., Korn ED. (1971). Single bilayer liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **233**, p. 820–826.
- Kapczynski DR., Tumpsey TM. (2003). Development of a virosome vaccine for Newcastle disease virus. *Avian Dis.* **47**, p. 578–587.
- Keweloh H., Heipieper HJ. (1996). Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* **31**, p. 129–137.
- Kim HS., Park YS. (2002). Gene transfection by quantitatively reconstituted Sendai envelope proteins into liposomes. *Cancer Gene Ther.* **9**, p. 173–177.
- Kirby C., Green C. (1977). Transmembrane migration (“flip-flop”) of cholesterol in erythrocyte membranes. *Biochem. J.* **168**, p. 575–577.
- Klein RA. (1970). The detection of oxidation in liposome preparations. *Biochim. Biophys. Acta* **210**, p. 486–489.
- Klibanov AL., Maruyama K., Torchilin VP., Huang L. (1990). Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* **268**, p. 235–237.
- Kornberg RD., McConnell HM. (1971a). Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, p. 2564–2568.
- Kornberg RD., McConnell HM. (1971b). Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry* **10**, p. 1111–1120.
- Kunisawa J., Mayumi T. (2001). Application of novel drug delivery system, fusogenic liposome, for cancer therapy. *Gan To Kagaku Ryoho* **28**, p. 577–583.
- Lasic DD. (1998). Novel applications of liposomes. *Trends Biotech.* **16**, p. 307–321.
- Lebed’ OI., Stefanov AV., Primak RG. (1989). Effect of the conditions of ultrasonic treatment on the characteristics of forming liposomes. *Ukr. Biochem. J.* **61**, p. 96–101.
- Lee J., Lentz BR. (1997) Evolution of lipidic structures during model membrane fusion and the relation of this process to cell membrane fusion. *Biochemistry* **36**, p. 6251–6259.
- Leventis R., Diacovo T., Silvius JR. (1987). pH-dependent stability and fusion of liposomes combining protonatable double-chain amphiphiles with phosphatidylethanolamine. *Biochemistry* **26**, p. 3267–3276.
- Li S., Gao X., Son K., Sorgi F., Hofland H., Huang L. (1996). DC-Chol lipid system in gene transfer. *J. Control. Rel.* **39**, p. 373–381.
- Luna EJ., McConnell HM. (1977). The intermediate monoclinic phase of phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta* **466**, p. 381–392.
- Martin I., Ruyschaert JM. (2000). Common properties of fusion peptides from diverse systems. *Biosci. Rep.* **20**, p. 483–500.
- Middelkoop E., Lubin BH., Op den Kamp JA., Roelofsen B. (1986). Flip-flop rates of individual molecular species of phosphatidylcholine in the human red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **855**, p. 421–424.
- Moghimi SM., Szebeni J. (2003). Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res.* **42**, p. 463–478.
- Myles DG., Primakoff P. (1997). Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol. Reprod.* **56**, p. 320–327.
- Nacka F., Cansell M., Entressangles B. (2001). *In vitro* behavior of marine lipid-based liposomes. Influence of pH, temperature, bile salts, and phospholipase A2. *Lipids* **36**, p. 35–42.
- Naoi M., Naoi M., Shimizu T., Malviya AN., Yagi K. (1977). Permeability of amino acids into liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **471**, p. 305–310.
- Noguchi A., Furuno T., Kawaura C., Nakanishi M. (1998). Membrane fusion plays an important role in gene transfection mediated by cationic liposomes. *FEBS Lett.* **433**, p. 169–173.
- Owen CS. (1980). A membrane-bound fluorescent probe to detect phospholipid vesicle-cell fusion. *J. Memb. Biol.*

- 54, p. 13–20.
- Pagano RE., Weinstein JN. (1978). Interactions of liposomes with mammalian cells. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **7**, p. 435–468.
- Papahadjopoulos D., Watkins JC. (1967). Phospholipid model membranes. II. Permeability properties of hydrated liquid crystals. *Biochim. Biophys. Acta* **135**, p. 639–652.
- Pereira FB., Goñi FM., Nieva JL. (1995). Liposome destabilization induced by the HIV-1 fusion peptide effect of a single amino acid substitution. *FEBS Lett.* **362**, p. 243–246.
- Perrie Y., Gregoriadis G. (2000). Liposome-entrapped plasmid DNA: characterisation studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1475**, p. 125–132.
- Pillot T., Goethals M., Vanloo B., Talussot C., Brasseur R., Vandekerckhove J., Rosseneu M., Lins L. (1996). Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* **271**, p. 28757–28765.
- Poznansky MJ., Weglicki WB. (1974). Lysophospholipid induced volume changes in lysosomes and in lysosomal lipid dispersions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**, p. 1016–1021.
- Redziniak G. (2003). Liposomes et peau : passé, présent, futur : Liposomes and skin: past, present, future. *Pathol. Biol.* **51**, p. 279–281.
- Rigaud JL. (2002). Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**, p. 753–766.
- Rothman JE., Dawidowicz EA. (1975). Asymmetric exchange of vesicle phospholipids catalyzed by the phosphatidylcholine exchange protein. Measurement of inside-outside transitions. *Biochemistry* **14**, p. 2809–2816.
- Schanck A., Mingeot-Leclercq MP., Tulkens PM., Carrier D., Smith IC., Jarrell HC. (1992). Interactions of aminoglycoside antibiotics with phospholipids. A deuterium nuclear magnetic resonance study. *Chem. Phys. Lipids* **62**, p. 153–163.
- Schechter (2002). *Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels*. 2e éd. Paris : Masson, 466 p.
- Schieren H., Rudolph S., Finkelstein M., Coleman P., Weissmann G. (1978). Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles: ESR, diffusion and entrapment analyses. *Biochim. Biophys. Acta* **542**, p. 137–153.
- Schwendener RA., Lagocki PA., Rahman YE. (1984). The effects of charge and size on the interaction of unilamellar liposomes with macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **772**, p. 93–101.
- Seydel U., Brandenburg K., Lindner B., Moll H. (1981). The influence of phospholipidosis inducing drugs on the phase transition of lipids. *Thermochim. Acta* **49**, p. 35–48.
- Shaikh SR., Cherezov V., Caffrey M., Stillwell W., Wassall S. (2003). Interaction of cholesterol with a docosahexaenoic acid-containing phosphatidylethanolamine: trigger for microdomain/raft formation? *Biochemistry* **42**, p. 12028–12037.
- Siegel DP., Epanand RM. (2000). Effect of influenza hemagglutinin fusion peptide on lamellar/inverted phase transitions in dipalmitoleoylphosphatidylethanolamine: implications for membrane fusion mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1468**, p. 87–98.
- Stegmann T. (2000). Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic* **1**, p. 598–604.
- Struck DK., Hoekstra D., Pagano RE. (1981). Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* **20**, p. 4093–4099.
- Szoka F., Papahadjopoulos D. (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**, p. 467–508.
- Tahara Y., Fujiyoshi Y. (1994). A new method to measure bilayer thickness: cryo-electron microscopy of frozen hydrated liposomes and image simulation. *Micron* **25**, p. 141–149.
- Tatlian SA., Hinterdorfer P., Baber G., Tamm LK. (1995). Influenza hemagglutinin assumes a tilted conformation during membrane fusion as determined by attenuated total reflection FTIR spectroscopy. *EMBO J.* **14**, p. 5514–5523.
- Tonkonog LA., Bondarenko VA., Belous AM., Bondarenko TP. (1982). Permeability of liposomes with different cholesterol content as affected by low temperature. *Ukrainian Biochem. J.* **54**, p. 293–297.
- Torchilin VP., Berdichevsky VR., Barsukov AA., Smirnov VN. (1980). Coating liposomes with protein decreases their capture by macrophages. *FEBS Lett.* **111**, p. 184–188.
- van Rooijen N., van Nieuwmegen R. (1984). Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. An enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res.* **238**, p. 355–358.
- White JM. (1992). Membrane fusion. *Science* **258**, p. 917–924.
- Wijburg OL., van den Dobbelen GP., Vadolas J., Sanders A., Strugnell RA., van Rooijen N. (1998). The role of macrophages in the induction and regulation of immunity elicited by exogenous antigens. *Eur. J. Immunol.* **28**, p. 479–487.
- Wilschut J., Hoekstra D. (1986). Membrane fusion: lipid vesicles as a model system. *Chem. Phys. Lipids* **40**, p. 145–166.
- Winterhalter M., Lasic DD. (1993). Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution. *Chem. Phys. Lipids* **64**, p. 35–43.

- Wolf C., Koumanov K., Tenchov B., Quinn PJ. (2001). Cholesterol favors phase separation of sphingomyelin. *Bioph. Chem.* **89**, p. 163–172.
- Yu HY., Lin JH. (2000). Intracellular delivery of membrane-impermeable hydrophilic molecules to a hepatoblastoma cell line by asialoglycoprotein-labeled liposomes. *J. Form. Med. Assoc.* **99**, p. 936–941.
- Zhou X., Huang L. (1994). DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta* **1189**, p. 195–203.
- Zimmerberg J., Chernomordik LV. (1999). Membrane fusion. *Adv. Drug Deliver. Rev* **38**, p. 197–205.
- <http://www.theralipids.com/fr/strategy_fr.htm> date de consultation : 08/10/2003
- <<http://www.medespace.com/cancero/doc/therageni.html>> date de consultation : 12/10/2003
- <<http://www.promega.com/fr/promegazette/Prom26/prom7.pdf>> date de consultation : 22/10/2003
- <<http://www.exopol.com/fr/base3.fr.html>> date de consultation : 08/10/2003

(101 réf.)