UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Centre de Recherche sur la Matière Divisée

THÈSE présentée par :

Sébastien SERIEYE

soutenue le : **17 janvier 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline : Physique et Chimie de la Matière et des Matériaux

Intégration de molécules fonctionnelles dans des auto-assemblages émulsionnés de monoglycérides : Évolution structurale et rôle de l'interface

THÈSE dirigée par :

Marie-Louise SABOUNGI Professeur, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Dominique LANGEVIN Directeur de Recherche, CNRS Orsay

José TEIXEIRA Directeur de Recherche, CEA Saclay

JURY :

Yann VAILLS Professeur, Université d'Orléans (Président du jury)

Patrick SAULNIER Professeur, Université d'Angers

Alain GIBAUD Professeur, Université du Mans

Samuel GUILLOT Maître de Conférence, Université d'Orléans

Remerciements

Tout d’abord merci aux personnes dont je vais oublier le nom lors de ces remerciements !

J’aimerais remercier Samuel Guillot pour son soutien et sa gentillesse durant toute cette thèse. Tu as été bien plus qu’un simple encadrant et nous avons pu partager ensemble les moments les plus durs comme les meilleurs.

Merci aux membres du jury d’avoir accepté de critiquer cette thèse. Je dois dire que ce diplôme me rend d’autant plus fier par la qualité des personnes présentes dans le jury.

Merci à l’ensemble du laboratoire, cela parait convenu, mais c’est un vrai merci que je vous adresse. Je fonctionne à l’affectif et les moments de convivialité, de travail passés avec vous m’ont fait tenir durant ces trois ans.
Merci aux « salut les jeunes » « planteurs de fleurs » et autres « acheteurs de lampe hallogènes » : Kévin, Irena, Julie, Hinda, Sara, Ludo, Edouard, MP, Pierre, Jérôme, Ling,…
Merci aux permanents pour leur soutien et leur aide : Fabienne W, Fabienne M, Marie-Pierre, Sandrine, Xavier, …
Merci aux deux personnes les plus gentilles que je connaisse Nicole et Jennifer.

Merci aux personnes qui m’ont permis d’avoir accès à tout un tas d’expériences sans lesquelles ma thèse serait vide : Chantal Pichon, ses étudiants et le CBM pour les manips de biologie ; Laurent Sagalowicz, Martin Leser et le Nestlé Research Center pour l’accès gratuit au cryo-MET ; aux synchrotrons de Dortmund, Hambourg, Grenoble et Lund pour le temps de faisceau accordé (que de nuits blanches passées, une quinzaine de mémoire) ;…

Merci à Chris, Pitite toi, ma famille et aux amis pour le soutien lors des moments difficiles et notamment les derniers mois.

Merci à Olivier Cousin et Candia d’avoir cru en moi en m’embauchant avant la fin de ma thèse et de m’avoir permis de rédiger en parallèle de mon travail.

Ces remerciements restent très simples, mais j’espère avoir l’occasion de remercier toutes ces personnes dans la vie de tous les jours.

Table des matières

Contexte **1**

Chapitre I : Bibliographie **2**

I) Émulsion et émulsifiant **3**

I) – 1 Émulsion **3**

I) – 1 – 1 Définition **3**

I) – 1 – 2 Formation : principes et moyens **4**

I) – 1 – 3 Stabilité d'une émulsion **6**

I) – 2 Émulsifiant **9**

I) – 2 – 1 Définition **9**

I) – 2 – 2 Critères de choix d'un émulsifiant **12**

II) Auto-assemblages de monolinoléine **19**

II) – 1 Mésophases en volume **19**

II) – 1 – 1 Auto-assemblages de monoglycérides **19**

II) – 1 – 2 Mésophases de monolinoléine **23**

II) – 2 Isasomes **28**

II) – 2 – 1 Définition **28**

II) – 2 – 2 Molécules hôtes **37**

II) – 2 – 3 Propriétés des Isasomes et applications **42**

II) – 2 – 3 – a Relargage **42**

II) – 2 – 3 – b Encapsulation **46**

II) – 2 – 3 – c Inclusion **47**

II) – 2 – 3 – d Vectorisation **48**

Synthèse et objectifs **51**

Chapitre II : Matériels et Méthodes 53

I) Préparation des Isasomes 54
I) – 1 Constituants 54
I) – 2 – 1 Monolinoléine et R-(+)-limonène 54
I) – 2 – 2 Émulsifiants 55
I) – 2 – 3 Molécules hôtes et cires 57
I) – 2 Protocole de fabrication des Isasomes 60

II) Caractérisation des Isasomes 62
II) – 1 Mesures de la taille et du potentiel zêta 62
II) – 1 – 1 Mesure de la distribution en taille des émulsions 62
II) – 1 – 2 Mesure du potentiel zêta 64
II) – 2 Mesures de cryo-Microscopie Electronique en Transmission 64
II) – 3 Mesures en diffusion des rayons X aux petits angles 66
II) – 4 Mesures FTIR 73
II) – 5 Mesures RMN 74
II) – 6 Biologie 75
II) – 6 – 1 Culture cellulaire 75
II) – 6 – 2 Stabilité des Isasomes et Toxicité 75
II) – 6 – 3 Internalisation et localisation cellulaire 76
II) – 6 – 4 Vectorisation du Paclitaxel et différenciation cellulaire 79

Chapitre III : Caractérisation des Isasomes 81

I) Émulsification et stabilité des émulsions 83
I) – 1 Influence du temps de sonication 83
I) – 2 Influence de la formulation 87
I) – 2 – 1 Taille des Isasomes et stabilité dans le temps en fonction de l'émulsifiant 87
I) – 2 – 2 Influence de la concentration en émulsifiant (β) sur la taille des Isasomes 91

I) – 2 – 3 Influence du δ sur la taille moyenne des émulsions **92**
I) – 2 – 4 Potentiel zêta des Isasomes **95**
I) – 2 – 5 Influence de l'émulsifiant sur le diagramme de phase **97**

II) Rôle de la quantité de phase dispersée et évolution structurale des Isasomes 99
II) – 1 Préambule **99**
II) – 2 Influence de la fraction de mésophase dispersée à β constant **101**
II) – 3 Évolution temporelle des émulsions de monolinoléine/limonène **105**
II) – 3 – 1 Évolution de la structure interne **105**
II) – 3 – 2 Confirmation de la perte de limonène **108**
II) – 3 – 3 Influence de l'émulsifiant **114**
II) – 3 – 4 Influence de la fraction de mésophase **117**
II) – 3 – 5 Influence de la température de stockage **120**
II) – 3 – 6 Influence de l'agitation au cours du stockage **122**

Chapitre IV : Applications des Isasomes 127

I) Solubilisation des molécules hôtes 128

II) Imperméabilisation de l'interface 133
II) – 1 Cire d'abeille et cire de carnauba **133**
II) – 2 Cire de son de riz **135**
II) – 3 Cires émulsifiantes **137**

III) Utilisation en biologie cellulaire 140
III) – 1 Stabilité des Isasomes **140**
III) – 1 – 1 Stabilité des Isasomes en présence de sérum **140**
III) – 1 – 2 Stabilité du Nile Red inclus dans les Isasomes **141**
III) – 2 Tests de cytotoxicités des Isasomes **142**
III) – 3 Internalisation des Isasomes **144**

III) – 4 Vectorisation du Paclitaxel **147**
III) – 5 Vectorisation de l'ATRA **149**

Conclusion **151**

Perspectives **152**

Annexe I **153**

Références Bibliographiques **154**

CONTEXTE

L’allongement constant de la durée de vie de l’espèce humaine est en grande partie due aux progrès de la médecine. De nos jours, les entreprises pharmaceutiques disposent d’un arsenal quasi infini de molécules actives ayant un rôle potentiellement bénéfique au regard de plusieurs pathologies. Elles constituent un bien précieux qu’il est cependant difficile d’utiliser. En effet, ces composés actifs sont le plus souvent des molécules sensibles, facilement dégradables ou peu solubles dans les milieux aqueux. Il est donc nécessaire de proposer des vecteurs permettant de les protéger et de les rendre disponibles à un endroit précis et au moment voulu.
Ces vecteurs doivent donc être robustes face à des conditions hostiles, comme des pH extrêmes ou dans des milieux enzymatiques.

Depuis les années 60, les auto-assemblages de monoglycérides font l’objet de nombreuses recherches. En effet, une fois émulsifiés, ces systèmes de taille nanométrique, sont constitués de gouttelettes contenant une phase aqueuse, lipidique et une interface très importante, offrant ainsi la possibilité de solubiliser tous types de molécules. Ces réservoirs potentiels à molécules sont cependant assez fragiles et nécessitent des recherches plus abouties afin de pouvoir les rendre utilisables dans les domaines de l’alimentaire, de la pharmaceutique, de la cosmétique ou de la médecine.

Nous nous sommes donc questionnés sur l’influence des paramètres de fabrication et de stockage sur ces particules. Nous avons voulu savoir quel rôle joue l’interface des gouttelettes dans leur structuration et dans la protection des molécules hôtes. En effet, la littérature ne propose que peu de choix quant à l’émulsifiant pouvant être utilisé pour stabiliser ces structures. Une fois ces paramètres définis, nous observerons l’influence de l’ajout de molécules hôtes sur ces auto-assemblages et enfin nous essaierons d’optimiser la couverture interfaciale pour augmenter la rétention de ces molécules.

Chapitre 1 :

Bibliographie

I) Émulsion et émulsifiants

I) – 1 Émulsion

I) – 1 – 1 Définition

Une émulsion est une dispersion d'un liquide dans un autre liquide, les deux étant non miscibles. A partir de l'état démixé, c'est-à-dire où les deux phases ne sont pas mélangées, l'émulsification est le fait de fragmenter l'une des deux phases sous forme de gouttelettes dans le second fluide appelé « phase continue ».
La zone séparant les deux liquides est appelée interface ou film interfacial. On parle d'émulsion directe lorsque la phase continue est l'eau et la phase dispersée est l'huile (on note H/E), et d'émulsion inverse dans le cas contraire (E/H). La taille des gouttelettes d'émulsion est généralement comprise entre 0,05 et 100 µm. Pour des émulsions dont la taille est comprise entre 100 et 500 ηm on parle de mini-émulsions, et de nano-émulsions pour des tailles inférieures à 100 ηm [1-2].

La non-miscibilité de l'eau avec l'huile s'explique par le fait qu'à l'interface des deux fluides, l'eau ne peut pas créer de liaisons hydrogène avec l'huile. La création d'une interface, entre phase dispersée et continue, nécessite un apport d'énergie, appelée tension interfaciale γ (exprimée en $mN.m^{-1}$ ou $mJ.m^{-2}$). Par exemple, la tension interfaciale, ou l'énergie nécessaire à la création d'interface, entre l'eau et l'air est de 73 $mN.m^{-1}$.

Lorsque deux fluides non miscibles sont émulsionnés, la phase dispersée l'est sous forme de gouttelettes sphériques, afin de minimiser l'énergie nécessaire à la création de cette interface. La sphère étant, à équi-volume, la géométrie présentant la surface la moins importante.

L'énergie à apporter pour la création des interfaces est d'autant plus grande que la taille des gouttelettes de phase dispersée est petite.

Ceci s'explique par la différence de pression (pression de Laplace) entre l'intérieur et l'extérieur des gouttelettes, qui est reliée à la tension interfaciale par la formule 1:

Formule 1 : $\Delta P = 2 \gamma / r$

Avec **ΔP** : la pression de Laplace (Pa) ; **γ** : la tension interfaciale ($mJ.m^{-2}$) et **r** : le rayon de la gouttelette (m).

La surpression à l'intérieur des gouttelettes est donc intimement liée à leur taille et à la tension de surface. Ainsi plus le rayon est faible, plus la pression de Laplace est élevée, moins les gouttelettes sont déformables et donc plus il est difficile de les fractionner. Il est donc nécessaire d'apporter plus d'énergie pour la fabrication d'émulsions de petites tailles.

I) – 1 – 2 Formation : principe et moyens

Pour disperser une phase sous forme de gouttelettes dans une autre, il est nécessaire d'apporter de l'énergie pour créer des interfaces. L'émulsification s'effectue généralement par cisaillement. Sous cisaillement, la gouttelette, initialement sphérique, est déformée et s'allonge suivant la direction du cisaillement. La réduction de son diamètre entraîne la rupture du film interfacial. Il se crée ainsi deux gouttelettes de diamètre inférieur à la gouttelette initiale (figure 1) [3].

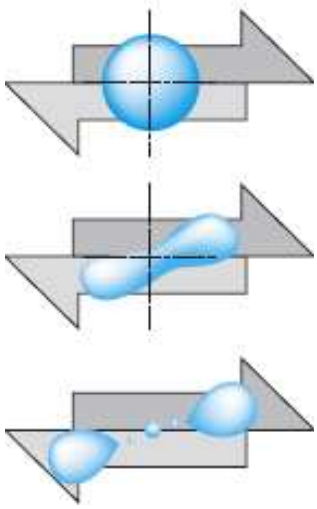


Figure 1 : Représentation schématique du cisaillement d'une gouttelette, tiré de [3].

Ce phénomène de cisaillement, ou de rupture de film interfacial, peut être réalisé par différents moyens (liste non exhaustive) :

- L'agitation mécanique : utilisation de pales rotatives ou d'un système rotor/stator. Ici, la phase dispersée est fortement cisaillée sous les contraintes engendrées par le système en rotation ; les gouttelettes sont alors étirées jusqu'à la rupture et la formation de gouttelettes plus petites.

- La sonication : l'utilisation d'ondes ultrasonores permet la fabrication d'émulsions grâce au phénomène de cavitation, c'est-à-dire l'apparition de bulles de gaz dissous dans le liquide, soumis à l'alternance de compressions et de dépressions. Ce cycle de compression/décompression entraîne des phénomènes de coalescence entre bulles, qui éclatent après avoir atteint une taille critique. Ces éclatements déforment et rompent les interfaces eau/huile, permettant ainsi la formation de gouttelettes.

- L'homogénéisation sous haute pression : les deux fluides, souvent pré-émulsionnés, subissent localement une grande variation de pression sur des temps courts, tout en traversant une géométrie de petit diamètre. Les phénomènes d'émulsification sont proches de ceux rencontrés pour la sonication [4].

La plupart de ces méthodes d'émulsification conduisent à un échauffement de la solution car l'énergie apportée est principalement dissipée dans la phase continue sous forme de chaleur. Seule une faible partie de cette énergie est utilisée pour la création des interfaces. Il est bien sûr nécessaire de quantifier/contrôler expérimentalement cette augmentation de température pour éviter la dégradation de certains constituants.

Cependant, la dispersion simple d'une phase évolue inexorablement vers une séparation de phase macroscopique. Par exemple, la dispersion d'huile dans de l'eau conduit rapidement à la démixtion ; après quelques secondes les gouttelettes fusionnent pour retourner à l'état initial, c'est-à-dire deux phases distinctes.

I) – 1 – 3 Stabilité d'une émulsion

La création de gouttelettes de phase dispersée dans la phase continue augmente la surface totale de contact entre l'eau et l'huile. Plus l'on crée de petites gouttelettes, plus cette interface augmente et plus l'énergie nécessaire pour l'accroître est grande. A titre d'exemple, prenons un système constitué de 30 mL d'huile et de 70 mL d'eau, disposées dans un bécher. Si l'on disperse la phase huile sous forme de gouttelettes monodisperses de 1 µm de diamètre, on crée alors une interface totale eau/huile de 180 m^2, dans un volume total de 100 mL. Si l'on considère une valeur moyenne de tension de surface entre l'eau et l'huile de 50 $mJ.m^{-2}$, nous pouvons calculer l'énergie nécessaire à la création de l'interface totale, c'est-à-dire à la création de l'émulsion : $180 \times 50 = 9$ J, soit la quantité d'énergie nécessaire au fonctionnement d'une ampoule de 60 W durant 0,15 seconde. Si l'on compare désormais les énergies interfaciales des états démixé (0,25 mJ) et dispersé (9 J), il est alors évident que le système va tendre vers l'état possédant la plus basse énergie, à savoir l'état démixé. Les émulsions sont donc des systèmes qui ne sont pas thermodynamiquement stables ; elles évoluent rapidement vers la démixtion. L'adjonction de molécules tensioactives permet de limiter ce phénomène en créant une barrière entre les gouttelettes de phase dispersée (voir partie I)-2).

Malgré cette barrière, les émulsions restent sujettes à différents phénomènes de déstabilisation, résumés dans la figure 2 [3] :

- Le mûrissement d'Ostwald : ce phénomène irréversible est essentiellement dû aux différences de pression de Laplace existant à l'intérieur des gouttelettes de différentes tailles. En effet, la plupart des méthodes d'émulsification permettent la création d'une émulsion dont la distribution en taille n'est pas strictement monodisperse (de type gaussien ou log-normale). Le contenu des petites gouttelettes va donc naturellement diffuser vers les gouttelettes de plus grande taille, dont la pression interne est plus faible. Ce phénomène se traduit par la modification de la granulométrie au cours du temps où les populations de gouttelettes de petites tailles disparaissent au profit des plus grosses. La vitesse de ce phénomène décroît avec le temps, car elle favorise une dispersion homogène de grosses gouttelettes.

Le mûrissement d'Ostwald peut être réduit, voire inhibé, de différentes façons : en réduisant la tension interfaciale, on réduit la pression de Laplace; en diminuant la solubilité des composés de la phase dispersée dans la phase continue, ou en réduisant la concentration d'émulsifiants pour limiter le transport de matériel par des micelles de tensioactifs [5].

- Le crémage, la sédimentation et la floculation: ces phénomènes sont réversibles et ne causent généralement pas la déstabilisation complète de l'émulsion. Ces instabilités sont dues à la compétition entre mouvement brownien et pesanteur. Si la densité de la phase dispersée est plus faible que celle de la phase continue (H/E) alors les gouttelettes vont crémer ; si sa densité est plus élevée (E/H), les gouttelettes vont sédimenter. La vitesse de sédimentation/crémage est donnée pour des particules sphériques par la loi de Stokes (Formule 2) :

Formule 2 : $R = 6 \pi \eta r v$

Avec $v = 2\Delta\rho g r^2/9\eta$

Avec **R** : résistance visqueuse, **v** : vitesse de sédimentation ($m.s^{-1}$), **g** : constante de la pesanteur ($m.s^{-2}$), **η** : viscosité de la phase continue (Pa.s), **r** : rayon des gouttelettes (m) et **Δρ** : différence de masse volumique entre phase dispersée et phase continue ($kg.m^{-3}$).

D'après cette relation, on en déduit que pour réduire le phénomène de crémage/sédimentation, il faut soit augmenter la viscosité de la phase continue soit diminuer la taille des gouttelettes de la phase dispersée. Par ailleurs, la sédimentation/crémage tend à favoriser la coalescence en concentrant les gouttelettes dans un espace réduit.

- La coalescence : ce phénomène irréversible constitue la fusion de deux gouttelettes et anticipe la démixtion du système [2,6]. Les gouttelettes, soumises au mouvement brownien, sont susceptibles de se rencontrer. Selon les phénomènes inverses de ceux décrits lors de la dispersion par cisaillement, les deux films interfaciaux vont rentrer en contact, puis fusionner pour finalement ne former qu'une seule gouttelette de diamètre plus important [7,8]. Tous les paramètres augmentant la mobilité des gouttelettes et leur

probabilité de contact sont donc à éviter. Pour cela on pourra réduire la température, augmenter la viscosité de la phase continue, accroître les répulsions électrostatiques en augmentant les charges présentes aux interfaces ou augmenter la concentration en émulsifiant pour mieux couvrir l'interface et optimiser la fluidité du film interfacial [9].

- L'inversion de phases : il est possible d'obtenir des émulsions très concentrées, c'est-à-dire avec une fraction volumique de la phase dispersée proche de 70 %. Dans le cas d'une émulsion H/E très concentrée, l'émulsion comprend de très nombreuses gouttelettes d'huile compactées et séparées par un fin film aqueux. A partir d'un certain pourcentage de fraction volumique de phase dispersée (dépendante de la composition de l'émulsion), intervient une inversion catastrophique. La phase aqueuse ne pouvant plus contenir davantage d'huile, l'émulsion s'inverse pour devenir une émulsion E/H.

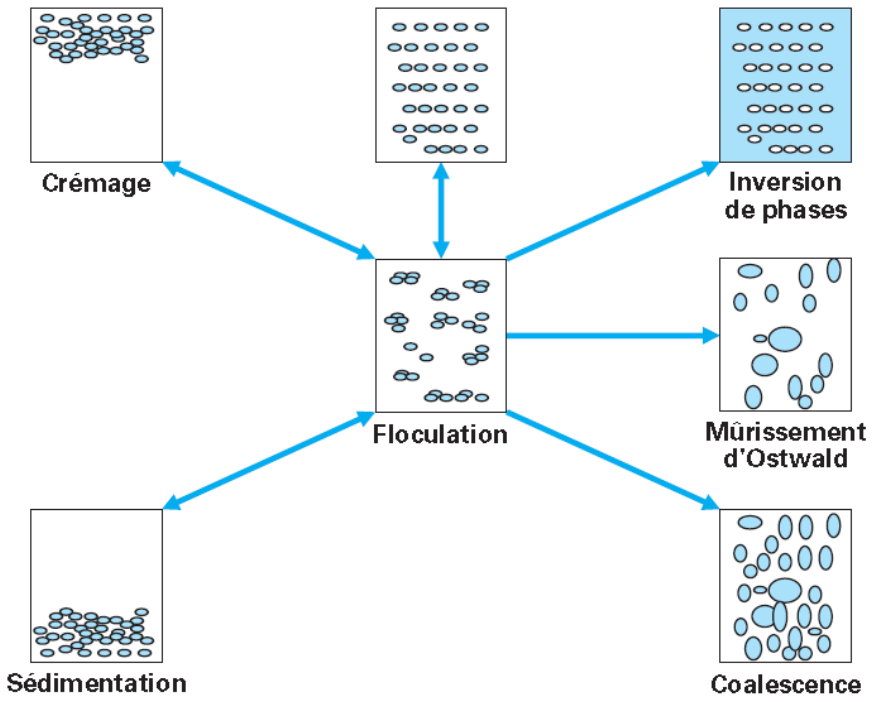


Figure 2 : Schématisation des différents mécanismes de déstabilisation d'une émulsion [3].

Comme expliqué précédemment, la tension de surface régit la métastabilité des émulsions. Il est donc capital de réduire l'énergie nécessaire à la création d'interface. Pour cela on utilise des molécules tensioactives appelées émulsifiants.

I) – 2 Émulsifiant

I) – 2 – 1 Définition

Les émulsifiants, surfactants (contraction de l'anglais *surface active agent*), molécules tensioactives ou encore tensioactifs, sont des molécules composées de deux pôles, l'un hydrophile, l'autre hydrophobe et sont souvent représentés comme sur la figure 3 [10].

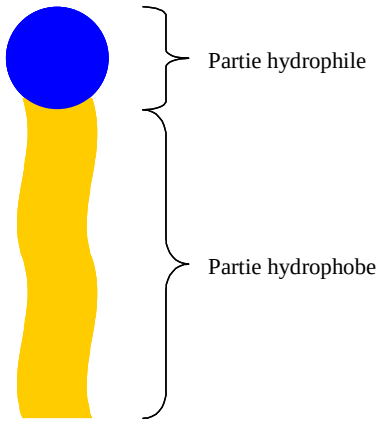


Figure 3 : Représentation schématique d'un émulsifiant (ici, à bas poids moléculaire).

Cette structure bipolaire leur confère un caractère amphiphile : chaque pôle aura tendance, par affinité, à se solubiliser dans une des deux phases de l'émulsion. Ceci leur permet de s'adsorber aux interfaces, qu'ils stabilisent en diminuant l'énergie nécessaire à leur création. En règle générale, un émulsifiant est d'autant plus efficace à stabiliser une émulsion, qu'il diminue la tension interfaciale. En effet, plus la tension de surface est faible, plus l'état du système dispersé est énergiquement proche du système démixé, et plus l'émulsion sera stable dans le temps.

Il existe plusieurs centaines, voire plusieurs milliers, de molécules tensioactives tant naturelles que synthétiques. Les premiers émulsifiants utilisés furent des sels d'acides gras, produits par la saponification de l'huile d'olive, un millénaire avant notre ère. Ces tensioactifs étaient utilisés comme savon pour nettoyer corps et vêtements.
Le premier émulsifiant utilisé en alimentaire fut la lécithine de jaune d'œuf, dont le nom provient du grec *lekithos* (jaune d'œuf).

Aujourd'hui de nombreux émulsifiants sont produits par voie synthétique et sont couramment utilisés en industrie comme les sucroesters (ester de sucres et d'acides gras), les polysorbates ou les polymères de polyéthylène glycol.
Cependant de nombreux autres émulsifiants sont d'origine naturelle et couramment utilisés dans le domaine alimentaire comme les monoglycérides, les protéines ou les lécithines d'œuf ou de soja.

On peut ainsi stabiliser des émulsions (des milieux dispersés en général) en utilisant différents types de molécules ou de particules [11] :

- La plupart des tensioactifs utilisés sont à bas poids moléculaires, ayant une masse molaire inférieure à 1000 $g.mol^{-1}$. C'est le cas des monoglycérides, des lécithines, des sucroesters ou du Sodium Stéaroyl Lactylate (SSL). Ils sont généralement composés d'une tête polaire et d'une ou plusieurs chaînes aliphatiques. Ils s'adsorbent rapidement à l'interface et diminuent de manière très importante la tension de surface. Le SSL est ainsi capable de réduire la tension interfaciale eau/air à 25 $mN.m^{-1}$ (contre 73 $mN.m^{-1}$ sans émulsifiant) [12,13]. Ils créent une interface fluide et sont aisément désorbés par variation de pression à l'interface ou par la compétition avec des émulsifiants à plus haut poids moléculaire [14]. La figure 4 représente une molécule de phosphatidylcholine (lécithine), couramment utilisée comme émulsifiant en agroalimentaire.

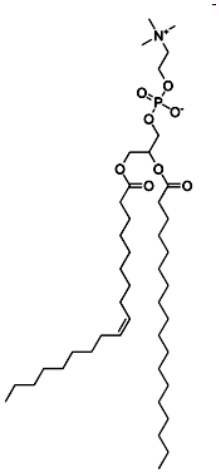


Figure 4 : Molécule de phosphatidylcholine (lécithine).

- Les émulsifiants à hauts poids moléculaires sont des molécules de masse molaire supérieure à 1000 $g.mol^{-1}$ comme par exemple les protéines, le PolyGlycérol PolyRicinoléate (PGPR), les amidons modifiés et d'autres types de polymères [15]. Les caséines ou les protéines sériques de lait sont classiquement utilisées dans les industries alimentaires comme tensioactifs [16]. Dans le cas des caséines, leur structure globulaire regroupe les acides aminés hydrophobes (Leucine, Arginine, Tyrosine, Phénylalanine) à l'intérieur de celle-ci, ce qui permet leur bonne solubilisation dans l'eau. Lorsqu'une protéine s'adsorbe à l'interface eau/huile, elle perd sa structure tertiaire afin d'exposer ses pôles hydrophobes vers la phase liposoluble. Cette dénaturation est irréversible et rend l'interface très rigide. De par leur masse, les protéines et les polymères sont donc difficilement désorbés de l'interface, la rendant peu fluide [17,18]. De plus, leur adsorption est beaucoup plus lente que les tensioactifs à bas poids moléculaires de par leur changement de conformation. Aussi, ils diminuent moins fortement la tension interfaciale pour atteindre généralement des valeurs de l'ordre de 40-50 $mN.m^{-1}$.

- Les émulsions de Pickering ne sont pas, à proprement parler, stabilisées par des tensioactifs mais par des particules colloïdales, comme par exemple la silice ou des cristaux de lipides [19,20]. Malgré la rigidité des particules utilisées, la fluidité des interfaces demeure importante. Leur désorption est très difficile, elles stabilisent donc les émulsions aussi bien que des émulsifiants classiques [21-23]. La figure 5 montre des émulsions stabilisées par des particules de silice [24].

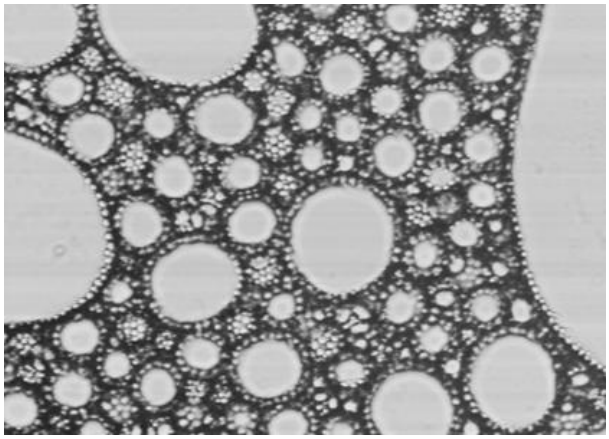


Figure 5 : Emulsion H/E stabilisée par des particules de silices (tiré de [24]).

- De manière plus confidentielle, il a été montré que certaines bactéries sont capables d'agir comme des particules et s'adsorbent à l'interface des émulsions. Leurs couches externes étant souvent hydrophobes, elles facilitent leur adsorption aux gouttelettes d'huile. Elles ne diminuent que très modérément la tension interfaciale mais protège de manière stérique les gouttelettes réduisant le risque de coalescence. La figure 6 montre des gouttelettes d'huile stabilisées par des *Rhodococcus erythropolis* [25,26].

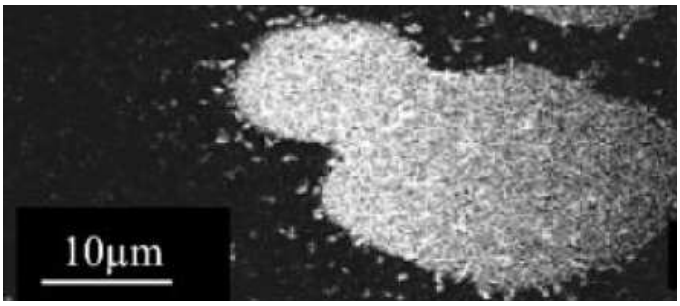


Figure 6 : Image de microscopie confocale montrant la stabilisation de gouttelettes de tetradécane par des bactéries du genre *Rhodococcus erythropolis.*

Les industriels et les chercheurs disposent d'un arsenal important et diversifié d'émulsifiants, mais il convient de les choisir correctement en fonction des propriétés des émulsions voulues.

I) – 2 – 2 Critères de choix d'un émulsifiant

Le choix d'un émulsifiant répond à de nombreux critères :

- En premier lieu il faut définir son affinité pour chacune des phases. En effet, selon la loi de Bancroft, la phase continue de l'émulsion est la phase dans laquelle l'émulsifiant doit être le plus soluble. Ainsi un émulsifiant hydrosoluble stabilisera des émulsions directes (H/E) et un tensioactif liposoluble stabilisera des émulsions inverses (E/H). La solubilité des émulsifiants est généralement déterminée par une valeur empirique appelée HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance).

Cette valeur représente la somme des contributions des parties hydrophiles et hydrophobes de la molécule. Ainsi les groupes hydrophiles donnent des contributions positives au HLB et les groupes hydrophobes des contributions négatives (Tableau I), comme le montre la formule 3 suivante :

Formule 3 :

HLB= 7+Σ (contribution groupes hydrophiles) +Σ (contribution groupes hydrophobes).

Tableau I : Valeurs associées à différents groupes chimiques d'un émulsifiant pour le calcul de sa valeur HLB.

GROUPES	VALEURS
$-SO_4Na$	38,7
$-COONa(K)$	19,1 (21,1)
$=N-$	9,4
$-COOR$	2,4
$-COOR$ (Sorbitanne)	6,8
$-COOH$	2,1
$-OH$	1,9
$-OH$ (Sorbitanne)	0,5
$-O-$	1,3
$=CH-$	-0,475
$-CH_2-$	-0,475
$-CH_3$	-0,475
$-CH_2-CH_2-O-$	0,33
$-CH_2-CH_2-CH_2-O-$	-0,15

Les émulsifiants ayant une valeur de HLB comprise entre 1 et 8 seront plutôt liposolubles (donc utilisés pour stabiliser des émulsions de type E/H) et les émulsifiants ayant un HLB supérieur à 12 seront plutôt hydrosolubles et seront employés dans les émulsions directes (H/E). Ces valeurs sont valables à température ambiante.

Par exemple, le PGPR, ayant un HLB de 1 sera parfaitement indiqué pour une émulsion indirecte, alors que le sucrose stéarate de HLB égal à 16 sera utilisé pour créer une émulsion directe.

Même si l'on désire préparer une émulsion H/E, il peut être utile d'ajouter à la composition un co-émulsifiant. Il s'agit d'un tensioactif soluble dans la phase dispersée, qui participera à la stabilisation de l'interface, l'émulsifiant principal résidant dans la phase continue (voir figure 7). En comparaison de l'émulsifiant principal, le co-émulsifiant va se situer de l'autre côté de l'interface.
Le co-émulsifiant ira se loger dans les espaces laissés vacants et permettra une meilleure couverture de l'interface, une diminution de la tension interfaciale, et réduira le risque d'échange de matière entre les différentes gouttelettes, ce qui ralentira le mûrissement d'Ostwald.

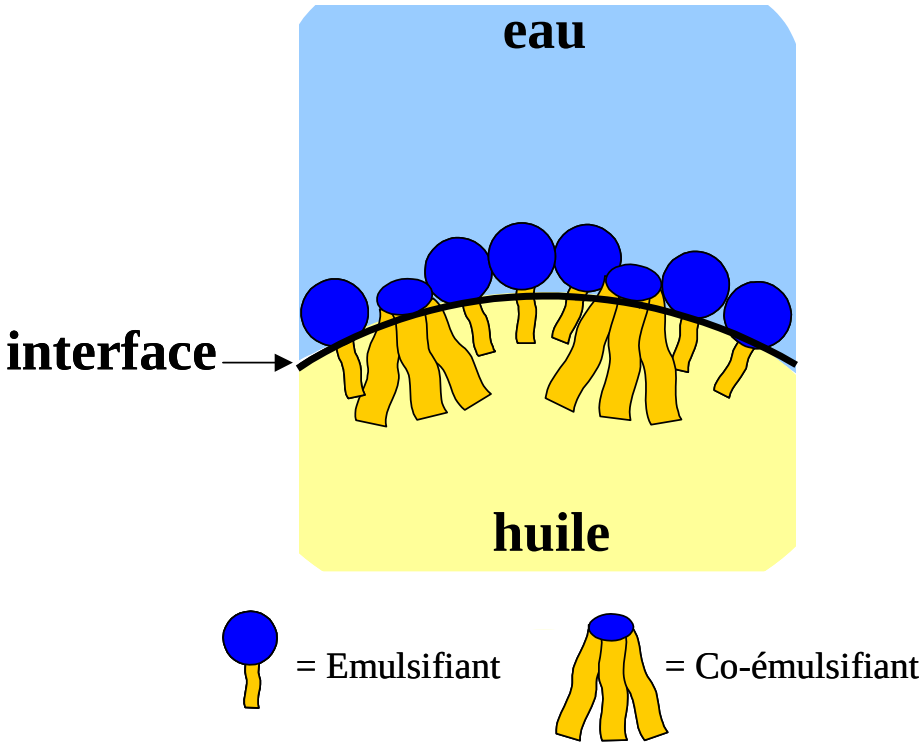


Figure 7 : Interface eau/huile recouverte par des émulsifiants et co-émulsifiants.

- La charge de l'émulsifiant, au pH utilisé, est d'une importance capitale pour la stabilité des émulsions [27,28]. L'augmentation de la répulsion électrostatique permet alors de réduire la coalescence. Il existe quatre types d'émulsifiants au regard de leurs charges de surface. Parmi eux, trois types d'émulsifiants possèdent des charges de surface : les émulsifiants anioniques (charges négatives, ex : acides gras), les cationiques (charges positives, ex : CétylTriméthyl Ammonium Bromide - CTAB), et les zwitterioniques (molécules présentant simultanément des charges positives et négatives) qui sont généralement utilisées comme détergents (ex : sels d'imizadolium).

Enfin, certaines molécules ne présentent aucune charge et sont donc non-ioniques, comme par exemple les copolymères à blocs. Suivant le domaine d'application il convient de se restreindre à un type d'émulsifiant ; par exemple, on peut préférer un tensioactif cationique pour augmenter la délivrance de principes actifs sur la peau, qui est chargée négativement [29-33], ou au transport d'ADN [34].

- La taille et le poids moléculaire des émulsifiants sont des critères à considérer dans le choix d'un tensioactif. Un émulsifiant à haut poids moléculaire sera choisi lorsqu'une formulation est complexe et contient un ensemble de molécules tensioactives à bas poids moléculaire. Leur fort ancrage à l'interface limitera les compétitions entre surfactants pour y accéder, susceptibles de créer une déstabilisation [35-37]. Les émulsifiants à bas poids moléculaire seront préférés lorsque l'on veut faire interagir l'émulsion avec des cellules. Ces tensioactifs ne forment pas une barrière épaisse à l'interface, facilitant ainsi les phénomènes d'internalisation.

- La concentration de l'émulsifiant est un paramètre important dans la formulation d'une émulsion. En règle générale, plus la concentration de l'émulsifiant augmente, mieux l'interface est couverte, plus la tension de surface diminue et plus l'émulsion aura tendance à être stable. La figure 8 rend compte de l'influence de la concentration de l'émulsifiant sur la tension de surface et sur la couverture de l'interface.

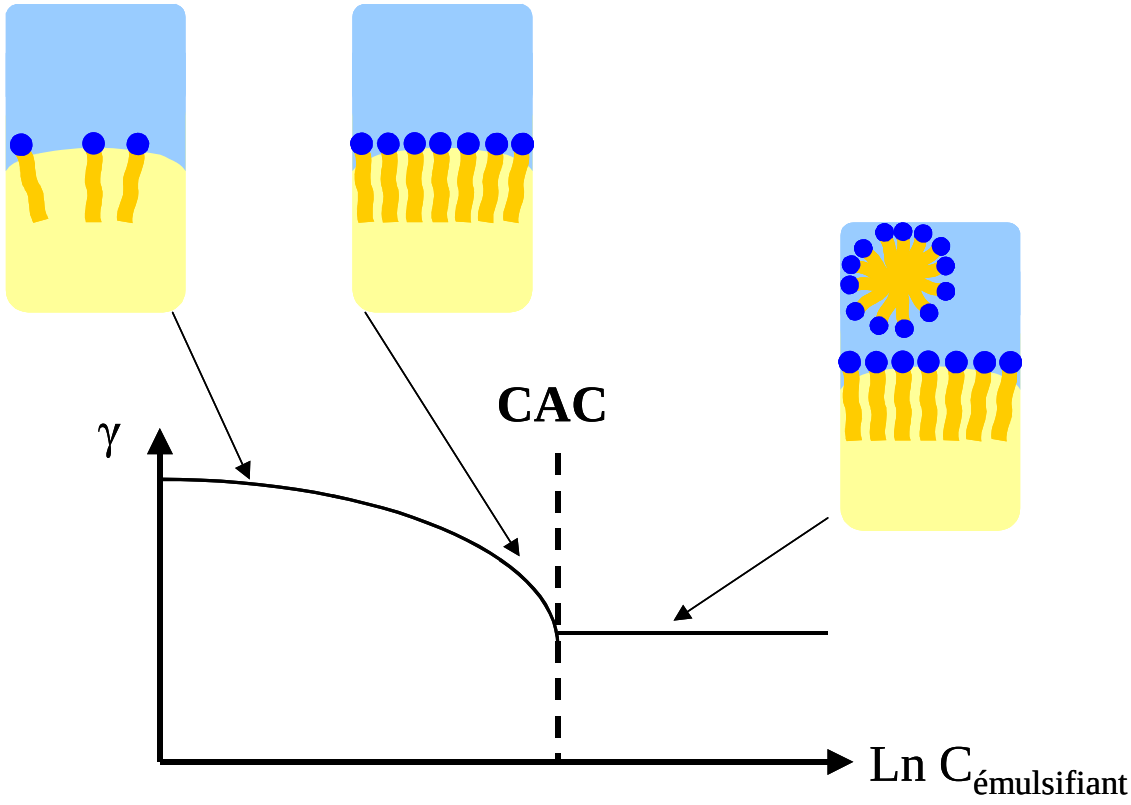


Figure 8 : Influence de la concentration d'émulsifiant sur la valeur de tension de surface.

On introduit alors une Concentration d'Agrégation Critique (CAC) au-delà de laquelle, l'interface est entièrement couverte par des émulsifiants (sous forme de monomère). Au-dessus de la CAC, l'interface est totalement recouverte et la tension de surface reste constante, même après addition supplémentaire de tensioactif. L'interface ne présentant plus d'espaces libres, l'addition d'émulsifiants entraînera leur solubilisation dans la phase continue, sous forme de monomères ou d'auto-assemblages. Les émulsifiants regroupent leurs pôles hydrophobes et hydrophiles afin de former des structures plus stables. Ces auto-assemblages sont eux-même capable de stabiliser les interfaces [38].

Ainsi, au-dessus de la CAC, certains émulsifiants sont capables de s'auto-assembler pour former différentes structures. Elles sont dictées par la structure de l'émulsifiant qui est exprimée par le facteur de forme. En effet, l'attraction réciproque des chaînes aliphatiques et des têtes polaires tend à fixer une surface optimale par tête polaire notée a_0. Israelachvili a ainsi déterminé un facteur de forme (*FF*) rapporté dans la formule 4 [39]:

Formule 4 $FF = v / (a_0 l_c)$

Avec **v** : le volume de la partie hydrophobe, $\mathbf{a_0}$ la surface optimale par tête polaire et $\mathbf{l_c}$ la longueur de la chaîne aliphatique.

Ce facteur de forme donne une idée de la courbure spontanée d'une couche de tensioactif et permet de déduire le type d'émulsion créée (E/H ou H/E) [40]. Les courbures sont, par convention, positives si elles sont orientées vers la phase polaire et négatives si elles sont orientées vers la phase lipophile. Le FF et la courbure sont les deux éléments qui définiront la forme adoptée par l'interface comme le montre la figure 9 [41].

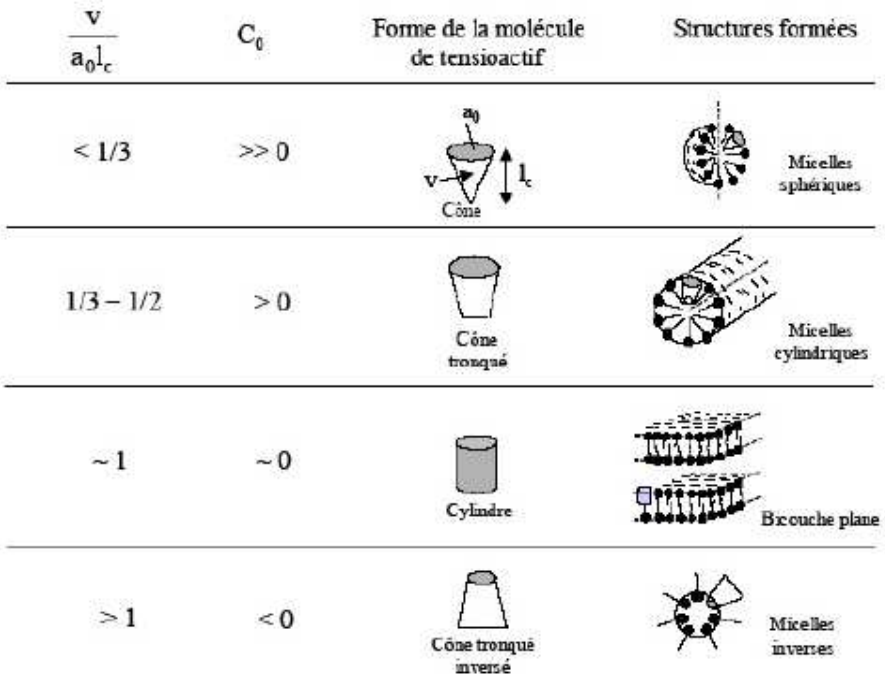


Figure 9 : Relation entre le facteur de forme, la courbure spontanée C_0, la forme de la molécule et les structures formées en solution ; tiré de [41].

Les auto-assemblages formés par les émulsifiants dépendent donc du facteur de forme. Par exemple, des émulsifiants ayant un facteur de forme de 1 (c'est-à-dire une courbure nulle) s'organisent en bicouche. Pour d'autres facteurs de forme, à de faibles concentrations, les molécules s'organisent en micelle (les parties hydrophobes se regroupent au cœur de la structure) ou en micelle inverse (les parties hydrophobes sont exposées à la périphérie). Ces

assemblages peuvent permettre de créer une véritable barrière imperméable à l'interface et confiner le contenu des gouttelettes.

Ainsi, des émulsifiants comme certains monoglycérides sont capables de former plusieurs sortes d'auto-assemblages ou d'agrégats micellaires. Il est cependant nécessaire d'atteindre la CAC et de dépasser la température de Krafft (température au-delà de laquelle les molécules tensioactives se solubilisent et sont capables de s'auto-assembler, voir figure 10) [42-44].

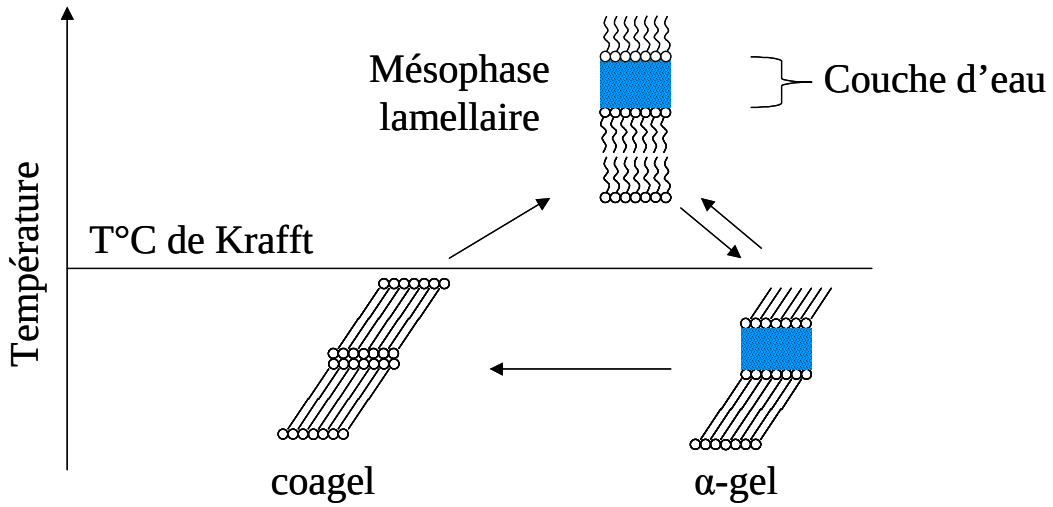


Figure 10 : Diagramme partiel de transition de phases d'un émulsifiant.

II) Auto-assemblages de monolinoléine

II) – 1 Mésophases en volume

II) – 1 – 1 Auto-assemblages de monoglycérides

Les monoglycérides sont des lipides très communément rencontrés comme additifs alimentaires. Ils représentent 75 % du volume d'émulsifiants produits dans le monde (lécithines incluses) [45]. Ces molécules résultent de l'estérification d'un glycérol et d'un acide gras. Le glycérol est considéré comme la tête polaire du monoglycéride, de par ces deux extrémités hydroxyles libres ayant des affinités pour les molécules d'eau. A l'inverse la chaîne carbonée de l'acide gras confère à la molécule une forte hydrophobicité. Plus l'acide gras sera long, plus sa valeur HLB sera faible, plus il sera liposoluble et de ce fait, efficace comme émulsifiant pour fabriquer une émulsion inverse E/H. La composition bipolaire des monoglycérides leurs confèrent de bonnes propriétés émulsifiantes.

Après ajout d'eau, au-dessus de la température de Krafft et de leur CAC, les monoglycérides regroupent leurs pôles hydrophobes et hydrophiles. Leurs assemblages sont déterminés par la nécessité d'optimiser l'énergie nécessaire à la création d'interface entre les zones hydrophiles et hydrophobes. En fonction du facteur de forme, de la concentration et de la température, ils s'associeront soit en micelle, soit en bicouche lamellaire ou encore en micelle tubulaire. Ces structures monoglycérides/eau sont en équilibre thermodynamique au contraire des émulsions.

Suivant le facteur de forme des monoglycérides, la courbure de l'interface eau/huile peut être positive, négative ou nulle. Lorsque la courbure est positive les phases sont dites normales (les chaînes aliphatiques sont orientées à l'intérieur des structures), à l'inverse lorsque la courbure est négative, les phases sont dites inverses (les chaînes hydrophobes forment la couche externe de la structure). Aux fortes concentrations et en fonction de la température, les monoglycérides forment des mésophases de type cristal liquide (hexagonal, cubique,…). La séquence des différentes mésophases des monoglycérides est schématiquement décrite dans la figure 11 [46] ; elle peut être amenée à varier en fonction du monoglycéride utilisé. [47].

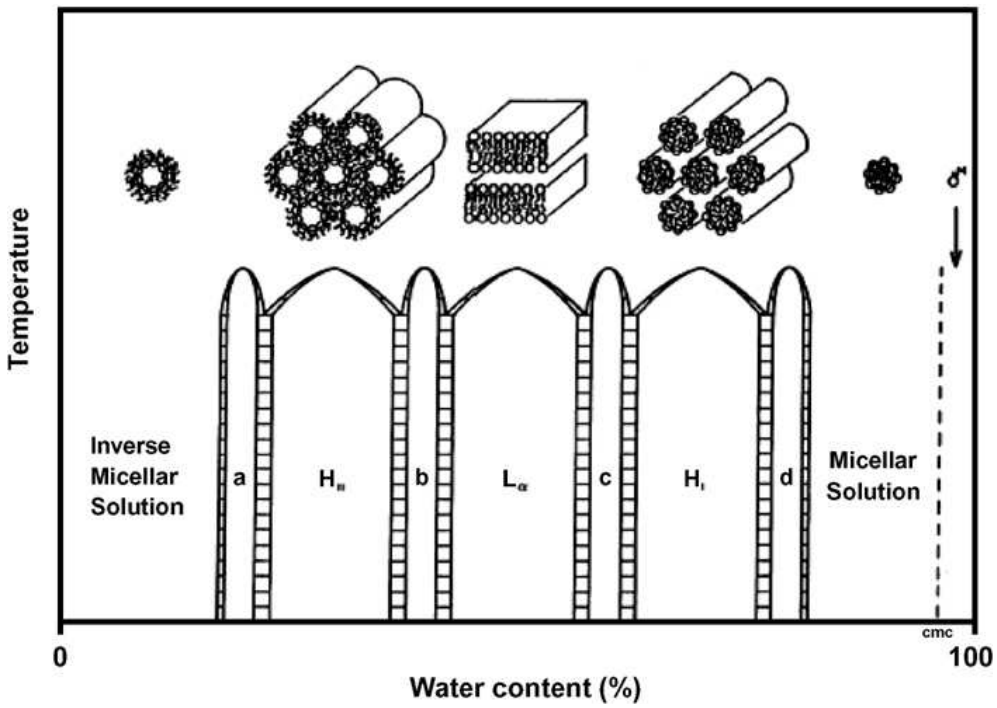


Figure 11 : Succession probable des phases d'un mélange eau/monoglycérides en fonction de la teneur en eau du mélange, tiré de [46].

(*a*) phase micellaire cubique inverse, (H_{II}) phase hexagonale inverse, (*b*) phase cubique bicontinue inverse, ($L\alpha$) phase lamellaire, (*c*) phase cubique bicontinue normale, (H_I) phase hexagonale normale, (*d*) phase micellaire cubique normale.

Pour des fortes concentrations en eau, des micelles normales se forment (microémulsion H/E, dénommée L_1). Quand la concentration en eau diminue on atteint successivement une phase hexagonale normale (H_I), une phase lamellaire cristalline (L_α), une phase hexagonale inverse (H_{II}) et une phase micellaire inverse (microémulsion E/H, ou L_2). La phase lamellaire cristalline (L_α), possédant une courbure interfaciale nulle, sépare le diagramme en zones de signes de courbure opposés. La première, avec une forte concentration en eau, regroupe les auto-assemblages ayant une courbure positive, les parties hydrophobes étant regroupées au centre des micelles. Pour des faibles concentrations en eau, on observe des structures de type inverse, ayant une courbure négative, et des chaînes aliphatiques dirigées vers l'extérieur des structures. Entre les phases hexagonales et lamellaires, des phases cubiques bicontinues sont attendues : la phase cubique bicontinue normale (V_1) et la phase cubique bicontinue inverse (V_2). Entre les phases hexagonales et micellaires peuvent se trouver des phases micellaires cubiques (I_1 et inverse I_2). Dans notre étude, nous utiliserons un monoglycéride formant des mésophases inverses. Les mésophases de monoglycérides ont été étudiées et décrites depuis

les années 60, notamment par Lutton, Larsson et Luzzati, qui publièrent les premiers diagrammes de phases [48-51].

Les mésophases possèdent donc des domaines d'eau et d'huile finement dispersés. La topologie des domaines d'eau est diverse : de type micellaire, tubulaire ou continue. Ainsi, ces mésophases peuvent accueillir des molécules de toutes solubilités qui peuvent s'intégrer dans l'eau, dans la partie lipophile ou aux interfaces. Ceci est notamment vrai pour des composés de faibles solubilités comme des arômes, des parfums, des nutriments ou des principes actifs de médicaments, qui peuvent être insérés dans ce type de structures.
Les molécules purement liposolubles seront solubilisées dans les chaînes aliphatiques des acides gras, les molécules hydrophiles seront contenues dans les domaines aqueux. La plupart des molécules utilisées en industrie pharmaceutique ou alimentaire possèdent un caractère amphiphile et vont s'adsorber à l'interface eau/huile.
L'intérêt majeur de ces mésophases de monoglycérides est que l'interface est extrêmement importante et représente environ 400 m^2/g pour la phase cubique inverse (V_2).

De tels auto-assemblages sont observés dans la nature et notamment au sein des membranes cellulaires [52-54]. Certaines membranes ne sont pas uniquement formées de bicouches mais montrent des organisations cubiques, observées par exemple dans le réticulum endoplasmique lisse, des membranes nucléaires ou au sein des mitochondries et des photosomes [55]. En effet, dans les zones mitochondriales dédiées à l'échange d'énergie, des organisations membranaires cubiques ont été reportées.
Leur très grande surface interfaciale permet un échange plus important d'énergie dans un volume restreint. La figure 12 montre les membranes cubiques des mitochondries de l'amibe *Chaos carolinensis* [56,57].

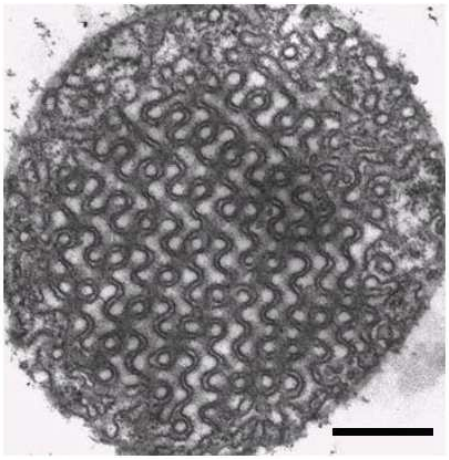


Figure 12 : Image de microscopie électronique à transmission de membranes cubiques de mitochondries de l'amibe *Chaos carolinensis* [56].
La barre d'échelle représente 500ηm.

De nombreuses molécules, autres que les monoglycérides sont connues pour leur capacité d'auto-assemblage : monoéthanolamide [58], phospholipides, phytantriol [59-61], glycolipides, phosphatidyléthanolamine ou des dérivés d'urée. Cependant, la majeure partie des publications décrivant des mésophases fixent leur attention sur les monoglycérides et notamment sur la monooléine [62,63], la monoélaidine [64-66], la monolaurine, la monopentadécénoine [67,68], la monoérucine [69] ou la monolinoléine.

Ces mésophases peuvent être caractérisées par le biais de plusieurs techniques :

- La technique la plus adaptée et la plus utilisée pour la caractérisation des mésophases de monoglycérides est la diffusion des rayons X aux petits angles (Small Angle X-ray Scattering : SAXS).

- La microscopie électronique est la deuxième technique la plus répandue pour l'étude des mésophases de monoglycérides. La cryo-Microscopie Electronique à Transmission (cryo-MET) et la Microscopie Electronique à Balayage à Emission de Champ (MEB) sont des techniques complémentaires des rayons X.

  Concernant la Microscopie à Balayage, le faisceau d'électrons est plus fin et vient balayer la surface d'étude. Ce n'est plus le faisceau transmis qui est collecté mais le

faisceau rétro-diffusé. Cette technique permet donc, de manière fidèle, la reconstruction en trois dimensions de l'échantillon. Elle possède cependant une résolution inférieure à la MET.

- De manière plus confidentielle, d'autres techniques peuvent être utilisées pour décrire les mésophases de monoglycérides. La Microscopie à Force Atomique permet de déterminer la taille des domaines des mésophases ou de visualiser la dispersion de ces mésophases dans l'eau [70,71].

- La Calorimétrie Différentielle à Balayage (Differential Scanning Calorimetry – DSC) peut être utilisée afin de distinguer les différentes plages de fusion/cristallisation des phases de monoglycérides [72].

- La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) permet également de déterminer les organisations des assemblages de monoglycérides [73,74].

Ces méthodes permettent donc de visualiser les mésophases et d'en décrire les principales caractéristiques. Lors de cette étude, les structures internes seront identifiées par la technique de diffusion des rayons X aux petits angles. De par la position des pics de Bragg dans le diffractogramme, on en déduit le paramètre de maille de la mésophase.

II) – 1 – 2 Mésophases de monolinoléine

La monolinoléine est le résultat de l'estérification d'un glycérol et d'un acide linoléique (*cis,cis-9,12-octadécadiénoïque*), un acide gras à 18 atomes de carbone avec deux insaturations en position 9 et 12. Ces insaturations font adopter à la molécule une conformation courbée (figure 13). Son HLB de 3,8 lui confère un rôle d'émulsifiant inverse, qui stabilisera des émulsions E/H.

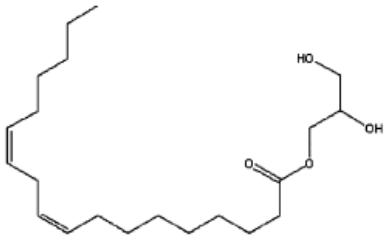


Figure 13 : Représentation de la molécule de monolinoléine.

Le diagramme de phase du mélange monolinoléine/eau a été décrit par De Campo et al. en 2004 [75] (figure 14).

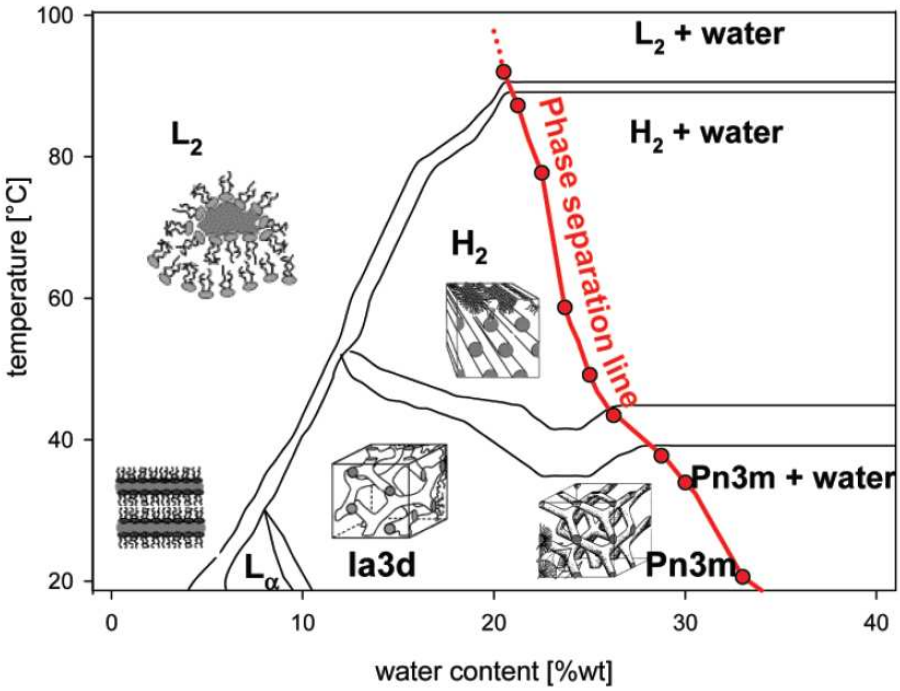


Figure 14 : Diagramme de phase du mélange monolinoléine/eau, entre 20 et 94°C en fonction de la teneur en eau.

Les lignes noires représentent les changements de phases. La ligne rouge représente la ligne de au-delà de laquelle l'eau est en excès (la mésophase est à son maximum de solubilisation).

Les mésophases sont caractérisées par leur topologie et une grandeur caractéristique, le paramètre de maille, qui exprime la périodicité d'un motif. Pour les mésophases de monoglycérides cette grandeur est de l'ordre de quelques nanomètres. Ces distances caractéristiques sont très faibles et leurs déterminations nécessitent l'utilisation de techniques

de caractérisation physique lourdes tel que la diffusion de rayonnements ou à la microscopie électronique.

Les mésophases de monolinoléine possèdent un polymorphisme important en fonction de la teneur en eau et de la température :

- La microémulsion inverse (L_2) est une dispersion de micelles d'eau dans une phase lipidique, de l'ordre de quelques dizaines à une centaine de nanomètres. À la différence d'une émulsion inverse, la phase L_2 est stable thermodynamiquement. Ces micelles d'eau ne sont pas toutes de même diamètre, n'ont pas de périodicité et ne sont donc pas considérées comme des mésophases. Elles présentent l'intérêt de former spontanément et de façon stable, des domaines nanométriques d'eau dans une matrice de lipides. La phase L_2 est présente à toutes les températures pour des faibles teneurs en eau. Lorsque l'échantillon est chauffé au-dessus de 90°C, la phase L_2 est la seule présente.

- La phase lamellaire (Lα) est obtenue pour des teneurs en eau comprises entre 8 et 10 % et des températures inférieures à 30°C. Elle consiste en des empilements de bicouche de monolinoléine planes et parallèles entre elles, formant une matrice à une dimension (figure 15 tirée de [76]).

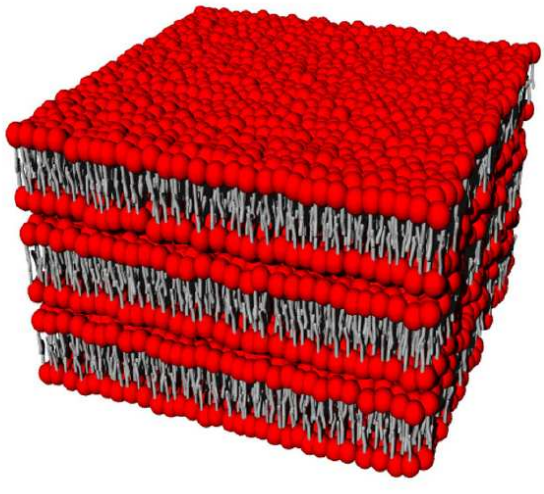


Figure 15 : Représentation schématique d'une phase lamellaire Lα.
Les têtes polaires sont en rouge alors que les chaînes aliphatiques sont en gris.

- La phase hexagonale inverse (H_{II}), décrite en 1960 par Luzzati [77,78], est un arrangement ordonné et dense de micelles cylindriques d'eau dans la matrice de monolinoléine. Elle est obtenue à des températures élevées (entre 45 et 85°C) et à une teneur en eau minimale de 13% [76,79]. (figure 16)

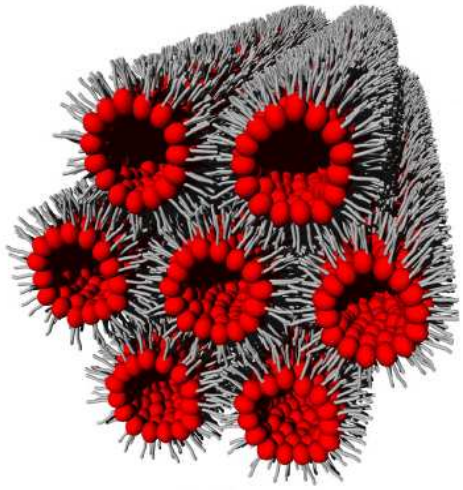


Figure 16 : Représentation schématique d'une phase hexagonale inverse H_{II}.
Les têtes polaires sont en rouge alors que les chaînes aliphatiques sont en gris.

- Pour des températures inférieures à 50°C et pour des teneurs en eau supérieures à 10%, la monolinoléine forme des mésophases cubiques bicontinues inverses (V_2). Il existe trois types de mésophases cubiques bicontinues inverses : la mésophase cubique primitive (Im3m), la mésophase cubique diamant (Pn3m) et la mésophase cubique gyroïde (Ia3d). La mésophase cubique primitive (qui n'est pas présente dans le diagramme de phase en volume du mélange monolinoléine/eau) a comme structure des tubes d'eau séparés par une bicouche. La maille est composée de 3 canaux d'eau arrangés perpendiculairement, se rejoignant au centre de celle-ci (figure 17) [80]. La phase Pn3m est aussi composée de deux canaux d'eau séparés par une bicouche de monolinoléine. Quatre canaux d'eau se rencontrent formant un tétraèdre avec un angle de 109,5°C [81]. La phase Ia3d, a quant à elle une structure plus complexe.

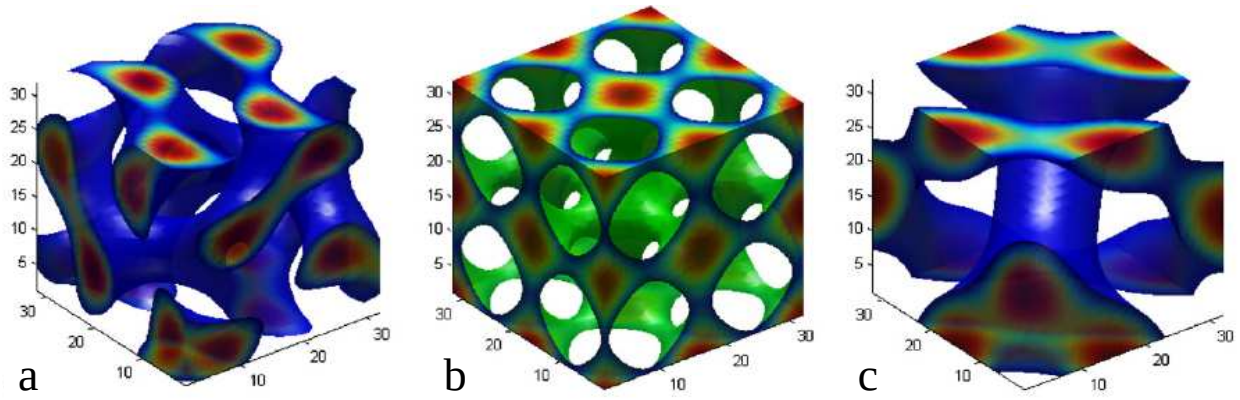


Figure 17 : Représentation des mailles des mésophases cubiques bicontinues inverses.

a : Phase cubique bicontinue inverse gyroïde Ia3d, b : Phase cubique bicontinue inverse primitive Im3m,

c : Phase cubique bicontinue inverse diamant Pn3m.

À partir d'une certaine teneur en eau, les mésophases ne peuvent plus absorber d'eau et une séparation de phases se produit. La courbe rouge de la figure 14, représente cette quantité maximum d'eau internalisable dans les mésophases. Au-delà de cette courbe, le système est hétérogène, la mésophase est en excès d'eau. On observe que la phase cubique bicontinue inverse (V_2) est capable de solubiliser plus d'eau que la phase hexagonale inverse ou que la microémulsion, soit respectivement, 33%, 27% et 20%.

La forte capacité de solubilisation de ces mésophases leur confère un intérêt potentiel pour la vectorisation de principes actifs qu'ils soient liposolubles, hydrosolubles ou amphiphiles. Cependant ces structures sont hydrophobes et difficilement implémentables dans des médicaments ou des aliments (le plus souvent à phase continue aqueuse). Or, la coexistence de ces mésophases avec un excès d'eau semble prouver qu'elles puissent être stables en excès d'eau. Elles pourraient ainsi être fractionnées dans l'eau, tout en conservant leurs structures.

II) – 2 Isasomes

II) – 2 – 1 Définition d'un Isasome

Après plus de 30 ans de recherches sur les caractérisations des mésophases de monoglycérides en volume, la communauté scientifique a cherché à mettre à profit les avantages de ces structures et à leur trouver des applications concrètes. Afin de profiter de leur spectre large de solubilisation, il était nécessaire de disperser, dans la phase aqueuse, des particules de mésophases de monoglycérides. Les premières observations de mésophases émulsifiées ont été observées en 1979, dans une étude focalisée sur la digestion des lipides [82]. En 1981, K. Larsson a démontré qu'il était possible de disperser des mésophases cubiques inverses [83].

Cependant un fractionnement simple de ces mésophases ne suffit pas à les tenir dispersées dans la phase aqueuse de manière homogène. En effet, leur courbure négative leur confère une forte hydrophobicité ; elles ont alors tendance à se ré-agréger. Pour remédier à ce problème il est nécessaire d'ajouter un émulsifiant à haut HLB qui stabilisera l'interface des particules de mésophases. En 1994, Landh a décrit un copolymère à blocs (amphiphile) comme étant efficace pour stabiliser des mésophases cubiques par stabilisation stérique [84]. Depuis cet article, les dispersions aqueuses de mésophases de monoglycérides sont principalement effectuées grâce au Pluronic F127 (BASF, Allemagne). Un nombre restreint d'émulsifiants a été testé pour l'émulsification de mésophases de monoglycérides. Le polysorbate 80 a été utilisé par Barauskas et coll. en 2005 et 2006 [85,86], Garti a réussi à stabiliser les mésophases par des phytostérols éthoxylés [87] alors que Nakano a choisi l'utilisation d'un polymère de cellulose modifiée [88].

Même s'il a été peu étudié, le choix de l'émulsifiant est primordial car il interagit dépendamment de sa structure et de sa concentration, avec la structure interne de la particule [89,90].
Ces dispersions stables de mésophases de monoglycérides ont été dénommées ISAsomes pour Internally Self-Assembled somes (soit des particules ayant une structure interne auto-assemblée) [91]. Théoriquement, il est abusif de dénommer de telles dispersions des émulsions, car la phase dispersée n'est systématiquement un fluide. Cependant, par convention, la terminologie se rapportant aux émulsions est employée pour les Isasomes.

Toutes les phases ayant la capacité de conserver leurs structures en excès d'eau (voir figure 14), peuvent ainsi être dispersées sous forme de gouttelettes dont l'intérieur est thermodynamiquement stable [75]. La phase L_2 devient alors une MicroEmulsion Emulsifée, la phase H_{II} devient une phase hexagonale émulsifiée ou Hexosome et les phases cubiques deviennent des phases cubiques émulsifiées ou Cubosome. Ces termes Cubosome-Hexosome, font l'objet d'un brevet déposé par GS Development AB (Suède), respectivement en 1994 et 1996 (US74557712 et US75195455).

Comme dans le diagramme de phase en volume, il est possible de changer la structure interne des gouttelettes en modifiant la température. Il est donc possible, de manière réversible, de former une MicroÉmulsion Émulsifée, des Hexosomes ou des Cubosomes en faisant varier la température [75]. Dans les mêmes conditions de température, de pression et de concentration, les mésophases en masse ou dispersées possèdent les mêmes structures et le même paramètre de maille. Ceci est vérifié par la position identique des pics de diffusion des rayons X, comme le montre la figure 18 [92] :

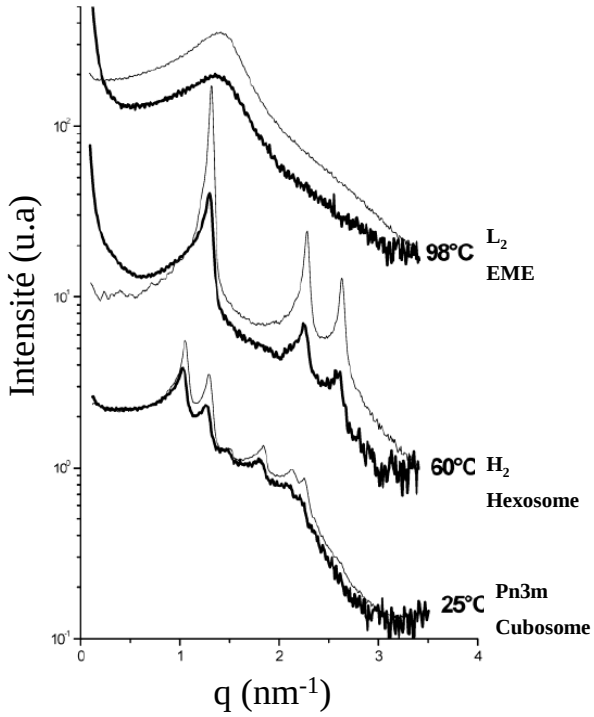


Figure 18 : Comparaison des courbes de diffusion des rayons X pour les mésophases en masse (avec 40% d'eau) ou émulsifiées.

Les lignes grises représentent les phases en masse alors que les lignes noires représentent les phases émulsifiées. Les intensités ont été normalisées par la concentration en Monolinoléine.

De plus, la teneur en eau de ces Isasomes peut être calculée par SAXS par comparaison avec les mésophases non émulsionnées [93].

Hormis les trois phases précédemment citées, de nouvelles structures ont ainsi pu être émulsifiées. La liste exhaustive des mésophases émulsifiées de monoglycérides est décrite ci-dessous :

- La MicroEmulsion Emulsifiée (Emulsified MicroEmulsion : EME)

L'EME n'est pas à proprement parler une double émulsion E/H/E, car la microémulsion est thermodynamiquement stable. Elle est composée de nombreuses gouttelettes d'eau dispersées dans des gouttelettes d'huile, sans réelle organisation. La faible organisation est confirmée par l'utilisation du SAXS, où l'on observe un pic très large de diffusion, corrélé directement à la distance moyenne entre gouttelettes d'eau à l'intérieur de la phase dispersée [72,94] (figure 19). On calcule alors cette distance moyenne (D) avec la formule suivante.

Formule 5 : $D = 2\pi / q_0$

q_0 étant la valeur de q au maximum du pic.

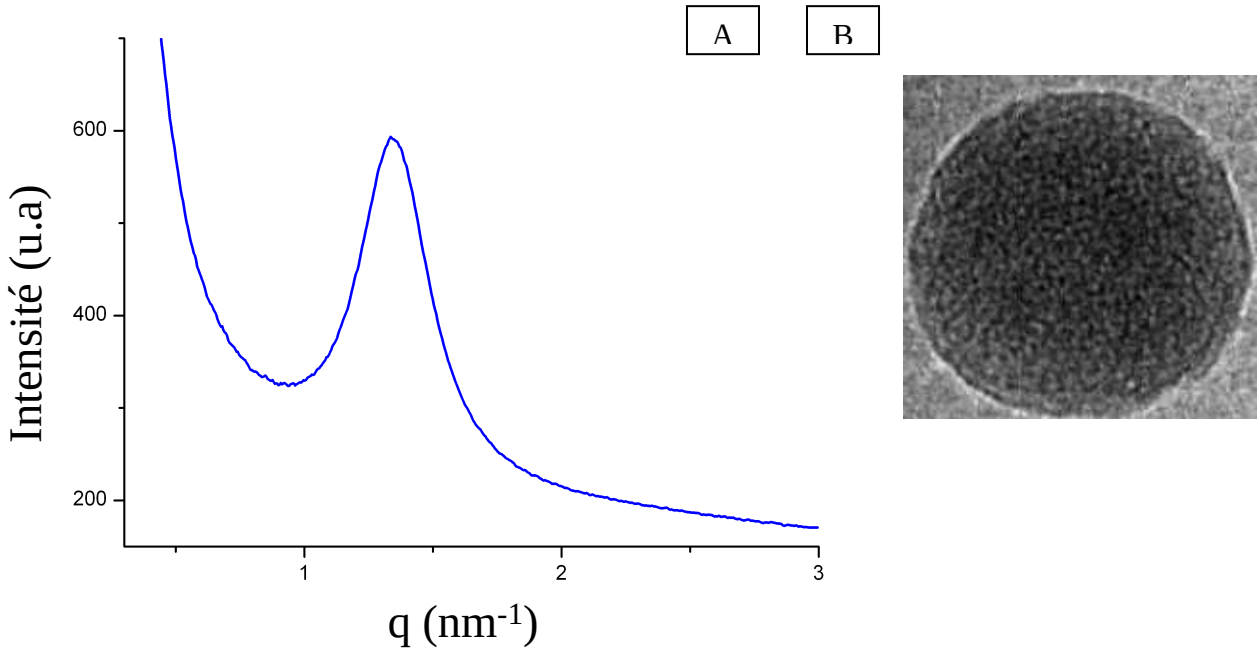


Figure 19 : Spectre de diffusion des rayons X (A) et image de cryo-microscopie électronique à transmission (B) d'une MicroEmulsion Emulsifiée.

- La mésophase micellaire cubique émulsifiée (Fd3m).

En faisant varier le rapport monoglycéride/huile, il est possible de créer une mésophase émulsifiée, non présente en volume (cas du limonène). Elle peut être définie comme étant une évolution vers la structuration de l'EME. En effet, la mésophase micellaire cubique émulsifiée est définie comme l'arrangement cubique des gouttelettes d'eau, à l'intérieur des gouttelettes d'huile, selon une matrice Fd3m. Elle est composée de deux types de gouttelettes d'eau, de tailles différentes, organisées dans un réseau cubique de type diamant (figure 20b) [95-97].

La figure 20 montre le spectre de diffusion caractéristique, une représentation d'une maille de la phase Fd3m [98] ainsi qu'une image de cryo-microscopie électronique à transmission [72].

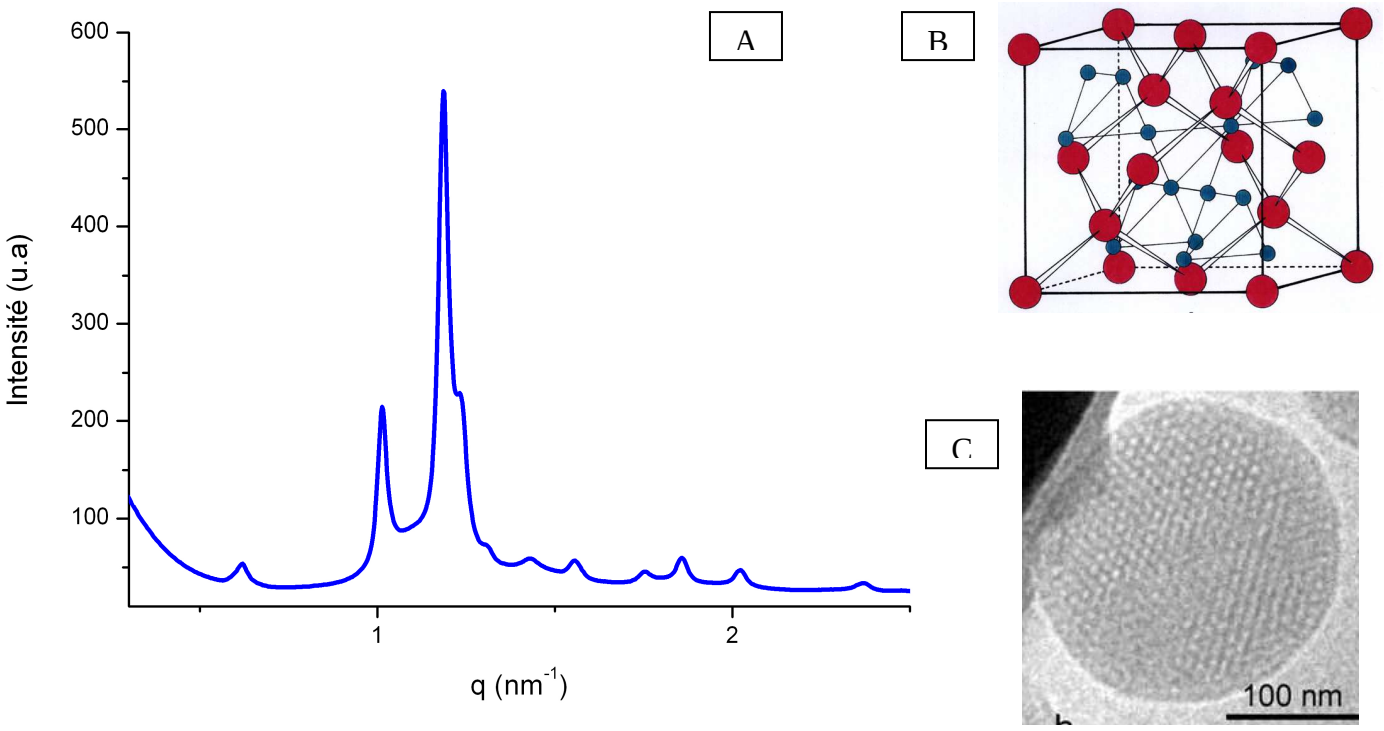


Figure 20 : Spectre de diffusion des rayons X (A), le schéma d'une maille (B) et une image de cryo-microscopie électronique à transmission (C) d'une mésophase émulsifiée Fd3m [94].

- La mésophase hexagonale inverse émulsifiée : Hexosome (H_{II}).

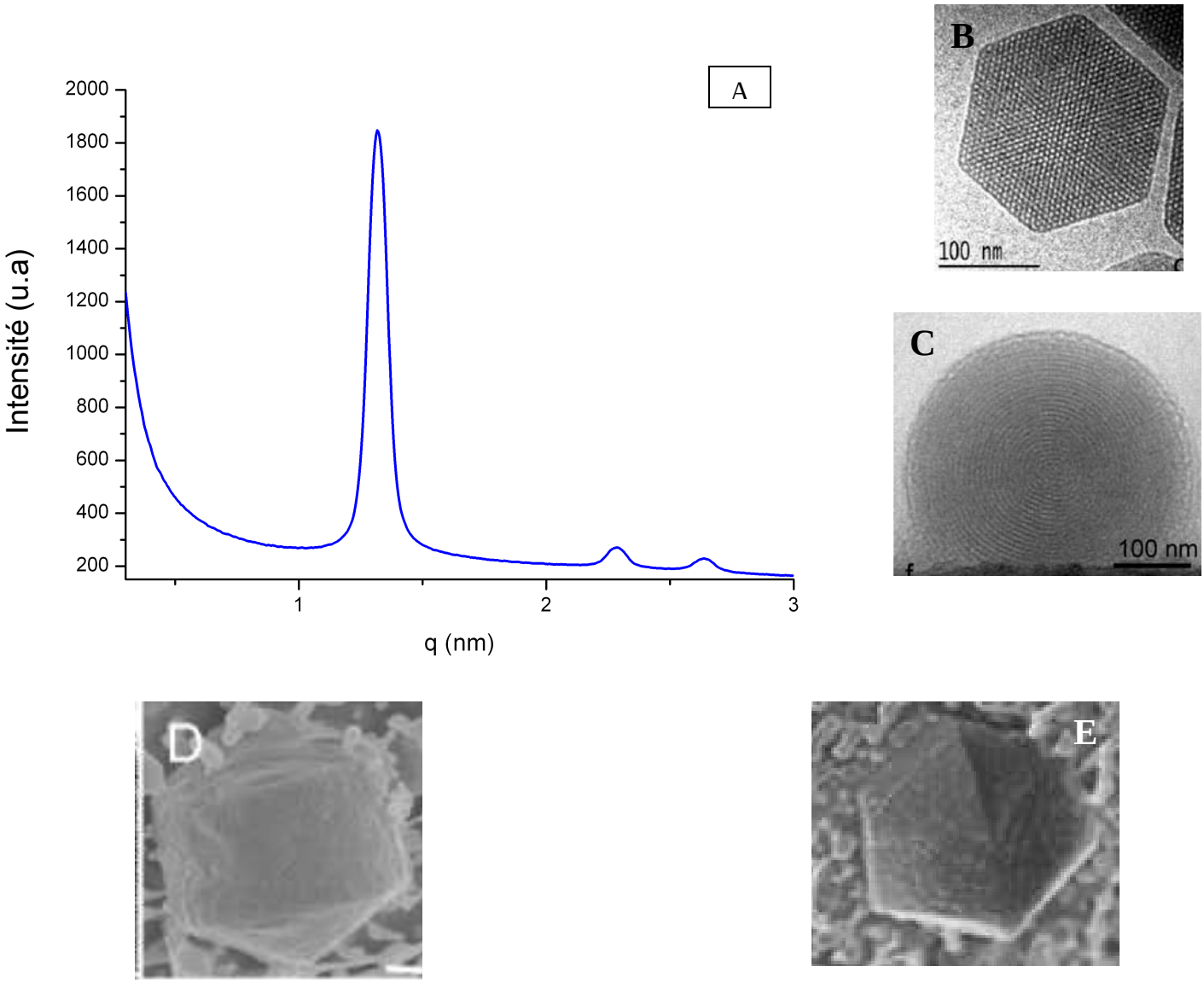


Figure 21 : Spectre de diffusion des rayons X (A), observations de cryo-MET (B-C) et de cryo-FESEM (D-E) d'une mésophase émulsifiée H_{II}.

La phase hexagonale émulsifiée est composée de canaux d'eau circulaires, fermés sur eux-mêmes et organisés selon une matrice hexagonale [72], à l'intérieur même des gouttelettes de phase dispersée. Ces domaines d'eau, isolés les uns des autres, ainsi que de la phase continue constituent d'excellents réservoirs à molécules hydrosolubles.

Selon de récentes publications de Barauskas [99], il semblerait que les Hexosomes adoptent deux types de géométrie. La première est du type « spinning top » (figure 21 **D**), ayant une partie cylindrique se terminant par deux parties coniques. Cette géométrie explique les observations effectuées par cryo-TEM (figure 21 **B** et **C**). En effet, si l'Hexosome est visualisé de côté on observera une particule facettée hexagonalement. Si l'on visualise ce même Hexosome selon l'axe des extrémités coniques, on observera un Hexosome cylindrique en cryo-TEM. La deuxième géométrie observée (figure 21 **E**) semble suivre une « vraie » géométrie hexagonale en trois dimensions. Cette dernière apparaîtra également comme une particule facettée hexagonalement en cryo-TEM.

- Les mésophases cubiques inverses émulsifiées : Cubosome (Pn3m et Im3m).

Comme précédemment expliqué, il est possible d'émulsifier uniquement les mésophases, présentes dans le diagramme de phase en volume, étant présentes en excès d'eau (figure 14). La phase cubique Pn3m peut donc être émulsionnée, mais pas la phase Ia3d [100]. Une nouvelle phase cubique a été décrite et est due à l'interaction possible de l'émulsifiant avec la phase interne des gouttelettes, la phase cubique peut ainsi adopter une symétrie Im3m lors de l'intégration de l'émulsifiant à la structure [101,102].

La figure 22, décrit les spectres de diffusion des deux phases cubiques ainsi que des images en cryo-TEM [72,103] et cryo-FESEM [97].
Les phases cubiques en volume possèdent une très grande viscosité ce qui rend leur dispersion peut aisée et coûteuse en énergie [46]. Les observations de microscopie électronique montrent qu'une grande partie de la phase dispersée n'est pas organisée mais sous forme de simples vésicules et ceci pour deux raisons. Les phases cubiques Im3m et Pn3m ont des paramètres de mailles importants, de l'ordre de 9 à 12 ηm. Si la dispersion de ces mésophases est trop petite (moins de 100 ηm), l'espace est trop restreint pour laisser place à une organisation structurelle interne.

De plus, les observations décrivent la présence de vésicules attachées aux Cubosomes (voir figure 22 B et E) [103]. Celles-ci sont d'autant plus nombreuses que la concentration en émulsifiant est importante [104]. La forme cubique des Cubosomes n'est pas la forme la plus favorable thermodynamiquement. L'énergie du système est

donc diminuée par la présence de ces vésicules qui permettent de conférer une surface plus sphérique à la particule.

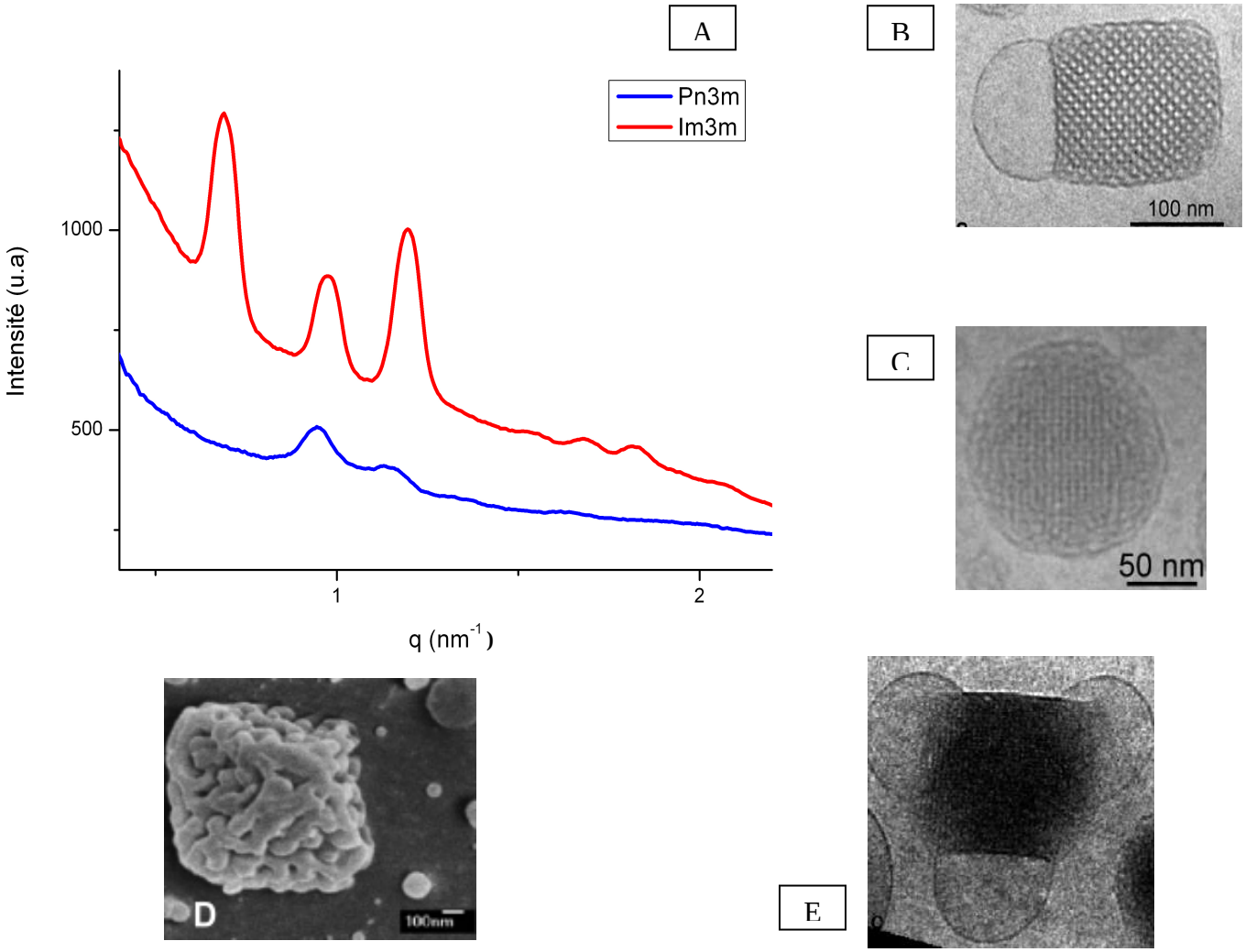


Figure 22 : Spectre de diffusion des rayons X des mésophases cubiques émulsifiées Pn3m et Im3m (A), observations de cryo-MET d'Im3m (B) et de Pn3m (C et E) et de cryo-FESEM de Pn3m (D).

Ces vésicules adjointes aux Cubosomes ont été décrites par Gustafsson en 1996-1997 par cryo-TEM, car ces vésicules n'ont pas de signatures facilement identifiables en diffusion des rayons X aux petits angles [105,106].

Ces mésophases cubiques ne contiennent pas, à l'image des Hexosomes, des tubes d'eau isolés les uns des autres et de la phase continue. Contrairement aux Hexosomes, les canaux d'eau sont tous connectés; la particule est donc formée de deux réseaux continus disjoints: la phase aqueuse et la phase huileuse [72,107-109].

L'équipe de N. Garti a proposé en 2009, une hypothèse de formation des cubosomes (Figure 23) [110-112].

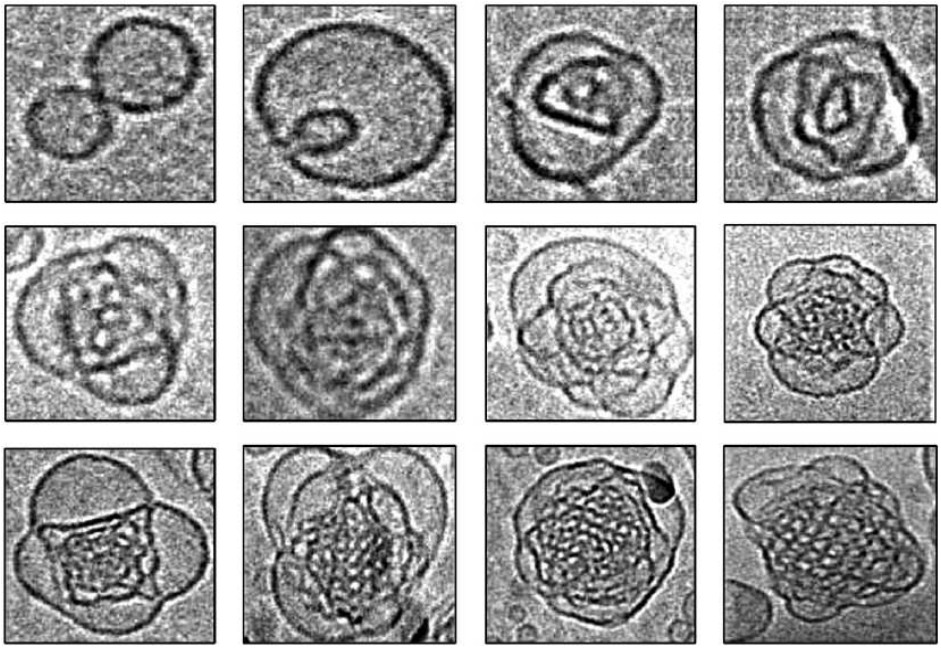


Figure 23 : Hypothèse de formation des Cubosomes, proposée par Garti.

La première étape consisterait en la fusion de plusieurs vésicules (ligne 1 de la figure 23). Ensuite de nombreuses connexions entre les bicouches de monoglycérides (également appelées attachements inter-lamellaires) constitueraient les points de nucléation de la structure cubique (ligne 2). Au fur et à mesure des fusions de bicouches, la structure cubique prendrait forme amenant pour organisation finale un Cubosome de forme quasi cubique (ligne 3).

- La phase éponge (L_3) :

Les mésophases émulsifiées précédemment décrites, sont les principales phases disponibles dans le diagramme de phase de la monolinoléine. Cependant pour d'autres types de lipides, il est possible d'obtenir une nouvelle phase dite « éponge » ou L_3 [85,86,113].

Elle peut être considérée comme une phase cubique bicontinue désordonnée. La figure 24 montre un cliché effectué par cryo-TEM.

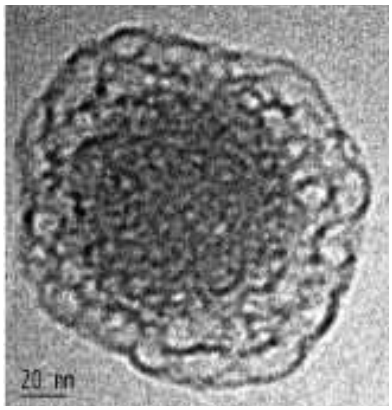


Figure 24 : Observation par cryo-TEM d'une mésophase L_3 émulsifiée.

Il s'agit d'un réseau bicontinu hautement interconnecté, sans réseau cristallin ordonné, ce qui le rend peu identifiable par SAXS car ressemblant au signal d'une phase L_2 [114].

Plusieurs paramètres peuvent être modifiés afin d'obtenir ces différentes mésophases. Comme le montre la figure 14, la température influe directement sur l'organisation des monoglycérides. A. Yaghmur et coll. ont démontré la possibilité de faire varier l'auto-assemblage de monooléine en faisant varier la pression. À une température de 7°C et pour une composition fixe, la figure 25 montre les différentes organisations obtenues en faisant varier la pression [115].

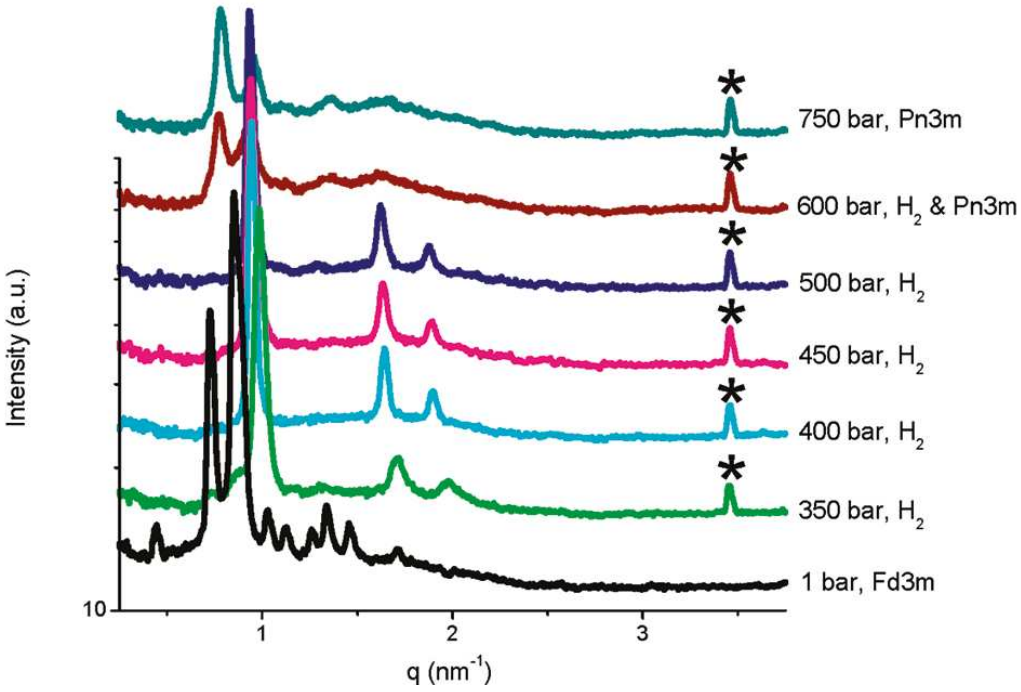


Figure 25 : Évolution de la structure interne à 7°C, en fonction de la pression.
* = pic de cristallisation du tetradécane.

Ainsi, une phase micellaire cubique Fd3m, présente à pression atmosphérique, va évoluer en phase hexagonale (entre 350 et 600 bars) puis cubique (au-delà de 600 bars) lorsque la pression augmente.

Toutes ces structures sont parfaitement décrites dans la littérature, en fonction de paramètres extérieurs tels que la température, la pression ou la concentration des monoglycérides. Ces informations structurales permettent aux équipes de recherche d'utiliser ces Isasomes comme des réservoirs à molécule. Il restait alors à observer et décrire l'influence de ces molécules hôtes sur les structures internes.

II) – 2 – 2 Molécules hôtes

Ces mésophases émulsifiées sont donc des outils extrêmement prometteurs pour la vectorisation ou la solubilisation de molécules [116]. En effet, pour le cas des cubosomes, ces petites gouttelettes d'huile sont capables de contenir 30% d'eau ; ils peuvent ainsi solubiliser

un large spectre de molécules. Dans le but d'utiliser ces mésophases comme réservoirs à molécules, la première étape a consisté à les transposer dans un milieu continu aqueux afin de les rendre manipulables et délivrables.

Dans un deuxième temps, il était intéressant d'obtenir toutes les structurations décrites précédemment. Cependant, les molécules hôtes peuvent ne pas supporter des traitements thermiques importants, qui étaient utilisés afin de faire varier la phase interne. Afin de pouvoir obtenir une gamme plus large de structures à température ambiante, des chercheurs ont modulé la structure du mélange monolinoléine/eau par l'addition d'une huile supplémentaire. En 2005, Yaghmur et coll., ont en effet découvert que l'addition d'huile, comme le tetradécane, dans la phase dispersée permet de moduler les structures internes des gouttelettes, sans modifier la température [91].

De nombreuses huiles ont été testées comme le tetradécane [97,117], le R-(+)-Limonène [117], la tricapryline [118], d'autres triglycérides [79] ou encore la vitamine E acétate [119] entre autres.

Les diagrammes de phase des mélanges monolinoléine / R-(+)-limonène et monolinoléine / tetradécane sont décrits dans la figure 26.

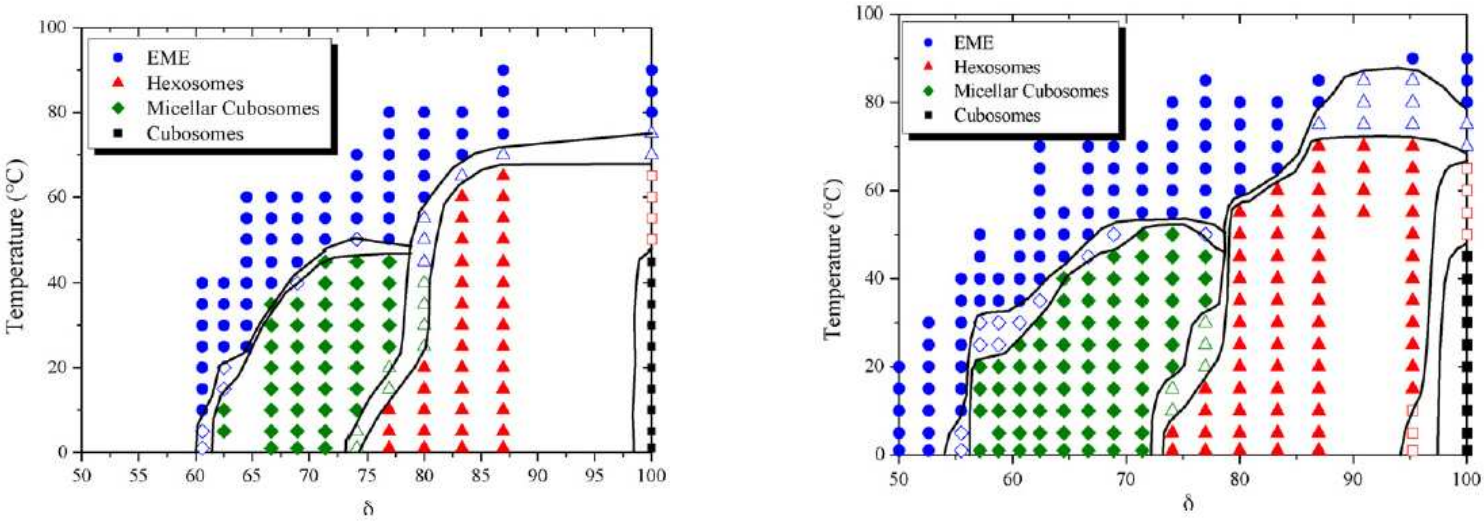


Figure 26 : Diagramme de phase du mélange tetradécane/Dimodan U (à gauche) et du mélange R-(+)-limonène / Dimodan U (à droite), à φ=5% et β=8.

En abscisse est reportée le paramètre δ qui équivaut au pourcentage de monoglycéride (voir ci-dessous).

Dans ce cas précis, les mêmes mésophases sont présentes, et seule la position des transitions de phases varie quelque peu. En effet, les domaines des structures micellaires cubiques et hexagonales sont plus étendus en utilisant le R-(+)-limonène.
Le changement de phase induit par l'addition d'huile est dû à une modification de l'agencement des monoglycérides et donc de la courbure de l'interface [116]. Les huiles ajoutées sont purement hydrophobes (non tensioactives) et sont donc solubilisées dans les chaînes d'acides gras de la monolinoléine. Cela augmente le volume hydrophobe des chaînes d'acides gras, modifie l'empilement des molécules de monoglycérides et favorise des courbures plus négatives. Cette modification de la courbure favorise également la formation de micelles, ce qui pourrait expliquer la présence de la phase Fd3m, non présente en masse [46,91,96,120].
La différence observée entre l'utilisation du R-(+)-limonène et le tetradécane, sur la localisation des transitions de phases ainsi que sur les valeurs des paramètres de maille, peuvent ainsi être expliquée par les différentes localisations de ces molécules autour des chaînes d'acide gras de la monolinoléine.

La proportion du monoglycéride dans le mélange lipide structurant/huile, est définie par le paramètre δ. Ce paramètre exprime le rapport de monoglycéride structurant, sur le total de la partie liposoluble de la phase dispersée, comme montré dans la formule suivante :

Formule 6

$$\delta = \frac{m_{Monoglycéride}}{m_{Monoglycéride} + m_{Huile}} \times 100$$

Un δ de 100 exprime ainsi la seule présence du monoglycéride structurant dans la partie lipophile. Un δ de 50 équivaut à la présence, en quantité égale, du monoglycéride structurant et de l'huile. Un δ de 0 correspondrait à une émulsion directe d'huile dans l'eau.

La structure interne des Isasomes dépend grandement des conditions opératoires et de la formulation. Il a été démontré que le mélange de deux émulsions, de même structure et de même δ, mais préparées avec deux huiles différentes, entraîne des échanges entre les gouttelettes des deux émulsions. C. Moitzi et coll., ont mélangé deux émulsions de phase Fd3m (δ 68%), l'une contenant du décane et l'autre du tétradécane (figure 27a). [121]

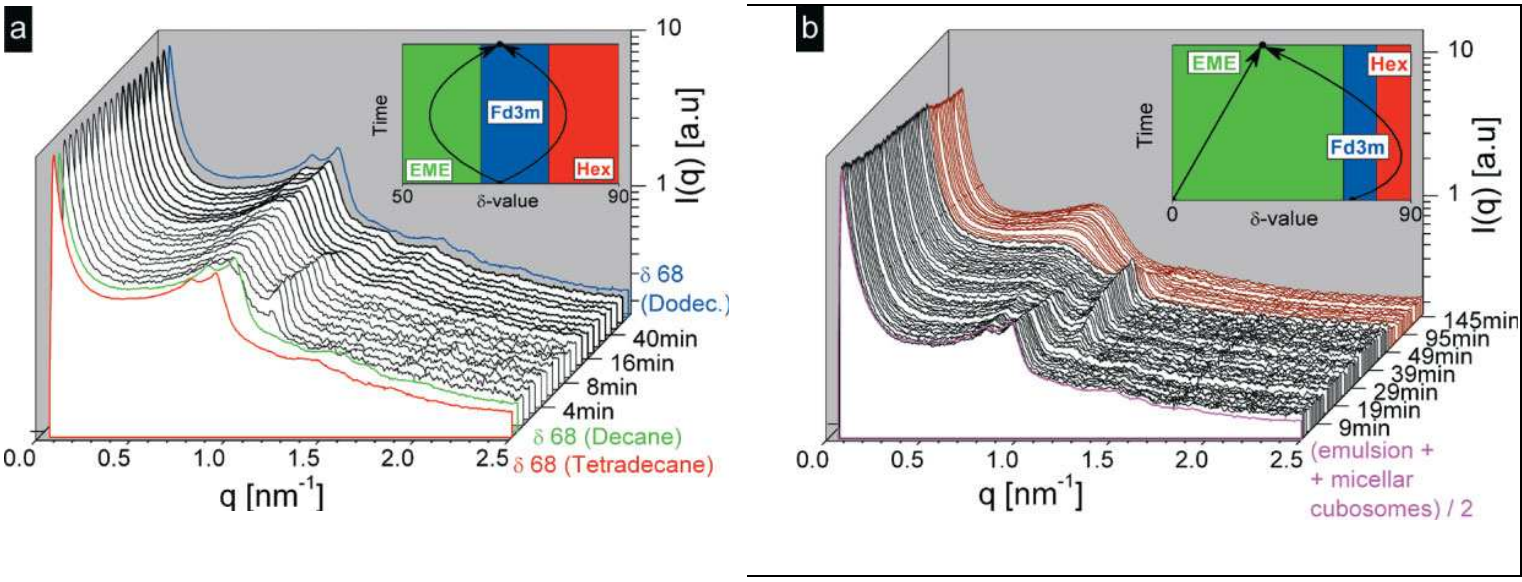


Figure 27 : a) Mélange de deux émulsions de Fd3m contenant des huile de différentes longueurs de chaînes (décane et tétradécane). b) Mélange de deux émulsions, une émulsion simple d'octadécane et une émulsion de structure Fd3m contenant du dodécane.

Lors du mélange le système va tendre à l'équilibre des concentrations et le décane (plus soluble dans l'eau) va quitter son émulsion plus rapidement pour venir s'insérer dans la deuxième. Les gouttelettes vont perdre du décane et vont donc avoir temporairement un δ plus élevé, qui se traduit par l'apparition d'une phase hexagonale. A l'inverse la deuxième émulsion accueille le décane qui vient de migrer et possède un δ plus faible et donc se transforme provisoirement en EME. Lorsque les échanges complets de matériel intra-gouttelettes a permis l'équilibre des concentrations l'émulsion finale retrouve sa structure initiale Fd3m.

Un deuxième exemple (figure 27b), montre le mélange d'une émulsion simple d'octadécane (ayant un coefficient de diffusion très faible) (δ0) et d'une émulsion contenant du dodécane de structure Fd3m (δ68). L'expérience a montré que le dodécane se transfère dans l'émulsion contenant de l'octadécane, modifiant le δ de la deuxième émulsion la faisant passer d'une structure Fd3m à Hexagonale, puis Fd3m et finalement une EME, lorsque l'équilibre de concentration est atteint.

Afin de faire varier la phase émulsifiée, il est ainsi possible de modifier la température ou d'ajouter une huile totalement liposoluble. Sa nature et sa concentration ont une importance cruciale dans la détermination du diagramme de phase.

Comme le laisse supposer les influences de la nature de l'huile utilisée sur le diagramme de phase ; l'ajout de molécules hôtes au sein de la structure aura des conséquences sur le diagramme de phase. En effet, une molécule liposoluble se solubilisera dans les chaînes aliphatiques des monoglycérides et modifiera la courbure en la rendant plus négative (figure 28) [45].

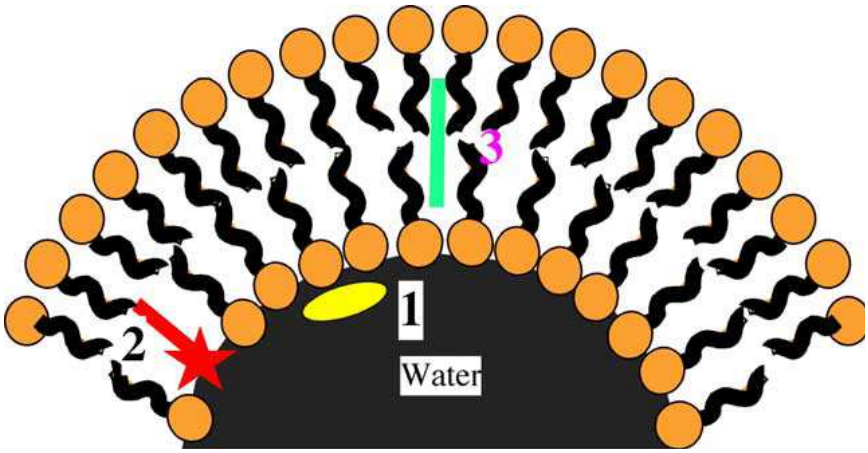


Figure 28 : Localisation de molécules hôtes en fonction de leurs polarités [45].
(1 : molécule hydrosoluble, 2 : molécule amphiphile, 3 : molécule lipophile).

En parallèle de leur caractérisation physico-chimique, de nombreuses études décrivent l'intérêt de l'utilisation des Isasomes comme vecteurs. En effet, leur exceptionnelle capacité à solubiliser tout les types de molécules (hydrosolubles, liposolubles et amphiphiles) en font des vecteurs optimaux pour les nutriments, les molécules médicamenteuses, les molécules aromatiques (parfum ou arôme), les engrais,… Les champs d'application sont vastes et largement étudiés [46,122]. Les publications récentes décrivent l'influence des molécules hôtes sur les structures auto-assemblées ainsi que leurs capacités de vectorisation.

II) – 2 – 3 Propriétés des Isasomes et Applications.

III) - 2 – 3 – a Relargage

L'utilisation principale des Isasomes est donc la possibilité de les utiliser comme conteneurs de molécules d'intérêt [123-125]. Ces réservoirs nanométriques, sont capables de solubiliser un spectre très large de molécules, souvent peu ou pas solubles en phase aqueuse et de les rendre disponibles. Ce stockage de molécules d'intérêt peut trouver utilité dans des domaines aussi variés que l'agroalimentaire, la pharmaceutique, la parfumerie, la médecine, ou encore l'agriculture [126,127].

Ben. J Boyd et son équipe [128,129] ont notamment suivi le relargage du glucose contenu dans les mésophases en volume, vers le milieu extérieur en fonction de leurs structures internes (Figure 29).

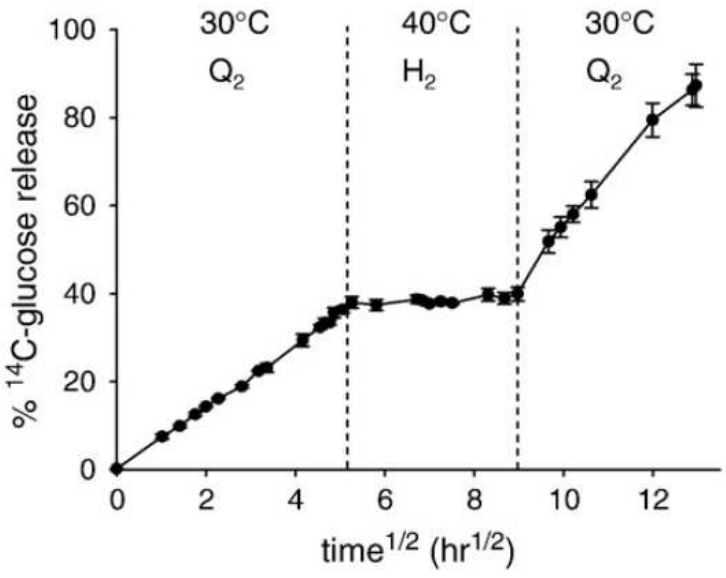


Figure 29 : Suivi du relargage du glucose des mésophases de phytantriol vers le milieu extérieur.

Initialement les mésophases sont organisées en phase cubique. Après chauffage à 40°C, la phase interne cubique change de conformation pour devenir hexagonale. Le relargage du glucose est alors très nettement ralenti. Ceci s'explique par le fait que les molécules de glucose sont enfermées dans les tubes d'eau circulaires, qui, contrairement à la phase cubique, ne possèdent pas de jonction avec la phase aqueuse continue. Lorsque la température diminue, la phase cubique se reforme et le glucose migre par diffusion à travers la phase d'eau interne vers la phase continue grâce aux jointures des deux domaines d'eau, inhérents à la structure cubique. Les Cubosomes ont donc un relargage de type « burst release » alors que les Hexosomes sont capables de conserver sur de longues durées des molécules hydrosolubles dans leurs canaux d'eau internes.

Un autre paramètre externe peut être utilisé afin de faire varier la structure interne des gouttelettes et par conséquent sa vitesse de relargage. Mezzenga et coll. ont effectué un mélange de monolinoléine et d'acide linoléique qui change de structure en fonction du pH de la solution. En effet, à pH=7, les Isasomes sont arrangés en Cubosomes (Im3m) et possèdent des caractéristiques de relargage rapide (concernant les molécules hydrophiles). En abaissant le pH à 2, la structure évolue en Hexosomes, permettant un relargage 4 fois moins rapide que précédemment. Ainsi, ces formulations permettent un relargage ciblé des molécules d'intérêt hydrosolubles dans l'intestin (pH7), tout en les retenant lors du passage dans l'estomac (pH2) [130]. Il reste cependant à étudier le devenir des Isasomes en prenant en compte, en plus du pH, tous les composants de la bile, pouvant affecter leur structure (enzymes digestives,…) [131]. Garti et coll. ont notamment démontré qu'une EME est capable de former des structures mixtes avec les micelles fabriquées lors de la digestion, perturbant leur structure initiale [132].

Des exemples d'applications des Isasomes dans divers domaines sont présentés ci-dessous :

- De nombreux exemples de vectorisation peuvent être cités pour des molécules à visée thérapeutique :

    - Pour délivrance dans le sang [133], comme l'irinotecan, un anticancéreux solubilisé dans des phases hexagonales ou cubique bicontinues [113,134], le diclofenac dans une Fd3m [135], la carbamazepine, le Coenzyme Q10 [110], le cytochrome C [136], l'insuline [137], la somatostatine [138], la rifampicine

[139], le diazepam, la ciclosporine [140], le propofol ou la griseofulvine [141]. Ces applications médicales sont soutenues par la faible interaction des mésophases avec le milieu sanguin [142]. De l'hémoglobine a même été « encapsulée » dans des phases cubiques [143].

- Pour application cutanée [144], comme la sulforhodamine B dans des cubosomes [145] ou la vitamine K ou du diclofenac dans des Hexosomes [146-148]. La phase cubique améliorerait la pénétration de composés actifs au travers de la peau [149].

- De plus en plus d'études portent sur la vectorisation de nutriments, afin de passer la barrière gastrique, qui est la cause de nombreuses dégradations de molécules sensibles à cause du très faible pH. Les Cubosomes (notamment la phase Pn3m) semblent être de bons protecteurs face à ce milieu acide généralement destructeur [150].

- Les Cubosomes semblent être également prometteurs comme nouveau système de délivrance oculaire. En effet, leur grande viscosité leur permet une rétention oculaire plus grande que les systèmes utilisés actuellement. De plus, leur importante capacité à solubiliser tous types de molécules est extrêmement appréciée. Leur taux de rétention des molécules étant plus faible, ils sont de meilleurs candidats, au regard des Hexosomes, afin de relarguer les principes actifs dans une échelle de temps raisonnable [151]

● Des utilisations des Isasomes à visée alimentaire sont également présentes dans la littérature. Certains nutriments, comme les vitamines, ont été testés. Les vitamines liposolubles A [113,152,153], vitamine K [154] vitamine E [113,119,155] ; ou les vitamines hydrosolubles comme la vitamine C [155,156]. Des brins d'ARN, des polyols ou des protéines ont également été inclus dans les Isasomes [61,157-161].

● Au-delà de la vectorisation des molécules, les Isasomes ont été testés pour des applications en parfumerie ou en alimentaire, pour leurs capacités de rétention et de relargage d'arômes ou de molécules aromatiques. En effet, ces molécules d'intérêt possèdent souvent une température de vaporisation et une pression de vapeur faibles.

Ce sont donc des molécules difficilement « encapsulables » et leur relargage est souvent instantané [162]. Les Isasomes paraissent donc être un bon système de vectorisation des molécules aromatiques. Sagalowicz et coll. ont démontré qu'une EME permettait de retarder le relargage de composés aromatiques amphiphiles ou lipophiles en comparaison à une émulsion simple. La grande interface présente dans l'EME permet une meilleure rétention des composés aromatiques non hydrophiles [163]. Le limonène est une molécule aromatique très volatile et solubilisable dans les Isasomes. Il permet, comme vu précédemment, de moduler leur structure interne au travers du paramètre δ. Il est également largement utilisé comme modèle liposoluble dans les recherches globales concernant la rétention de molécules aromatiques [164-166]. Le limonène possède ainsi une double utilité, régulant les structures internes des Isasomes, tout en constituant une molécule modèle permettant de décrire les capacités de vectorisation des Isasomes. Il a été démontré que des phases cristal liquides possèdent une plus grande capacité à ralentir l'évaporation du limonène, en comparaison à des émulsions simples [167].

- Ces mésophases émulsifiées sont également utilisées comme nanoréacteurs. Certaines molécules hydrosolubles peuvent être enfermées dans les canaux d'eau des Isasomes (notamment des Hexosomes). Due à une élévation locale de la concentration de ces molécules, la limite de solubilité peut être atteinte et les molécules cristallisent alors à l'intérieur des mésophases [168]. Leurs interfaces et leurs quantités d'eau internalisées étant très importantes, les Isasomes sont des nanoréacteurs ayant de très forts potentiels [75,169-171].

Les perspectives d'utilisation de ces Isasomes sont telles que les industriels ont déjà largement brevetés les possibles formulations et applications des dispersions de monoglycérides. Les premiers brevets ont été déposés par les premiers scientifiques ayant découvert les mésophases de monoglycérides (Lund). Par la suite de nombreuses industries agroalimentaires se sont emparés du sujet et notamment Nestlé, Procter & Gamble, Kraft ou encore Eastman Chemical Company (Annexe I).

Cependant, les capacités de rétention des structures elles-mêmes ne seraient pas suffisantes pour conserver les principes actifs sur de longues durées. C'est pourquoi, des recherches ont

été initiées sur l'optimisation de l'interface, afin de réduire sa perméabilité et de minimiser la fuite des molécules d'intérêt vers la phase continue des émulsions.

III)- 2 – 3 – b Encapsulation

Afin d'améliorer la rétention de principes actifs, les chercheurs se sont intéressés à la structuration de l'interface des émulsions en général [172].
Ainsi, différentes hypothèses ont été testées, par exemple une meilleure couverture de l'interface par les émulsifiants, créer une coque solide à l'interface ou rendre l'intérieur des gouttelettes solide.

- Comme nous l'avons vu précédemment les émulsifiants couvrent plus ou moins bien l'interface en fonction de leur taille et de leur facteur de forme. Choisir un émulsifiant de faible poids moléculaire permet de créer une véritable couche protectrice à l'interface réduisant les échanges entre les milieux intérieur et extérieur [13]. Bezelgues et coll. ont ainsi montré que dans une mousse, une interface stabilisée par du SSL est 40 fois moins perméable à l'air qu'une interface stabilisée par des protéines sériques de lait (tableau II). Un film interfacial, stabilisé par des protéines, présente de nombreux trous rendant l'interface plus perméable. Au contraire, le coefficient de perméabilité d'une interface stabilisée par un émulsifiant à bas poids moléculaire (type SSL) est beaucoup plus faible du fait de la bonne couverture interfaciale.

Tableau 2 : Tension de surface et coefficient de perméabilité de solutions d'émulsifiants à 0,1%.

Le coefficient de perméabilité est calculé en fonction de la diminution du diamètre d'une bulle observée par microscopie optique, en fonction du temps [HN].

Emulsifiants	Tension de surface (mN/m)	Coefficient de perméabilité (cm/s)
WPI	49,5	0,04
Tween 80	39,5	0,08
Monoglycérides	28	0,001
SSL	22	0,001

De plus, cette couche d'émulsifiant à l'interface confère à l'émulsion une protection vis-à-vis des conditions physico-chimiques de la phase continue (pH, enzymes,…). Mc Clements et coll. ont ainsi montré qu'une émulsion stabilisée par du Tween 20 permettait de résister aux conditions gastriques alors que des émulsions stabilisées par des caséinates ou des protéines sériques sont sensibles aux enzymes salivaires [173].

- Un deuxième axe de recherche tente de créer une véritable barrière physique à l'interface. Plusieurs hypothèses sont testées pour y parvenir dont la polymérisation de molécules tensioactives à l'interface. La polymérisation de copolymères à blocs ou le mélange SDS-chitosan ont été testés et ont montré des aptitudes intéressantes [174-176]. L'utilisation de particules solides, comme la laponite, a été testée et notamment sur les Isasomes [60,177,178]. La cristallisation de lipides à l'interface est une voie prometteuse de couverture interfaciale. Le but n'étant plus de créer cette barrière par le biais des émulsifiants, mais de rajouter une couche externe de lipides cristallisés de type « cire » [179-183].

Toutes ces hypothèses permettant de réduire la fuite du matériel intra-gouttelette sont principalement testées sur des émulsions simples. Il serait donc intéressant de tester ces mêmes hypothèses sur les Isasomes, qui possèdent des capacités de rétention intrinsèque.

III)- 2 – 3 – c Inclusion

Les Isasomes sont de très bons réservoirs ou conteneurs, de principes actifs. Cependant leurs propriétés de relargage ne sont pas encore optimisées. C'est pourquoi leur inclusion dans une phase continue gélifiée permet de les figer et d'éviter le relargage du contenu des gouttelettes. Le gel, souvent thermosensible, se liquéfie dans des conditions prédéfinies, permettant la libération des Isasomes et de leur contenu à un endroit et un temps choisi [184].
Milosevic et coll. ont inclus les Isasomes dans un gel de carraghénanes additionné de nanoparticules magnétiques [185].

L'application d'un champ magnétique alternatif permet la mise en mouvement des nanoparticules magnétiques et la création d'un échauffement local autour d'elles.

Une fois la température de fusion du gélifiant atteinte, les carraghénanes se liquéfient et libèrent les Isasomes, qui relarguent leurs contenus [185-188]. La durée de vie des Isasomes peut donc être considérablement allongée tout en choisissant l'instant où les molécules hôtes seront relarguées.

III)- 2 – 3 – d Vectorisation

La définition de « vecteur » implique la solubilisation, le transport et le relargage des molécules hôtes. Les Isasomes sont capables de transporter à travers les milieux biologiques ou alimentaires et leurs capacités de relargage sont le fruit de nombreuses recherches [189].

- Compréhension des mécanismes d'interactions en milieux biologiques.

Les Isasomes ont encore peu été utilisés en médecine ou en pharmaceutique. Leurs comportements au sein du corps humain, et de ses milieux complexes sont encore peu étudiés [190]. Cependant, il semblerait que les Cubosomes soient une bonne alternative aux liposomes pour une délivrance intraveineuse. Même si les monoglycérides sont rapidement hydrolysés dans le plasma (57 % de perte après 30 minutes et 71 % après 2 heures) [191], les principes actifs vectorisés semblent avoir une plus longue rétention dans le plasma, en comparaison à d'autres vecteurs (liposomes).
Même avec une hydrolyse avancée, la structure cubique, très organisée, est longue à se désagréger, relarguant son contenu sur des temps plus longs. Il semblerait également que les HDL (High Density Lipoprotein) soient capables de détruire les Cubosomes.

Les Isasomes interagissent aisément avec les phospholipides des membranes plasmiques [192]. Ils ont tendance à intégrer la membrane plasmique par affinité de structure et de composition. Ils sont donc des vecteurs intéressant en biologie cellulaire. Cependant leurs structures ou leurs compositions, influencent leur affinité avec la membrane. Les phases cubiques semblent fusionner plus rapidement que les phases hexagonales.

Barauskas et coll. ont montré que l'utilisation, en tant que lipide structurant, de phytostérol en remplacement de monooléine, permettait de réduire la vitesse de mélange des Isasomes avec la membrane plasmique.

Outre l'importance de leurs influences sur la formation des Isasomes et leurs capacités de vectorisation, les émulsifiants possèdent différentes cytotoxicités intrinsèques. Ainsi, il apparaît que le remplacement du F127 par de la lauroylcholine permet de réduire considérablement la cytotoxicité des Isasomes.
En effet, sur différents types de cellules (3T3 : Fibroblastes, HeLa : cellules de carcinome épithélial ou HEK293T : cellule embryonnaire de rein), des Cubosomes stabilisés par du F127, possèdent une cytotoxicité importante (figure 30) [90].

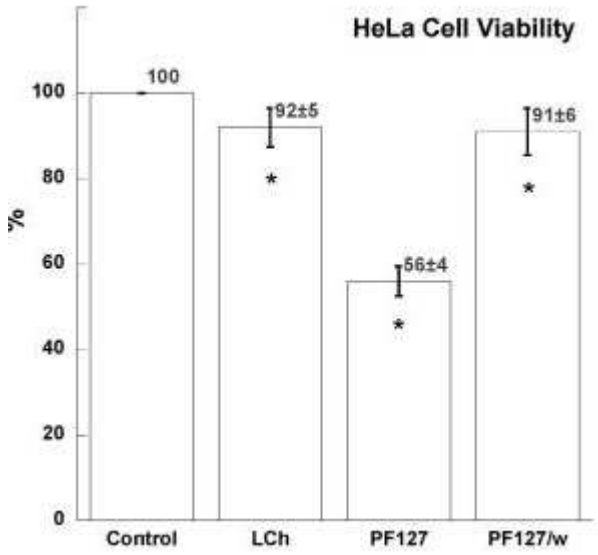


Figure 30 : Cytotoxicités sur les cellules Hela, d'Isasomes stabilisés par de la Lauroylcholine (LCh), du F127 (PF127) ou d'une solution simple de F127 dans de l'eau.
Test à l'Alamar blue, incubation d'1 heure.

Cependant, la mise en contact des cellules avec une solution de F127 n'induit que peu de diminution de la viabilité. C'est donc l'association de l'émulsifiant avec le Cubosome qui entraîne une cytotoxicité. En effet, le Cubosome possède une forte tendance à fusionner avec la membrane cellulaire. Il agit en réalité comme un cheval de Troie, en permettant au F127 de

passer la membrane cytoplasmique, qu'il ne serait pas capable de traverser seul. Ainsi, il se retrouve à l'intérieur du cytoplasme en des quantités létales pour les cellules.

- Association avec un principe actif – Exemple du Paclitaxel.

Les résultats encourageants des capacités des Isasomes à la solubilisation, au transport, au stockage et au relargage de principes actifs en font de prometteurs vecteurs thérapeutiques. Afin de comparer leurs capacités avec celles des vecteurs utilisés actuellement en pharmaceutique, nous avons choisi de nous intéresser à la vectorisation du Paclitaxel en culture cellulaire.

Le Paclitaxel est une molécule médicamenteuse utilisée pour son action sur les cellules cancéreuses. Cette molécule bloque la dépolymérisation des microtubules, inhibant la mitose [58,193]. Malgré son efficacité curative, le Paclitaxel possède une très faible solubilité aqueuse et un temps de demi-vie très court dans les milieux biologiques [194-196]. C'est pourquoi il fait l'objet de nombreuses recherches pour trouver un mode de vectorisation permettant de pallier à ces inconvénients. Il a notamment été ajouté à des nanoémulsions qui le solubilisent en plus grande quantité et sont capables, de par leur taille, de le transporter dans le sang. De plus, l'application d'ultrasons déstabilise les émulsions et augmente son relargage [197,198]. C'est pourquoi nous associerons les Isasomes à la vectorisation du Paclitaxel.

Synthèse et objectifs :

L'analyse de la littérature montre que les Isasomes ont été largement étudiés depuis plusieurs dizaines d'années. Les chercheurs ne se sont pourtant que peu intéressés aux variations de leur composition et de l'influence des paramètres de procédé de fabrication sur leur stabilité. Ceci est notamment vrai pour l'utilisation de l'émulsifiant F127, universellement utilisé pour la fabrication de ces particules. De plus, l'importance de la couverture interfaciale nous est semble t-il encore mal appréhendée, que ce soit sur la stabilité des structures ou de leurs capacités de vectorisation.

Cependant, ces auto-assemblages de monoglycéride (notamment de monolinoléine) émulsionnés ont un très fort potentiel de vectorisation de par leur capacité de solubilisation et de relargage de principes actifs. Leur fabrication et le contrôle de leur structure sont aujourd'hui bien définis dans la littérature. Même si leur caractérisation nécessite l'intervention de techniques lourdes (SAXS, cryo-TEM), ils semblent donc aisément utilisables en recherche applicative, notamment en biologie cellulaire, voire même en utilisation *in vivo*.

En effet, les caractérisations *in vitro*, des propriétés des différentes mésophases semblent indiquer une variation des capacités de solubilisation et de rétention. La phase hexagonale, avec ses canaux d'eau fermés sur eux-mêmes, semble posséder de meilleurs possibilités de rétention de principes actifs (notamment hydrosolubles). Les phases bicontinues des mésophases cubiques, en constant échange avec le milieu extérieur, ont tendance à relarguer les molécules hôtes de manière plus rapide. En contrepartie elles sont capables de solubiliser des quantités plus importantes. Il convient aujourd'hui de vérifier ses hypothèses dans des modèles biologiques.

Les objectifs de ce travail de doctorat sont multiples. Dans un premier temps nous observerons l'influence de chaque paramètre de fabrication sur les structures internes des émulsions et ce, pour une formulation dite « classique » contenant le F127, la monolinoléine et le R-(+)-Limonène.

Par la suite, nous décrirons l'influence de l'utilisation d'autres émulsifiants afin de fournir de nouveaux moyens de préparation des Isasomes et de les rendre aisément utilisables dans les domaines alimentaire, pharmaceutique, de la cosmétique ou de la parfumerie.

Suite à la caractérisation des formulations et des paramètres de fabrication, nous tenterons de décrire l'évolution du système lorsque des molécules hôtes de nature diverses sont intégrées. Nous étudierons le pouvoir de vectorisation des différentes structures en biologie cellulaire, en incluant une molécule anticancéreuse.

Enfin, nous aurons la volonté d'optimiser le relargage des molécules hôtes en modifiant/maîtrisant la perméabilité de l'interface.

Chapitre 2 :

Matériels et Méthodes

II) Préparation des Isasomes

I) – 1 Constituants

I)– 1 – 1 Monolinoléine et R-(+)-Limonène

Les Isasomes sont constitués d'un monoglycéride ayant des propriétés d'auto-assemblage, d'une huile permettant de modifier l'organisation interne de ces auto-assemblages et d'un émulsifiant permettant de stabiliser leurs dispersions.

Le monoglycéride utilisé lors de cette étude est la monolinoléine. Elle est composée d'un glycérol sur lequel est estérifié un acide linoléique contenant une chaîne carbonée de 18 carbones avec deux insaturations en position 9 et 12. La monolinoléine utilisée n'est pas pure et provient du Dimodan U (Danisco, Danemark), contenant 95 % de monoglycérides dont 66% de monolinoléine et 19 % de monooléine (décrite également comme molécule formant des auto-assemblages). Le Dimodan U a été gracieusement offert par le Centre de Recherche Nestlé. La composition en acides gras (après lipolyse) du Dimodan U est reportée dans le Tableau III.

Tableau III : Table de composition en acides gras du Dimodan U.

Nom de l'acide gras	Nomenclature normalisée	Quantité (%)
linoléique	C18-2	66
oléique	C18-1	19
palmitique	C16-0	8
stéarique	C18-0	5
arachidique	C20-0	< 2
myristique	C14-0	< 2

L’huile permettant de moduler l’organisation interne des Isasomes est le R-(+)-Limonène (Sigma-Aldrich, USA) (Figure 31). Ce monoterpène cyclique est largement présent dans les agrumes.

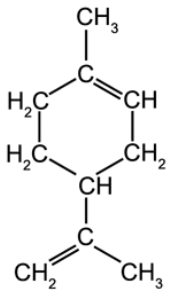


Figure 31 : Molécule de R-(+)-Limonène.

Cette molécule de faible masse moléculaire (136,2 Daltons), est purement liposoluble et permet de modifier l’organisation de la monolinoléine en s’intercalant entre ses chaînes aliphatiques. La courbure interfaciale imprimée par la monolinoléine dans les mésophases est ainsi modifiée. La concentration en R-(+)-Limonène nous permet de moduler la structure interne de nos Isasomes et d’obtenir toutes les structures à température ambiante.

I) – 1 –2 Émulsifiants

Divers émulsifiants ont été testés lors de cette étude. Plusieurs émulsifiants à haut poids moléculaire ont été utilisés comme le copolymère à blocs Pluronic F127 (BASF, Allemagne), des caséinates de sodium (Sigma-Aldrich, Allemagne), des isolats de protéines sériques laitières Prolacta 90 WPI (offerts par BBA Lactalis industrie), un polymère mêlant de l’acide acrylique, des esters d’acrylate et du steareth-20-méthacrylate, appelé Aculyne ou encore du polyéthylène-40-stéarate Tego acid S40P (Evonik, Allemagne). Des cires émulsifiantes ont été testées et gracieusement fournies par TH.C.TROMM (Allemagne) pour l’échantillon Carnico (compositions non connues) et par Koster Keunen (Pays-Bas) pour l’échantillon de cire pégylée PEG12-Carnauba.

Le Pluronic F127 (F127), est un co-polymère à blocs ayant une masse moléculaire moyenne de 12500 Da (Figure 32). C’est un copolymère triblocs composé d’un enchaînement de

polyoxypropylène (P) (partie lipophile), entouré de deux blocs de polyoxyéthylène (E) (parties hydrophiles), de formule générale $E_{106}P_{70}E_{106}$. C'est un émulsifiant non-ionique ayant un HLB d'environ 20 et permettant la stabilisation d'émulsions directes. Le F127 est également utilisé comme vecteur de molécules actives de par ses propriétés d'auto-assemblage pour une concentration supérieure à 0,7 % (w/v), concentration non atteinte au cours de cette étude.

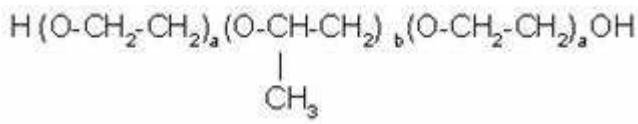


Figure 32 : Représentation schématique de la molécule de F127.
Avec a : motif polyoxyéthylène et b : motif polyoxypropylène.

Les protéines issues du lait (caséines et WPI) sont très utilisées comme émulsifiants ou agents moussants en alimentaire. Leur déploiement à l'interface leur permet de stabiliser stériquement et efficacement les émulsions directes.

Les cires émulsifiantes sont utilisées depuis peu en cosmétique. Elles allient le pouvoir émulsifiant à une augmentation de la viscosité, bénéfique à leur stabilité.
L'aculyne est un polymère complexe possédant des capacités émulsifiantes et rhéologiques. Elle est capable de former des réseaux moléculaires, permettant la stabilisation stérique des émulsions et possède de nombreux branchements hydrophiles (Figure 33).

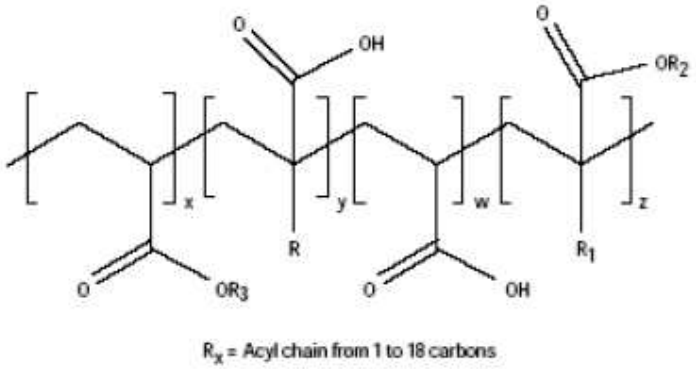


Figure 33 : Représentation schématique d'une molécule d'aculyne.

Des émulsifiants à bas poids moléculaire ont été gracieusement offerts comme le sucrose stéarate S-1670 (Figure 34) et le sucrose oléate OWA-1570 par Ryoto Sugar Ester (Mitsubishi International Food Ingredients, Japon), du Sodium Stéaroyl-Lactylate (SSL) Dermofeel SL (Figure 34) ou du polyglycérol-3-stéarate (PS) Dermofeel PS (DrStraetmans, Allemagne), de la lécithine de soja G1 (A&E Connock, Angleterre) ou du polysorbate 80 Tween 80 (Croda, Angleterre).

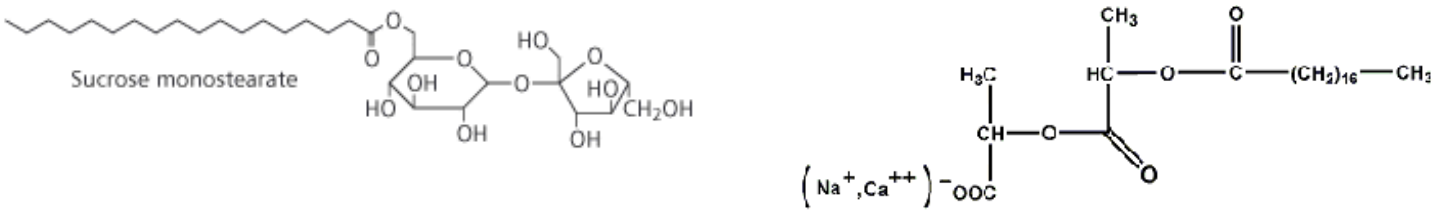


Figure 34 : Représentation schématique des molécules de Sucrose Stéarate S1670 (gauche) et de Sodium Stéaroyl-2-Lactylate SSL (droite).

I) – 1 –3 Molécules hôtes et cires.

- **<u>Molécules hôtes :</u>**

Nous avons voulu tester l'ajout d'un grand nombre de molécules hôtes à l'intérieur d'Hexosomes et de Cubosomes, afin d'observer leurs influences sur la structure. Nous avons ajouté ces molécules, à hauteur de 10% de la phase dispersée, à des Isasomes ayant un pourcentage de phase dispersée (φ) de 5%, et avec un pourcentage de 8% d'émulsifiant rapportée à la masse de phase dispersée (β), avec l'émulsifiant F127 et à δ85 (phase hexagonale) et δ100 (phase cubique). Les mesures des paramètres de maille ont été réalisées par SAXS, 8 jours après la fabrication des émulsions.

Ainsi, nous avons voulu tester des molécules d'intérêts de toutes solubilités, que ce soit dans les domaines de l'alimentation, de la parfumerie, de la cosmétique ou de la pharmacie. Sauf indications contraires, les molécules suivantes ont été fournies par Sigma Aldrich.

Ces molécules sont listées par domaine ci-dessous, même si dans la plupart des cas les molécules ont à la fois des propriétés organoleptiques et des activités biologiques d'intérêt :

Domaine alimentaire:

La vanilline et l'éthyl vanilline (KIC Chemical, USA) sont respectivement des arômes de vanille naturel et synthétique ayant une solubilité dans l'eau d'environ 10 g/L. D'autres arômes/épices alimentaires ont été ajoutés aux Isasomes comme le menthol ou la cardamome. Les vitamines sont généralement sensibles à la lumière ou à l'oxydation ; les Isasomes constituent alors une solution intéressante pour leur protection. Nous avons inclus dans les Isasomes les Vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), et A (acide rétinoïque). Une autre molécule antioxydante a été testée : le resvératrol ; un polyphénol du raisin. Nous avons également ajouté aux Isasomes de la chlorophylle cuivrique (Nactis-Sofral, France) et de la trioléine.

Pharmaceutique :

Nous avons principalement choisi des molécules anti-oxydantes présentes dans des aliments mais non autorisées comme additifs en alimentaire, comme la rutine, un flavonoïde naturel. Ces molécules font l'objet d'études sur leur effet protecteur contre certains cancers. L'Indole-3-Carbinol (I3C) et le 3,3' DiIndolylMethane (DIM) sont des molécules considérées comme ayant un effet protecteur contre le cancer et notamment celui du sein. Ce sont des molécules présentes naturellement en quantité importante dans les crucifères, elles sont liposolubles et donc difficilement vectorisables. Le TEMPO (2,2,6,6-TétraMéthyl Piperidine-1-Oxyl) est un radical nitroxyde stable qui est utilisé en RPE (Résonance Paramagnétique Électronique) comme sonde environnementale dans des systèmes de modèles biologiques.

Parfumerie – Cosmétique :

De nombreuses molécules aromatiques ayant des solubilités diverses ont été testées dans le cadre de cette étude. Le γ-nonalactone et le γ-décalactone (Aromor, France) sont des molécules aromatiques liposolubles donnant le goût et l'odeur, respectivement, de la noix de coco et de la pêche. Le thymol, le Camphre et l'eugénol (Alfa Aesar, USA) sont des

molécules extraites d'huiles essentielles de plantes et ont également une activité antioxydante. Le myrcène est un support aromatique couramment utilisé comme arôme de plantes vertes ou de champignons.

La diversité de molécules va nous permettre d'évaluer l'influence de la solubilité et de la composition de la molécule sur l'évolution de la structure interne des Isasomes.

- **Cires :**

Les cires sont des esters d'acides gras et d'alcools, se distinguant des huiles et des graisses par leur très haut point de fusion - supérieur à 50 °C. Elles sont utilisées généralement comme agent d'enrobage en alimentaire (bonbons, fruits) et dans d'autres domaines (papeterie, ébénisterie,…). Ces utilisations sont à l'image de leur utilité dans la nature comme film hydrophobe protecteur contre l'évaporation à la surface des feuilles. La formation de cette couche imperméabilisante a été testée en addition des Isasomes afin d'observer leur comportement à l'interface de ces nano-objets.
Nous avons choisi différents types de cires ayant différents points de fusion ; ces différences sont espérées comme ayant une influence sur la diversité de leurs tailles et de la forme des cristaux se formant à l'interface des Isasomes. Les trois cires utilisées ont été gracieusement fournies par Kahl Wax (Allemagne).
La cire d'abeille (référence Kahl Wax 8108) est produite par huit glandes sécrétrices placées sous l'abdomen des ouvrières. Sa plage de fusion est généralement comprise entre 62 et 65°C. Elle fait partie des cires ayant le plus bas point de fusion, la rendant plus malléable que les autres cires.
La cire de son de riz (RBW : Rice Bran Wax, référence 2811), est issue de la couche externe du riz (le son), généralement extraite de l'espèce *Oryza sativa*. Cette couche externe servant de barrière est riche en lipides. Sa température de fusion est d'environ 85-90 °C.
La cire de Carnauba (référence 2442K) possède un point de fusion d'environ 80-85 °C. Cette cire est issue des feuilles d'un arbre endémique du Brésil, le *Copernicia prunifera*. Elle est utilisée en cosmétique et en enrobage de certains bonbons afin de leur conférer un aspect brillant et une couche externe solide.

I) – 2 Protocole de fabrication des Isasomes.

La préparation des Isasomes s'effectue en trois étapes :

- **Préparation de la phase dispersée :**

Afin de fixer la structure interne sans molécule hôte, nous nous repérons dans le diagramme de phase par le mélange monolinoléine/limonène en utilisant le paramètre **δ**, représentant la quantité de lipide structurant dans la phase dispersée :

Formule 7 :

$$\delta = \frac{m_{\text{Dimodan U}}}{m_{\text{Dimodan U}} + m_{\text{R-(+)-Limonène}}} \times 100$$

D'où δ50 est un mélange équi-massique de Limonène et de Dimodan U et δ100 du Dimodan U pur.

Sauf indication contraire, les Isasomes ont été préparés pour une concentration de phase dispersée égale à 1 % du mélange total. Cette concentration de phase dispersée est exprimée par le paramètre **φ**.

Le Dimodan U est préalablement liquéfié à 65 °C, puis pesé dans un pilulier. Le limonène et les molécules hôtes sont ajoutées par la suite dans ce même conteneur.

- **Préparation de la phase continue :**

La phase continue est constituée d'eau et de l'émulsifiant préalablement dissous. La concentration en émulsifiant est exprimée par le paramètre **β** et est donnée en fonction de la phase dispersée dans la formule suivante:

Formule 8 :

$$\beta = \frac{m_{\text{Émulsifiant}}}{m_{\text{Dimodan U}} + m_{\text{R-(+)-Limonène}}}$$

Cas particuliers :

Les molécules hôtes à haut point de fusion (cires et cires émulsifiantes) font l'objet d'adaptation du protocole de fabrication des Isasomes. En effet, il est nécessaire de maintenir durant l'ensemble du protocole la température au-dessus de leur point de fusion. Les piluliers ainsi que la phase aqueuse sont donc préalablement chauffés et maintenus à température.

Le SSL a besoin d'être chauffé au-dessus de sa température de Krafft (5 minutes à 65 °C) afin d'être correctement hydraté. La solution est ensuite refroidie à température ambiante avant d'être utilisée.

- **Ultrasonication :**

Les deux phases sont ensuite additionnées et le mélange est soumis à des ultrasons (Vibracell, Fischer Bioblock, 20 Hz, à 20 % de sa puissance maximale – 500 W), afin de disperser les mésophases de monoglycérides. Les ultrasons sont utilisés en mode alternatif (1 seconde en marche et 1 seconde à l'arrêt) pour une durée d'exposition effective totale de 4 minutes (soit un run de 8 minutes). L'échantillon est ensuite stocké (sauf indication contraire) à température ambiante.

III) Caractérisation des Isasomes

II) – 1 Mesures de taille et de potentiel ζ

Les tailles et les potentiels zêta des émulsions ont été mesurés grâce à un Zêtasizer ZS90 (MALVERN, UK).

II) – 1 – 1 Mesure de la distribution en tailles des émulsions.

La mesure de taille des émulsions est basée sur le principe de la Diffusion Dynamique de la Lumière. Un laser de longueur d'onde 633 ηm (source Hélium-Néon) traverse la solution contenant l'émulsion. Sa diffusion à 90°C est analysée par des détecteurs mesurant les variations d'intensité dans le temps (Figure 35).

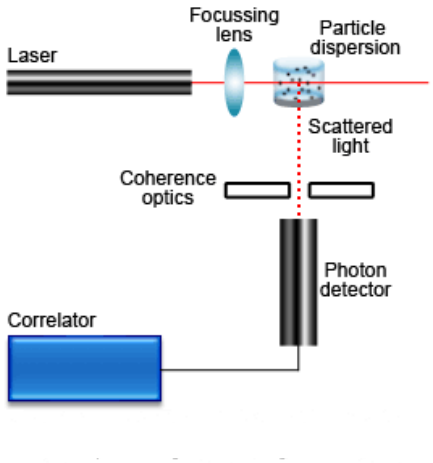


Figure 35 : Principe de fonctionnement du Zêtasizer ZS90 et de la Diffusion de lumière.

Ces variations sont directement corrélées à la taille des particules présentes dans cette solution. En effet, dans des conditions de température, de viscosité et de force ionique connues, les particules sont soumises au mouvement Brownien. Ce mouvement est plus ou moins important en fonction de la taille de la particule. Les particules de taille plus

importantes auront une plus faible mobilité que les petites ; elles diffuseront ainsi le rayon incident avec une intensité plus grande. Ces variations d'intensité sont captées par les détecteurs placés à 90° et transformées en coefficient de diffusion translationnel. Grâce à l'équation de Stokes-Einstein (formule 9) ce coefficient de diffusion translationnel est directement traduit en diamètre hydrodynamique.

Formule 9 :

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

avec **d(H)** : le diamètre hydrodynamique, **η** : la viscosité, **k** : la constante de Boltzmann, **D** : le coefficient de diffusion translationnel et **T** : la température.

Le diamètre hydrodynamique est la somme du diamètre physique de la particule et de la couche d'hydratation entourant la surface de la particule. L'épaisseur de cette couche d'hydratation est dépendante de la force ionique de la solution. Les particules sont ici considérées comme sphériques.

Afin d'obtenir des résultats reproductibles et comparables il est nécessaire de conserver trois paramètres fixes. La température, qui influe sur le mouvement brownien, a été fixée à 22 °C (température de la salle conditionnée). Les solutions préparées sont donc laissées au repos 10 minutes avant d'être analysées afin de stabiliser cette température et limiter la convection. La viscosité rentre en compte directement dans l'équation de Stokes-Einstein. Elle a été maintenue constante par l'utilisation d'eau comme solution de dissolution (dilution importante rendant non influente la viscosité de l'échantillon analysé) et par le maintien d'une température constante. La force ionique a été maintenue, selon les préconisations de la norme ISO 13321, grâce à une concentration de 10 mM de NaCl.

Après un temps d'équilibre de 10 minutes l'échantillon est analysé. La distribution de tailles est mesurée en intensité et la taille moyenne de l'émulsion a été définie par le mode moyen (appelé diamètre moyen), c'est-à-dire par la taille correspondant à la plus grande intensité mesurée. Ce diamètre moyen est calculé sur une moyenne de 5 mesures ; une mesure étant elle-même une sous-moyenne de 10 runs. Les écarts-types sont donc calculés sur l'ensemble des 5 mesures.

II) – 1 – 2 Mesure du potentiel zêta (ζ).

La mesure du potentiel ζ est basée sur le même principe de diffusion de lumière que la mesure de taille. En effet la vitesse de déplacement des particules est traduite en une charge de surface. Plus précisément, la solution contenant l'émulsion est placée dans une cuvette contenant deux électrodes. Lors de l'application d'un champ électrique les particules chargées vont donc migrer vers l'électrode de charge opposée. Cette migration, ce mouvement, aura un impact sur l'intensité du laser diffusé à 90°. Pour un champ électrique donné, la variation d'intensité diffusée à 90° sera directement proportionnelle à la vitesse de migration des particules et donc à leur charge de surface (potentiel ζ). Les particules de charge neutre seront immobiles dans le champ électrique.

Comme pour les mesures de tailles, après un temps d'équilibre de 10 minutes, le potentiel ζ (exprimé en mV) est la moyenne de 5 mesures. Il est à noter qu'un temps d'attente de 1 minute est effectué entre chacune des 5 mesures, afin de permettre aux particules de ce re-disperser dans le volume de liquide. En effet, sous l'effet du champ électrique les particules chargées auront tendance à quitter le volume du liquide pour venir se fixer sur les électrodes. Les particules ayant un potentiel ζ négatif auront une charge de surface négative et les particules neutres auront un potentiel ζ de 0. La température, la viscosité et la force ionique sont normalisées de la même manière que lors d'une mesure de tailles.

II) – 2 Mesures de cryo-Microscopie Électronique en Transmission (cryo-MET).

La microscopie en transmission est moins représentative de la globalité de l'échantillon en comparaison en la caractérisation par SAXS, car elle sélectionne (de par la méthode d'échantillonnage) une certaine gamme de taille du matériel à observer. Cependant elle permet d'étudier précisément des particules ou des régions de mésophases.

La cryo-MET est basée sur le même principe que la microscopie optique. Le faisceau de photons est remplacé par un faisceau d'électrons ayant une longueur d'onde plus faible, et donc une meilleure résolution. Cela nécessite d'avoir un environnement exempt de matière et donc un vide poussé.

L'objectif est de visualiser la variabilité des interactions entre la matière et un faisceau d'électron, il est donc nécessaire que l'épaisseur de l'échantillon soit la plus faible possible pour qu'il soit le plus transparent possible aux électrons (typiquement de l'ordre de 100 ηm). En effet, c'est le faisceau transmis, non impacté par l'échantillon, qui est visualisé. Ainsi, un fin film de solution à analyser est déposé sur une grille d'observation métallique recouverte de carbone. Ces grilles sont totalement imperméables aux électrons et permettent donc de les différencier de l'échantillon. L'observation en MET réside en la visualisation des contrastes liés à l'épaisseur de film, à sa densité et à sa composition. Dans le cas des Isasomes, constitués de couches de lipides et d'eau, le contraste sera dû aux différentes opacités de ces deux constituants. L'eau est transparente aux électrons et apparaîtra sur les clichés en blanc alors que les lipides et autres matières organiques apparaîtront en différents niveaux de gris voire de noir en fonction de leur opacité au faisceau électronique.

Celui-ci traverse l'échantillon et est projeté sur un détecteur (caméra CCD ou plaque photo-argentique). Il s'agit donc d'une image en deux dimensions de l'échantillon observé. La MET permet d'obtenir une très bonne résolution (2-3 ηm), mais entraîne des biais dans la sélection des échantillons (la taille des particules est limitée par l'épaisseur du film sur la grille) ainsi que la projection de 3 dimensions en 2. Cependant, il est désormais possible d'imprimer une rotation à l'échantillon dans la chambre de mesure et d'effectuer par la suite une reconstruction en trois dimensions de l'échantillon [199]. Grâce à une analyse par transformée de Fourier, la microscopie électronique à transmission permet également de déterminer les symétries structurelles à l'intérieur des gouttelettes. Des diffractogrammes de faisceau d'électrons permettent d'identifier les assemblages périodiques présents dans les mésophases émulsifiées [103]. Cette technique n'est donc plus seulement une méthode d'observation des particules mais bien un moyen descriptif des structures [200].

Une partie des mesures de cryo-microscopie se sont déroulées au sein du Laboratoire de Physique du Solide (LPS d'Orsay), dans le cadre du réseau METSA. Les mesures concernaient l'ajout de perfluorohexane aux Isasomes. L'appareil est un Jeol 2011-UHR, ayant une source de LaB_6 (hexaborure de lanthane) de 200 kV. Les clichés d'échantillons sont réalisés par une caméra CCD Orius Gatan en développement argentique. Cette méthode de

prise de vue ne permet pas d'obtenir des clichés en instantanée, mais doivent être développés. Les photographies sont donc prises « en aveugle » avec un temps d'exposition de 1 seconde. La solution d'Isasomes est déposée sur la grille, qui est directement plongée dans de l'azote liquide afin de figer l'échantillon. La grille est ensuite stockée dans l'azote liquide avant analyse.

La plus grande partie des expériences cryo-MET, se sont déroulées au Centre de Recherche Nestlé de Lausanne. Une chambre de préparation d'échantillon est maintenue à 25 °C et un taux d'humidité proche de 100%. A l'intérieur de cette chambre, une grille de cuivre, recouverte de carbone, est disposée puis recouverte par 5 µL de solution. La grille est ensuite rapidement plongée dans de l'éthane liquide à –170 °C. Les grilles sont ensuite stockées dans de l'azote liquide avant d'être placées dans le porteur d'échantillon Gatan 626DH (Pleasanton, USA) et conservées à –180 °C. Le microscope utilisé est un Philips CM12 TEM (Philips, Pays-Bas) avec une tension de 80 kV et utilisé en mode faible dose, afin de préserver l'échantillon. L'image est ensuite analysée par une caméra digitale Gatan slow scan 794 (Pleasanton, USA).

II) – 3 Mesures de Diffusion des Rayons X aux Petits Angles.

La diffusion des rayons X aux petits angles, abrégée SAXS (pour Small-Angle X Ray Scattering), consiste en l'exposition d'un échantillon à un faisceau de rayons X. Lorsqu'il rentre en interaction avec la matière, une partie de ce rayon est diffusé, par les éléments de matière, dans toutes les directions de l'espace. Ceci est particulièrement intéressant dans le cadre des rayons X, qui, de part leur longueur d'onde, sont de l'ordre de grandeur des distances inter-atomiques. Ainsi, si le système traversé est organisé, comme un réseau cristallin ou des auto-assemblages par exemple, le faisceau se trouve diffracté (interférences constructives) selon des angles préférentiels qui peuvent être rapportés directement aux types de structures exposées. Cette méthode de caractérisation est donc particulièrement indiquée pour l'analyse des Isasomes. Il est à noter que l'utilisation de la diffusion des neutrons aux petits angles est également possible, moyennant l'utilisation d'un agent de contraste permettant de distinguer l'eau de l'huile (par utilisation d'eau lourde par exemple) [201].

Les rayons X sont un rayonnement électromagnétique compris entre les longueurs d'ondes de 10^{-7} et 10^{-11} m, mais les rayons X « doux » compris entre 10^{-8} et 10^{-10} m sont principalement utilisés pour l'analyse de la matière molle (ce qui correspond à des énergies de l'ordre de 0,1 à 10 keV). Lorsqu'un rayonnement incident diffuse dans un milieu, il rentre en interaction avec la matière et chaque élément du volume diffuse une partie de ce faisceau incident dans toutes les directions de l'espace. Les photons diffusés par l'échantillon sont comptabilisés sur un détecteur.

Les rayons X rentrent en interaction avec les électrons des atomes qu'ils traversent. La diffusion peut être de deux ordres, élastique ou inélastique. La diffusion élastique correspond à une diffusion sans changement de longueur d'onde par rapport au faisceau incident ainsi qu'une absence d'échange d'énergie entre les photons du faisceau et les électrons de la matière traversée [202,203]. Ceci étant vrai, les modules des vecteurs d'onde incident et diffusé sont égaux, d'où :

Formule 10 : $$|\vec{k_i}| = |\vec{k_d}| = 2\pi n / \lambda$$

Avec $\mathbf{k_i}$ et $\mathbf{k_d}$, respectivement, les vecteurs d'onde incident et diffusé, **n** l'indice du milieu et **λ** la longueur d'onde du faisceau dans le vide.

L'intensité diffusée dans une direction donnée est définie par le vecteur d'onde de transfert **q** appelé également vecteur de diffusion (Figure 36) :

Formule 11 : $$\mathbf{q = k_i - k_d}$$

d'où l'expression de q en fonction de l'angle de diffusion θ,

Formule 12 : $$|q| = (4\pi n/\lambda) \,.\, \sin\theta/2$$

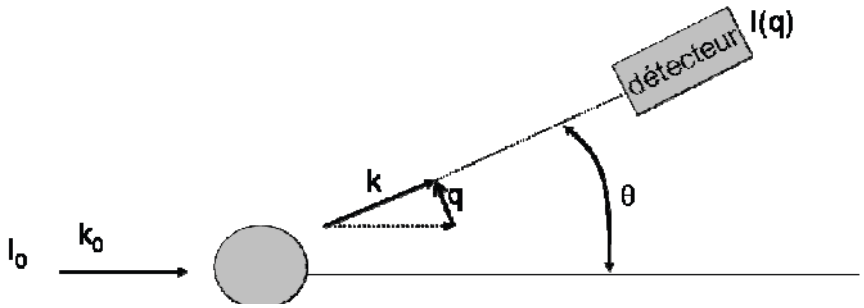


Figure 36 : Schéma de principe de la diffusion élastique des rayons X aux petits angles.
Avec I_0 l'intensité du rayon incident, k_0 le vecteur d'onde incident, k le vecteur d'onde diffusé et I(q) l'intensité du faisceau diffusé.

Dans le cas des mésophases, nous nous intéressons à une gamme de q permettant d'obtenir le facteur de structure de la mésophase, c'est-à-dire une gamme de q intermédiaire aux très petits angles et à la diffraction des rayons X. La figure 37, représente schématiquement les différentes échelles de mesures possibles avec la diffusion aux petits angles. Trois domaines de tailles peuvent ainsi être exploités.

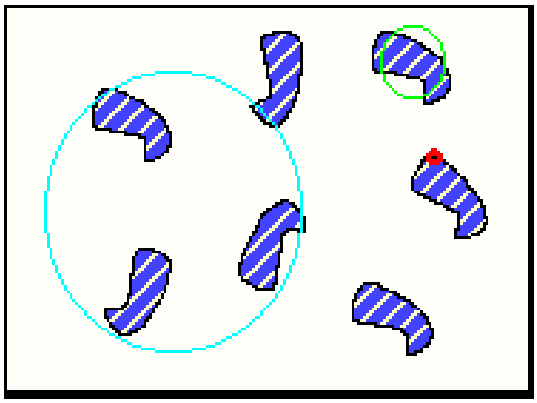


Figure 37 : Représentation schématique des différentes échelles de mesures de la diffusion aux Rayons X.
En rouge est représentée la gamme de grands q, en vert la gamme de q intermédiaire et en bleu la gamme de petits q.

Ces trois domaines du vecteur de diffusion vont permettre d'obtenir 3 échelles de description des particules observées.

La structure de la mésophase va induire des pics de diffraction dans l'intensité diffusée en fonction de q. La position de ces pics est déterminée par le groupe d'espace associé à la structure. Leur intensité sera ainsi modulée par le facteur de forme de la particule.
Il est ainsi possible de déterminer les paramètres de maille de différentes mésophases. Les paramètres de maille des phases hexagonales et cubiques sont déterminés par la position relative des pics de diffusion sur le spectre de diffusion des rayons X, qui correspondent aux plans de Miller (indices *h k l*). La distance entre deux plans « *d* » est définie comme étant :

Formule 13 : $d_{hkl} = 2\pi n / q_{hkl}$

Grâce à cette égalité on peut déterminer le paramètre de maille « *a* » des différentes mésophases selon la table suivante :

Tableau IV : Correspondance des symétries des mésophases de monoglycérides et des rapports des pics de diffusion aux rayons X.

Symétrie	$(a/d)^2$
L_α	$(1, 2, 3, \ldots)^2$
Ia3d	6, 8, 14, 16, 20, 22, 24, 26, . . .
Im3m	2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, . . .
Pm3n	2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, . . .
Pn3m	2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, . . .
Fd3m	3, 8, 11, 12, 16, 19, 24, 27, . . .
H_2	$\left(\sqrt{2}/3\right)$ (1, 3, 4, 7, 9, . . .)

Il existe deux types de sources pour la mesure de diffusion de rayons X aux petits angles, les tubes à rayons X et le rayonnement synchrotron. Les appareils de laboratoires sont principalement composés d'une anode tournante, généralement en Cuivre, bombardée par un flux d'électrons. L'anode renvoie l'énergie reçue sous forme de chaleur (99%) et de rayons X. La puissance de ces appareils reste limitée et il est nécessaire d'avoir un temps d'exposition important.
Afin d'obtenir de très fortes intensités de faisceau, il est intéressant d'utiliser les sources de lumières produites par les synchrotrons. Des électrons sont accélérés, par un champ

magnétique intense, dans un anneau de stockage (de plusieurs centaines de mètres de circonférence) où la trajectoire des électrons est régie par des aimants de courbure. La courbure de leur trajectoire, et donc leur accélération, provoque la génération d'une onde électromagnétique : le rayonnement synchrotron. Ce rayonnement de photons possède un spectre large pouvant s'étendre de l'infrarouge aux rayons X. Cette lumière traverse un monochromateur qui sélectionne la longueur d'onde désirée. Le faisceau de rayons X obtenu est très puissant et très fin, permettant l'analyse de distance caractéristique d'environ 0,1 Å. Les synchrotrons permettent ainsi l'accès à un rayonnement très intense, très fin et de très bonne résolution. C'est une méthode qui nécessite l'utilisation d'un faible volume d'échantillon avec des temps d'exposition très faible. Cependant, il est nécessaire de tenir compte de la décroissance de l'intensité du faisceau, dépendante des injections de lumière à partir de l'anneau de stockage.

Nous avons eu accès à différents types de rayonnement pour la caractérisation de nos échantillons, sur cinq installations différentes :

- LPEC Le Mans

Nous avons eu la possibilité d'utiliser un appareil à Diffusion de rayons X du Laboratoire de Physique de l'État Condensé (LPEC, Le Mans) de marque Rigaku (Japon). La source de rayons X est une anode tournante Rigaku UltraX18 en cuivre pouvant tourner à 6000tours/min. Le faisceau possède un flux de 10^7 photons/s sur 300 µm², analysé par un détecteur Gabriel 2D de 12x12 cm². Le faisceau de rayons X a une longueur d'onde de 0,154ηm. La gamme de vecteur de diffusion a été définie entre 0,1 et 5 ηm^{-1}. Le temps d'exposition des échantillons a été de 10000 secondes.
Le principe de l'appareil est basé sur la forte tension appliquée entre les deux électrodes. Les électrons sont alors attirés vers l'anode qui, suite à l'impact, sont réfléchis par l'anode sous un flux de rayons X. Le faisceau traverse l'échantillon et est analysé par le détecteur. Les échantillons sont préparés dans des capillaires scellés de borosilicate (Hilgenberg, Allemagne) de 1,5 mm de diamètre. Les courbes de diffusion collectées ont été corrigées en tenant compte de la transmission du milieu (eau), de l'épaisseur traversée (capillaire) ainsi que du bruit de fond de l'appareil.

Nous avons également eu accès à quatre rayonnements synchrotrons. Le principe est le même qu'un appareil de laboratoire, seule la production des rayons X varie. Dans un anneau de grande circonférence, sont stockés des électrons à une vitesse très proche de celle de la lumière. Dans cet anneau, le faisceau d'électrons suit un mouvement rectiligne uniforme dans les sections droites et un mouvement curviligne dans les sections courbes où les électrons sont accélérés par des aimants de courbure. Grâce à cette accélération, le faisceau émet un spectre large de rayonnements continus dont l'énergie est directement rapportée aux champs magnétiques des aimants et aux rayons de courbure. Les longueurs d'ondes désirées sont ensuite choisies par un sélecteur. Ce type de rayonnement est donc beaucoup plus brillant qu'une source de laboratoire, c'est-à-dire que l'intensité est plus importante et que le rayon est plus focalisé. Ces grands appareils permettent ainsi de meilleures résolutions et des temps de mesures beaucoup plus courts (de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes). Il est à noter que le calibrage de ces lignes est effectué principalement avec du béhénate d'argent.

- **Synchrotron DELTA (Dortmund ElecTron Accelerator) – Dortmund, Allemagne**

DELTA est un synchrotron de 3ème génération produisant un faisceau de 1,5 GeV. Nous avons pu utiliser la ligne BL9 avec une énergie de 10 keV avec un flux de 5.10^9 photons/s. La longueur d'onde du faisceau de rayons X est de 0,124 ηm et la gamme de q disponible a été fixée entre 0,3 et 3,5 $ηm^{-1}$. Le temps d'exposition a été déterminé à 600 secondes et le faisceau diffusé, a été analysé par un détecteur MAR345.
Le synchrotron dispose de cuves adaptées à la ligne, ayant l'avantage d'avoir un trajet optique de 5 mm, permettant de diminuer le temps d'exposition.

- **Synchrotron HASYLAB (HAmburger SYnchrotronstrahlungsLAbor) Hambourg, Allemagne**

Nous avons eu accès à la partie DORIS II (DOuble RIng Store) de 2ème génération et plus particulièrement la ligne A2. Le faisceau de rayons X possède une énergie de 8 keV avec un flux de 10^9 photons/s. La longueur d'onde a été fixée à 0,150 ηm, et la gamme de q observée est de 0,2 à 2,5 $ηm^{-1}$. Les échantillons ont été placés dans des capillaires de 1,5 mm de

diamètre. Le faisceau diffusé a été analysé par un détecteur MAR165. Le temps d'exposition a été de 800 secondes.

- **Synchrotron MAX-lab (National electron accelerator laboratory for synchrotron radiation research) Lund, Suède**

Nous avons eu accès à la ligne I711 de l'anneau de stockage de 3ème génération MAX II. L'énergie du faisceau a été fixée à 10 keV pour un flux de 10^{11} photons/s. La longueur d'onde utilisée était de 0,150 ηm et la gamme de q est comprise entre 0,1 et 3 $ηm^{-1}$. Les échantillons ont été placés dans des capillaires de 1,5 mm de diamètre. Le faisceau diffusé a été analysé par un détecteur MAR165. Le temps d'exposition a été de 500 secondes.

- **Synchrotron ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) Grenoble, France**

Nous avons eu accès à la ligne française CRG D2AM BM02. L'énergie du faisceau a été fixée à 10 keV et à une longueur d'onde de 0,150 ηm. La gamme de q observée était comprise entre 0,1 et 3 $ηm^{-1}$. Les échantillons ont été placés dans des capillaires de 2 mm de diamètre. Le faisceau diffusé a été analysé par un détecteur une caméra Princeton Instruments SCX90-1300 (Roper Scientific, USA). Le temps d'exposition a été fixé à 500 secondes.

Les conditions opératoires (δ, φ, β, âge de l'émulsion,…) spécifiques à chaque expérience seront détaillées dans les Chapitres 3 et 4.

II) – 4 Mesures FTIR

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) est une technique spectroscopique d'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon à analyser. Le domaine infrarouge compris entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules. Ainsi, pour un faisceau de longueur d'onde correspondante à l'énergie de vibration d'une liaison inter-atomique, son rayonnement sera absorbé par celle-ci et son intensité diminuera. Le balayage d'un échantillon sur un domaine infrarouge, fournira un spectre d'absorption du faisceau correspondant aux modes de vibrations des liaisons constitutives de la molécule.

Un appareil FTIR – ATR (Réflexion Totale Atténuée) a été utilisé afin de suivre la disparition du R-(+)-Limonène des Isasomes. Les solutions sont déposées sur un cristal de Germanium. La présence du R-(+)-Limonène est observée par FTIR grâce à la présence de trois pics caractéristiques, à 1644 cm^{-1} pour la vibration de la liaison C=C, à 1436 cm^{-1} pour la liaison CH_2 du cycle et à 886 cm^{-1} pour la vibration de la liaison C-H du groupe méthyle terminal hors plan [204,205].
C'est cette dernière liaison qui sera suivie comme étant le marqueur de la présence du R-(+)-Limonène, car elle ne rentre pas en compétition avec les autres pics des spectres IR des autres composants des Isasomes. De plus, l'aire de son pic est aisément isolable. En effet, l'aire du pic a été suivie au cours du temps afin de rendre compte de l'évaporation de la molécule. L'aire du pic a été calculée pour chaque spectre entre 877 cm^{-1} et 898 cm^{-1}.
Le même volume de 100 µL de solution a été déposé sur le cristal en essayant de conserver la même épaisseur de liquide pour chaque mesure. L'aire du pic a été déterminée après une moyenne de 5 mesures à partir d'un nouveau volume de solution, déterminant un écart type moyen de 15%.

II) – 5 Mesures RMN

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), est basée sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. En effet, la charge des noyaux en rotation autour de son axe, lui confère des caractéristiques de dipôle magnétique. Le moment magnétique caractérise l'importance de ce dipôle.

Dans un champ magnétique uniforme le noyau peut adopter différentes orientations appelées nombre de spin I. Nous nous limiterons à l'analyse RMN du proton, de nombre de spin I égal à 1/2. Dans un champ magnétique uniforme, le noyau du proton peut donc adopter différents niveaux d'énergie ; l'une de basse énergie si le moment magnétique est parallèle et dans le même sens que celui-ci et l'autre de plus haute énergie si le sens est contraire. Lorsqu'il y a transition entre ces deux niveaux, on dit qu'il y a résonance. C'est ce phénomène qui est mesuré après une succession d'excitation/relaxation induite par un champ magnétique uniforme extérieur.

Afin de pouvoir interpréter quantitativement les évolutions de concentration, le TétraMéthylSilane (TMS) a été pris comme référence. Le pic du TMS constitue l'origine de l'échelle de mesure. L'échelle de mesure a pour unité le ppm (parties par million) qui correspond au déplacement chimique par rapport au TMS, c'est-à-dire à l'écart entre la valeur du champ pour lequel le noyau analysé résonne.

Nous avons utilisé un instrument de mesure Bruker 250, 132 MHz (Allemagne), de l'ICOA. La première étape a été de mesurer l'influence d'une sonication de 8 minutes sur une solution de limonène seul (dans un solvant de chloroforme deutéré $CDCl_3$) afin de vérifier que cette étape n'endommage pas la molécule. Nous avons donc réalisé des spectres avant et après le traitement ultrasons, ainsi qu'après un stockage de 15 jours à 4 ou 25 °C.

La deuxième étape a consisté en la détermination des pics caractéristiques du limonène en émulsion. Nous avons donc comparé les spectres du limonène (solvant $CDCl_3$) et de la monolinoléine dans le solvant DMSO afin de choisir les pics les plus discriminants.

Une fois ces pics caractéristiques déterminés, nous avons suivi l'évolution de leurs intensités au cours du stockage durant 15 jours à 4 et 25 °C, d'Isasomes à δ50. Ces intensités décrivent la quantité de limonène présente dans les Isasomes

II) – 6 Biologie

Les Isasomes ont été testés comme possibles vecteurs de molécules médicamenteuses via une collaboration avec le Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) d'Orléans. Nous avons voulu comparer l'efficacité de vectorisation des phases hexagonales et cubiques préparées grâce à trois surfactants : le copolymère triblocs F127, le sucrose stéarate (S1670) et la cire pégylée (PEG12). Nous avons alors comparé l'efficacité du couple phase émulsionnée et couverture interfaciale. Il est à noter que tous les Isasomes utilisés pour les expériences en biologie cellulaire étaient utilisés dans les 10 jours après fabrication. Nous pouvons ainsi garantir que les échantillons à δ70 et δ100 sont respectivement des Hexosomes et des Cubosomes bicontinus.

II) – 6 – 1 Culture cellulaire

Nous avons testé l'efficacité de nos vecteurs, sur des cellules U87MG, qui sont des cellules humaines de glioblastome. Il s'agit de cellules cancéreuses malignes du cerveau couramment utilisées comme cellules références lors de tests d'efficacité de nouveaux traitements anticancéreux. En effet, elles sont extrêmement résistantes aux traitements chimiques.
Elles ont été cultivées à 37 °C dans une ambiance avec 5 % de dioxyde de carbone. Elles ont été repiquées tous les 4 jours, à raison de 5.10^5 cellules/mL dans un volume de 25 mL de milieu de culture. Les cultures de cellules ont été effectuées sur un milieu minimum essentiel (Minimum Essential Medium MEM) Earl's Salts avec addition de 10 % de Sérum de Veau Fœtal, 1 % de Pénicilline-Streptomycine et 1 % d'acides aminés non essentiels.

II) – 6 – 2 Stabilité des Isasomes et Toxicité.

La stabilité des Isasomes avec ajout de sérum est primordiale afin de valider leur utilisation en addition d'un milieu de culture. Nous avons vérifié la stabilité des Isasomes préparés avec le F127 et le S1670, par SAXS, en les mélangeant à 50 % avec le milieu de culture cellulaire.

Les émulsions étaient préparées à φ=1 %, β=8 %, à δ70 et δ100 et mesurées 10 minutes, 24 et 48 heures après injection du sérum.

Cette même stabilité a été évaluée par une méthode biologique. Nous avons ajouté du Nile Red (Sigma Aldrich, USA) aux Isasomes. Il s'agit d'un colorant totalement liposoluble, largement utilisé en biologie pour la visualisation des lipides intracellulaires [206]. Nous avons donc chargé les Isasomes en Nile Red afin de suivre sa rétention. En effet, le Nile Red s'oxyde aisément s'il n'est pas protégé. Contenu dans les Isasomes, le Nile Red peut être observé par fluorescence. Nous avons ajouté du Nile Red à hauteur de 0,01 % de la phase dispersée, dans des Hexosomes et Cubosomes, préparés à l'aide de F127, S1670 et PEG12 (φ=1 %, β=8 %). L'intensité de fluorescence du Nile Red a été mesurée après 1 et 15 jours de stockage. La fluorescence du Nile Red est obtenue avec une longueur d'onde d'excitation de 550 ηm et l'analyse d'un spectre d'émission contenu entre 560 et 730 ηm avec un maximum à 624 ηm, utilisé comme valeur de mesure.

La toxicité sur la lignée U87MG des Isasomes seuls a été mesurée pour les émulsifiants F127, S1670 et PEG12. Pour cela nous avons utilisé le test de cytotoxicité à l'Alamar Blue (Promega, USA), qui est un indicateur coloré d'oxydo-réduction.
Dans une microplaque sont déposées 10^4 cellules dans chaque puits et sont ensuite incubées 2h à 37 °C avec ajout des Isasomes (φ=1 %, β=8 %) pour une dilution finale de 1/125, 1/250 et 1/500. Après ces 2 heures, le milieu de culture est renouvelé avant une incubation de 24 heures à 37 °C. Le réactif Alamar blue est alors ajouté à 10 % du volume du milieu de culture et laissé 4h à 37 °C. La fluorescence est ensuite mesurée à une longueur d'onde de 605 ηm pour une longueur d'onde excitatrice de 560 ηm.

II) – 6 – 3 Internalisation et localisation cellulaire.

Nous avons voulu visualiser l'internalisation des Isasomes par les cellules U87MG. Afin d'y parvenir, nous avons recouru à la technique de cytométrie en flux. Des Hexosomes et Cubosomes sont préparés avec du F127, S1670 et PEG12 (φ=1 %, β=8 %) et additionnés pour 0,01 % de la phase dispersée de Nile Red. Trois dilutions de ces Isasomes ont été testées, à

savoir des dilutions à 1/100, 1/250 et 1/500. Ces Isasomes sont incubés 1h à 37 °C en compagnie des cellules. Celles-ci sont ensuite décollées grâce à l'ajout de trypsine et centrifugées 5 minutes à 1500 rpm. Les culots cellulaires sont repris dans 400 µL de Tampon Phosphate salin (PBS) 1X et incubés avec du bleu de trypan. Ce colorant est utilisé pour la numération de la viabilité cellulaire. En effet, cette molécule n'est pas capable de traverser une membrane cellulaire saine. Le bleu de trypan colore ainsi les cellules mortes. Nous avons utilisé ce colorant pour « éteindre » la fluorescence due aux Isasomes non incorporés dans les cellules saines, c'est-à-dire ceux présents seuls dans le milieu de culture ou associés à la membrane plasmique mais non internalisés. L'intensité de fluorescence du Nile Red mesurée sera uniquement celle due à l'internalisation des Isasomes. Elle a été mesurée par un cytomètre en flux FACSort (Becton et Dickinson, USA).

La cytométrie en flux est une technique permettant de caractériser des cellules isolées de manière quantitative et qualitative. En effet, les cellules sont entraînées dans un fin capillaire par un liquide porteur à haut débit. Les cellules sont ainsi isolées les unes des autres et traversent, à l'intérieur du capillaire, un rayon laser. Dans le cadre d'une mesure de fluorescence du Nile Red la longueur d'onde du laser a été fixée à 488 ηm. L'intensité de fluorescence du Nile Red endocyté dans chaque cellule est alors mesurée et est directement reliée à sa concentration à l'intérieur de ces cellules. Nous avons ainsi mesuré l'évolution de l'intensité de fluorescence du Nile Red en fonction de la concentration en Isasomes ; puis pour une dilution au 1/250, nous avons observé son évolution en fonction de différents temps d'incubation (30, 60, 120 et 180 minutes).

Afin de vérifier cette bonne internalisation nous avons effectué une mesure de fluorescence par microscopie confocale. Nous avons utilisé un microscope inversé Axiovert 200M (Zeiss, Allemagne), équipé d'un objectif plan Apochromat 63X (Zeiss) et d'une platine chauffante, maintenue à 37 °C. Les images sont acquises par un LSM 510 Meta (Zeiss) et sont traitées par le logiciel LSM Image Browser. La résolution des images a été fixée à 512x512 pixels, chaque pixel ayant une surface de 0,28x0,28 µm².

La différence avec un microscope optique classique réside en sa capacité à focaliser le faisceau de lumière incident monochromatique, ici un laser. La microscopie confocale permet de réaliser des images appelées « sections optiques », à différentes profondeurs de l'échantillon (environ tous les 400 ηm). Leur addition permet de reconstruire une image en 3D de l'objet observé. Comme le montre la figure 38, la microscopie confocale permet de localiser les éléments constitutifs d'une cellule, en ajoutant des chromophores adaptés à chaque type d'organites.

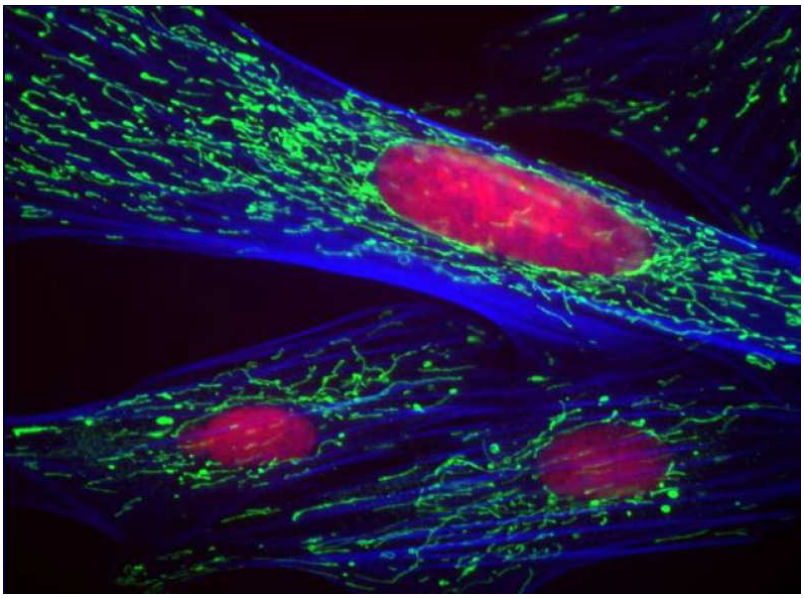


Figure 38 : Image de microscopie confocale de fibroblastes de cerf.

En bleu, le réseau d'actines (colorant phalloïdine-AF350) ; en vert les mitochondries (AbI et AbII couplés à un AF500) ; en rouge le noyau (TROPRO3). Image de Bruno Saubamea, du Service commun d'Imagerie Cellulaire et Moléculaire de l'Université Paris Descartes.

Pour nos travaux, cette technique nous permet de vérifier que les Isasomes sont bien endocytés par les cellules et non accrochés à la membrane cellulaire et ceci grâce à la collecte de la mesure de la fluorescence émise par le Nile Red en réponse à son illumination par le laser.

Cette mesure a été effectuée avec une solution d'Hexosomes préparés avec du S1670 (φ=1 %, β=8 %) à une dilution au 1/250.

II) – 6 – 4 Vectorisation du Paclitaxel et différentiation cellulaire.

Le Paclitaxel (Figure 39) est une molécule ayant des propriétés anticancéreuses, communément utilisée dans le traitement de certains cancers et notamment celui du poumon. Généralement, administré par intraveineuse, il souffre d'une faible solubilité et possède un temps de demi-vie court (3,5 heures).

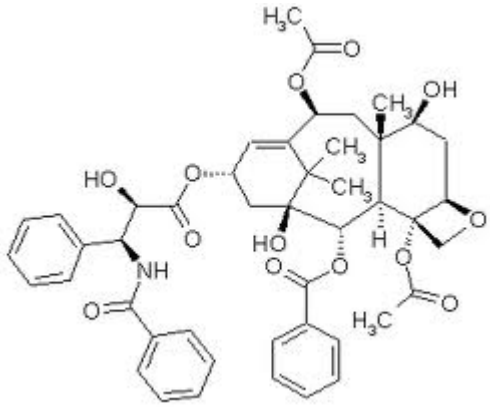


Figure 39 : Représentation d'une molécule de Paclitaxel.

Nous avons donc inclus du Paclitaxel dans des Hexosomes et Cubosomes préparés avec du F127 et S1670 (φ=1 %, β=8 %), pour une concentration finale de 0,2 µM pour une dilution au 1/250 et donc de 0,1 µM pour une dilution au 1/500. Afin de comparer l'influence de chaque constituant, nous avons mis en contact les cellules U87MG avec différentes solutions, avec ou sans Paclitaxel. Après 24 et 72 heures de contact à 37 °C, nous avons mesuré la cytotoxicité par l'Alamar blue (voir II) – 6 – 2).

Nous avons donc comparé la cytotoxicité induite par :

- 0,2 µM de Paclitaxel inclus dans des Hexosomes ou Cubosomes préparés avec du F127 ou du S1670 (φ=1 %, β=8 %).
- 0,1 µM de Paclitaxel inclus dans des Hexosomes ou Cubosomes préparés avec du F127 ou du S1670 (φ=1 %, β=8 %).
- Des Hexosomes ou Cubosomes préparés avec du F127 ou du S1670 (φ=1 %, β=8 %), sans Paclitaxel.

- 0,1 µM de Paclitaxel seul, préalablement solubilisé dans du DMSO (DiMéthylSulfOxyde).
- Une quantité de DMSO seule, correspondante à celle utilisée ci-dessus pour solubiliser le Paclitaxel.

Nous avons par la suite voulu confirmer la capacité vectorisatrice de ces Isasomes, en les chargeant d'ATRA (All-Trans Retinoic Acid). Cette molécule permet la surexpression, par la cellule, de GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) ; qui peut être ensuite détectée et quantifiée [207]. En effet, par le biais d'un double ciblage d'anticorps, nous pouvons quantifier la GFAP par immunofluorescence au microscope confocal. De manière plus précise, les cellules sont mises en contact 2 h à 37 °C avec des Hexosomes et Cubosomes préparés avec du F127 ou du S1670 (φ=1 %, β=8 %, δ70 et δ100), dilués au 1/250 et contenant 0,2 µM d'ATRA. Nous avons effectué la même expérience référence en ajoutant au milieu de culture de l'ATRA seul à la même concentration. Les cellules sont ensuite lavées au PBS 1X et fixées sur des lamelles par de la PFA (ParaFormAldéhyde) à 4 %, ajouté 30 minutes à température ambiante. Elles sont lavées 3 fois avec du PBS 1X additionné de 1 % de BSA (Sérum Albumine Bovine). Les membranes cellulaires sont perméabilisées grâce à l'ajout de triton 1 % durant 15 minutes à température ambiante. Le triton est un détergent qui désorganise la bicouche de la membrane cellulaire et augmente temporairement sa perméabilisation. On profite de ce phénomène pour incuber durant 2 heures des anticorps primaires anti-GFAP (dans du PBS 1X + 1 % BSA), qui vont se fixer à celle-ci dans la cellule. Après un rinçage (même protocole que précédemment), on incube durant 1 heure des anticorps secondaires (marqués par une molécule fluorochrome : Alexa-568), qui sont dirigés contre les anticorps primaires précédemment ajoutés. Après un dernier lavage, on ajoute un milieu de montage (Vectashield) qui permet d'optimiser la détection et la durée de la fluorescence du fluorochrome. Ainsi, sous microscope confocal de longueur d'onde excitatrice de 543 ηm, nous pouvons détecter la fluorescence de l'Alexa-568 à 590 ηm. Cette fluorescence est donc directement corrélée à la concentration cellulaire de GFAP (par le biais de la réaction immunochimique à deux étages) et donc à la concentration d'ATRA précédemment internalisée.

Chapitre 3 :

CARACTÉRISATION DES ISASOMES

Avant propos :

Pour rappel :

δ = La proportion de Dimodan U dans la phase dispersée (100 = Dimodan U pur).

φ = Le pourcentage de phase dispersée dans l'émulsion (en masse).

β = Le pourcentage d'émulsifiant en rapport avec la masse de phase dispersée.

Dans les graphiques, la convention suivante sera adoptée :

- La MicroÉmulsion Émulsifiée sera appelée EME ou L_2 et sera schématisée par des ronds bleus.
- La phase micellaire cubique sera abrégée Fd3m et sera représentée par des losanges verts.
- La phase hexagonale pourra être nommée H_{II} ou Hexosome et sera figurée par des triangles rouges.
- Les phases cubiques seront appelées Pn3m, Im3m ou Cubosomes et seront schématisées par des carrés noirs.

Rappel des objectifs :

- Observer l'influence des paramètres de procédé et de formulation sur les structures internes.
- Proposer l'utilisation de divers émulsifiant en remplacement du F127, notamment pour rendre le vecteur utilisable en alimentaire, en confirmant leur stabilité au cours du temps.
- Tester la solubilisation de molécules hôtes à l'intérieur des Isasomes et observer leurs influences sur le diagramme de phase.
- Étudier des applications de la vectorisation en biologie cellulaire, ainsi que la maîtrise de la perméabilité interfaciale dans le but d'augmenter le pouvoir de rétention de principe actif des Isasomes.

I) Émulsification et stabilité des émulsions

I) - 1 Influence du temps de sonication

La première étape de fabrication des Isasomes est la dispersion des mésophases sous forme de gouttelettes. Pour réaliser cette dispersion nous avons utilisé le fractionnement par ultrasons. Afin d'observer l'influence de cette sonication sur la production d'Isasomes, nous avons effectué des dispersions de 2 à 20 minutes (par pulsation d'une seconde toutes les 2 secondes) et observé l'élévation de température de la solution, la taille des Isasomes ainsi que leur structure interne.

La figure 39 démontre l'influence du temps de sonication sur la température de la solution.

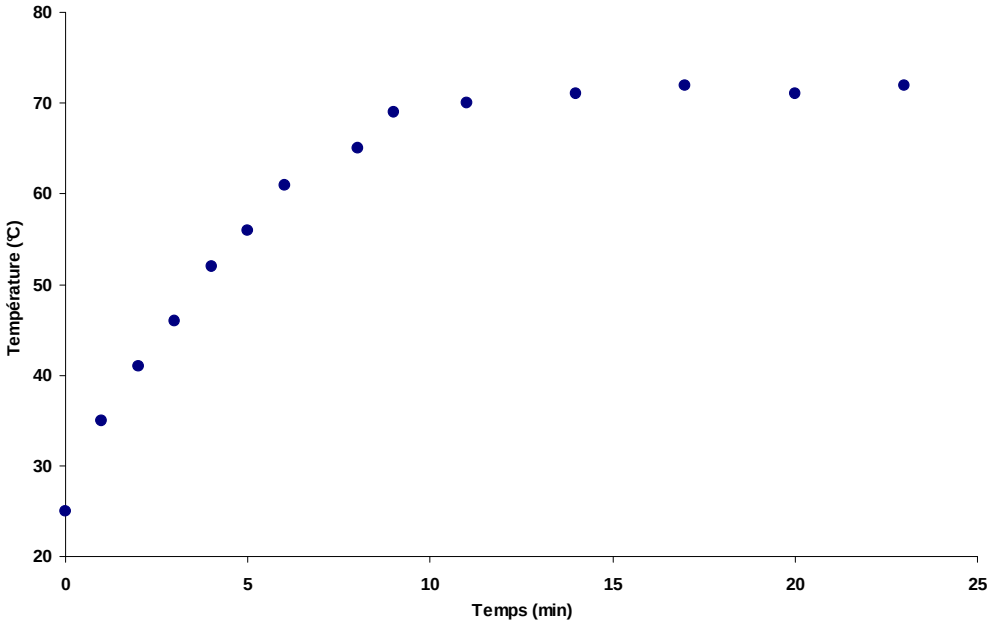


Figure 39 : Évolution de la température de la solution en fonction du temps de sonication.

Il apparaît clairement que la température s'élève avec le temps de sonication. Une température proche de 65 °C peut être bénéfique pour améliorer la dispersion des Isasomes car il s'agit du point de fusion du Dimodan U. Cependant, une élévation trop importante de la température pourrait dégrader certaines molécules, comme les acides gras poly-insaturés, le R-(+)-Limonène ou d'autres molécules aromatiques.

C’est pourquoi une sonication de 8 minutes semble être indiquée afin d’optimiser la dispersion des Isasomes en minimisant l’impact sur la stabilité des molécules.
Il est nécessaire de vérifier que ce temps de sonication permet une bonne stabilité dans le temps des Isasomes ainsi que la conservation de leur structure, par rapport à des temps plus longs.

Pour vérifier que les objets produits au bout de 8 minutes correspondent à ceux à des temps de sonication plus longs, nous avons mesuré la taille moyenne des émulsions, préparées avec des émulsifiants à haut et bas poids moléculaire (respectivement le F127 et le sucrose stéarate), à δ85 (δ70 pour le S1670) et δ100. Ces deux ratios ont été choisis selon les indications de la bibliographie démontrant la présence d’une phase hexagonale à δ85 et cubique à δ100 [93] (figure 40).

- Émulsifiant à haut poids moléculaire, le F127 :

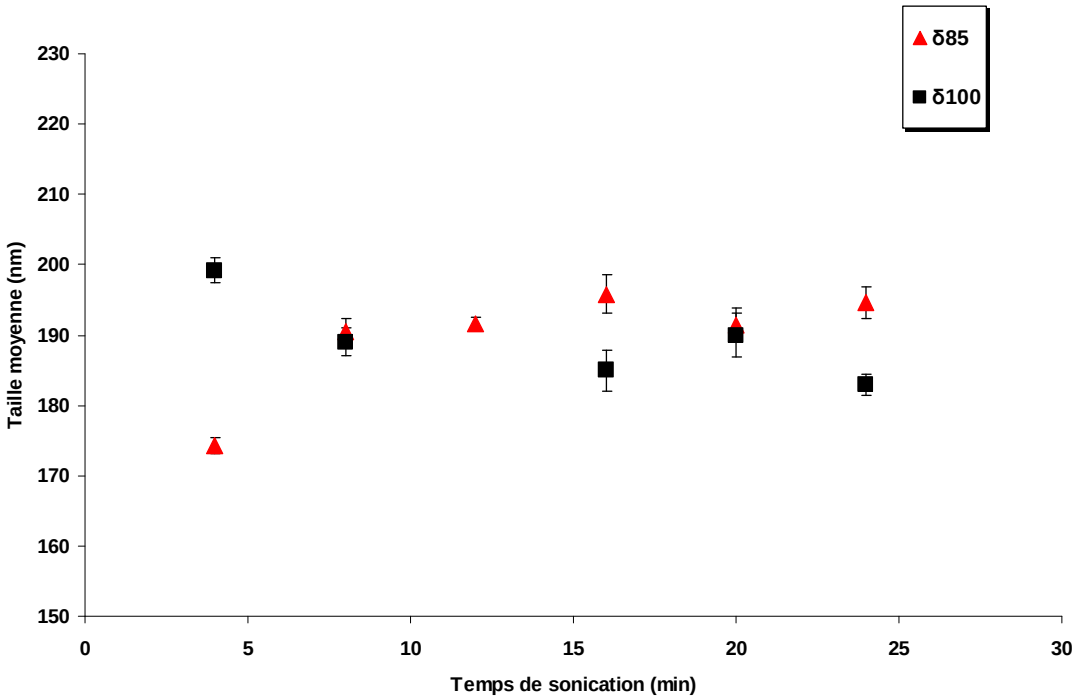


Figure 40 : Évolution de la taille moyenne des Isasomes en fonction du temps de sonication, pour δ85 et δ100.

Émulsifiant F127 à β = 8 %, avec φ = 1 % et mesure à J+1.

Pour les deux mélanges (δ85 et δ100), une sonication supérieure ou égale à 8 minutes permet d'obtenir une taille moyenne stable d'émulsion de l'ordre de 190 ηm (figure 40). Pour une sonication de 4 minutes, les tailles moyennes du δ85 et δ100 sont sensiblement différentes. Après 4 minutes de sonication, à δ85, l'émulsion possède une taille moyenne de 175 ηm alors qu'à δ100 elle est de 200 ηm. Cette différence de taille moyenne, à faible temps de sonication, s'explique par la grande viscosité de la phase à disperser, composée uniquement de monoglycéride, qui n'est pas encore à sa température de fusion. Pour la mésophase hexagonale à δ85, dans les premiers temps de sonication, le R-(+)-Limonène peut s'émulsionner seul en petites gouttelettes avant de réintégrer la structure de monolinoléine, ce qui semble déplacer la moyenne des tailles vers une valeur plus faible.

Afin de confirmer la présence de la mésophase recherchée pour chaque δ (hexagonale pour δ85 et cubique pour δ100), des mesures de SAXS ont été effectuées (Figure 41).

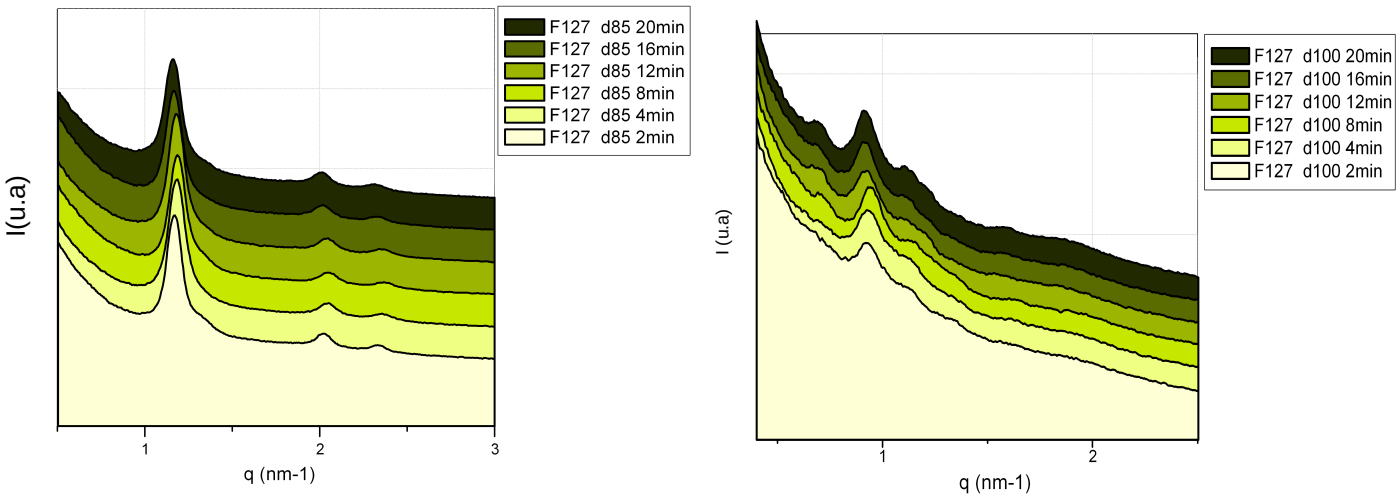


Figure 41 : Spectre de diffusion des rayons X en fonction du temps de sonication.

Particules stabilisées par le F127 à β=8 %, avec φ=1 % et mesure à J+13. À gauche : δ85, à droite : δ100. Les spectres sont volontairement décalés sur l'échelle des ordonnées.

Pour le δ85, préparé avec le F127, la présence d'une phase hexagonale est confirmée quel que soit le temps de sonication entre 2 et 20 minutes. Il semblerait que l'augmentation du temps de sonication permet d'augmenter la structuration des hexosomes.

Pour le δ100, la phase cubique est effectivement présente pour tous les barèmes de sonication testés. Cependant, un traitement ultrasonique plus intense accroît la proportion de symétrie Im3m, en plus de la phase Pn3m, caractéristique de l'inclusion dans la structure d'une partie du F127 [178]. De plus, l'intensité des pics évolue avec le temps de sonication. Un traitement dispersif plus sévère permet d'augmenter la structuration des gouttelettes.

- Émulsifiant à bas poids moléculaire, le sucrose stéarate

Pour un δ70 stabilisé par du S1670, la phase hexagonale est présente quelle que soit la durée de sonication (Figure 425).

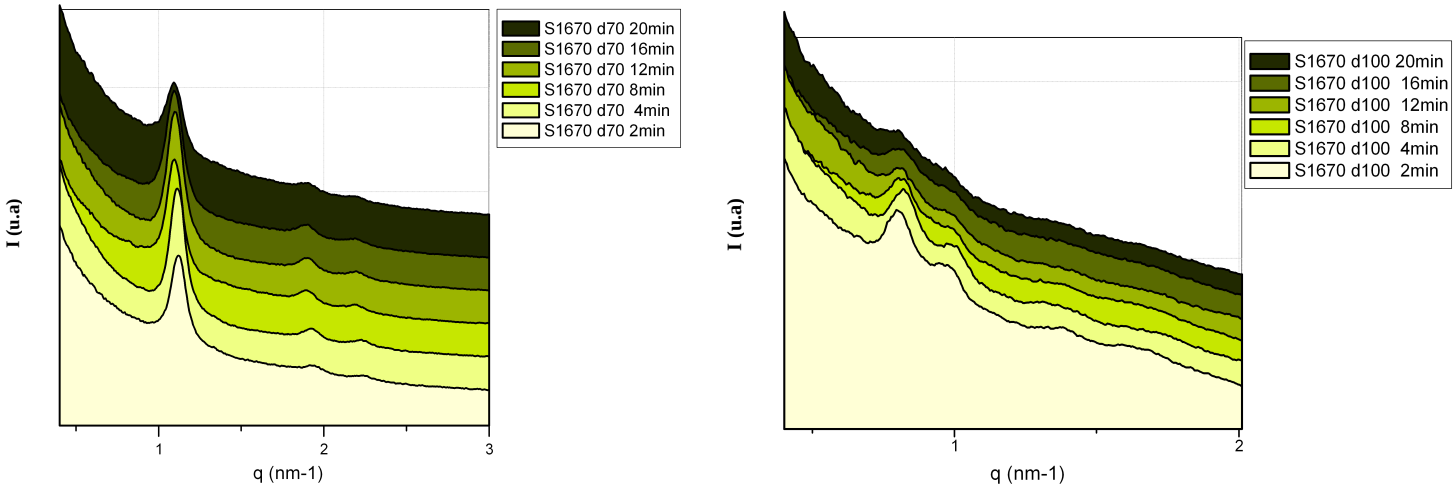


Figure 42 : Spectre de diffusion des rayons X en fonction du temps de sonication.

Particules stabilisées par le S1670 à β=8 %, avec φ=1 % et mesure à J+13. À gauche : δ70, à droite : δ100. Les spectres sont volontairement décalés sur l'échelle des ordonnées.

Cependant lors de la formation de phase cubique à δ100, la quantité de structure cubique semble diminuer avec l'augmentation du temps de sonication. Ceci peut être expliqué selon la même hypothèse que précédemment, à savoir que le prolongement du traitement ultrasons facilite l'insertion de l'émulsifiant à l'intérieur de la structure. Ainsi, pour des longs temps de sonication, la phase cubique disparaît et les Cubosomes deviennent de simples vésicules.

En prenant en compte :

- La maîtrise de l'élévation de température à 65 °C, afin de permettre une bonne fusion du Dimodan U tout en minimisant l'impact thermique sur des molécules plus sensibles,
- La possibilité d'obtenir une taille moyenne stable en dessus de 8 minutes de sonication,
- La conservation de la structure interne des Cubosomes stabilisés par le S1670, pour des durées de traitement inférieures à 12 minutes,

nous avons donc choisi d'appliquer une sonication de 8 minutes pour la préparation de nos Isasomes.

I) - 2 Influence de la formulation

Dans le but de proposer de nouveaux émulsifiants capables d'émulsionner et de stabiliser les Isasomes, nous avons testé des tensioactifs de différents poids moléculaires (bas et haut), de différentes charges (anionique ou neutre), dont certains sont utilisables dans le domaine alimentaire. En effet, la majorité des études effectuées sur les Isasomes utilisent le F127 comme émulsifiant principal, cependant celui-ci ne fait pas parti de la liste positive des ingrédients alimentaires. Nous allons donc observer l'influence de l'émulsifiant utilisé sur la taille des gouttelettes, la stabilité de l'émulsion au cours du temps, la charge de surface et son influence sur le diagramme de phase (en comparaison au F127).

I) – 2 – 1 Taille des Isasomes et stabilité dans le temps en fonction de l'émulsifiant

Dans un premier temps, nous avons testé les facultés d'émulsification de plusieurs émulsifiants. Pour cela nous avons fabriqué des Isasomes avec un pourcentage de phase dispersée de 1 % (φ), un pourcentage d'émulsifiant de 8 % (β) et pour trois valeurs de δ : 50, 85, 100. Ces valeurs de δ ont été choisies afin de visualiser la capacité des tensioactifs à

émulsionner les différentes mésophases (Fd3m, hexagonale ou cubique) sans connaître au préalable leur possible influence sur les positions des transitions de phases. Ainsi le δ50 est préempté comme étant une EME ou une Fd3m, le δ85 comme une phase hexagonale et le δ100 comme une phase cubique. Le Tableau V, résume la possibilité ou non, d'émulsionner des Isasomes aux trois δ choisis ainsi que leur stabilité dans le temps. Le F127 est choisi comme référence pour sa capacité à stabiliser les Isasomes sur plus de 6 mois.

Tableau V : Capacités émulsifiantes et stabilisatrices des émulsifiants en fonction du δ.
c = capacité à émulsionner, mais stabilité dans le temps non mesurée. β=8 %, φ=1 %.

Émulsifiants	**Stabilité des émulsions dans le temps (en jours)**		
	δ50	**δ85**	**δ100**
F127	> 180	> 180	> 180
Sucrose Stéarate S1670	> 180	> 180	> 180
Tween 80	80	80	80
Lécithines	80	80	60
Caséines	90	60	40
Stéaroyl-2-Lactylate	50	40	30
Protéines Sériques	40	30	20
Polyglycérol Stéarate	40	40	40
Sucrose oléate	20	20	20
Polyéthylène Stéarate	c	c	c
Aculyne	c	c	c

Il apparaît que les Isasomes sont des particules difficiles à stabiliser sur de longues périodes. En effet, hormis le sucrose stéarate (S1670) et le F127, aucun émulsifiant testé n'a pu stabiliser ces émulsions plus de trois mois.

L'interface eau/huile est extrêmement importante à l'intérieur mêmes des structures. Il semblerait que les émulsifiants soient, au fur et à mesure, intégrés à l'intérieur de la structure et ne soient donc plus disponibles pour stabiliser la surface des gouttelettes. De plus, certains émulsifiants comme le SSL sont capable de s'auto-assembler et il semblerait qu'il puisse former des structures conjointes avec la monolinoléine, déstabilisant les Isasomes.

La stabilité des émulsions a été suivie par l'évolution du diamètre moyen au cours du temps. La figure 43 représente l'évolution de la taille moyenne d'émulsions préparées à δ100, φ=1 %, β=8 % avec du F127 ou du S1670.

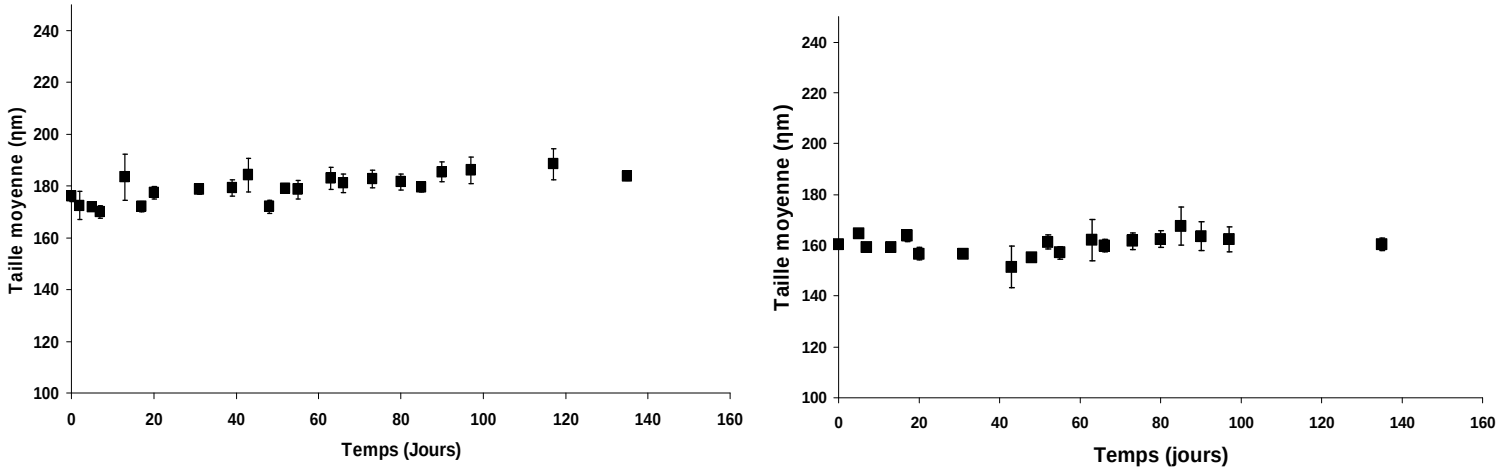


Figure 43 : Évolution de la taille moyenne des émulsions préparées avec du F127 (gauche) et du Sucrose Stéarate (droite).
δ100, φ=1 %, β=8 %.

Le sucrose stéarate apparaît, en termes de stabilité, comme une bonne alternative au F127. De plus, il permet d'obtenir des Cubosomes de plus petites tailles, leur taille moyenne étant de 160 ηm contre 180 ηm pour le F127. Il représente non seulement une alternative, mais également un complément au F127. Ce dernier est un émulsifiant à haut poids moléculaire, de charge neutre et stabilise de manière stérique les interfaces. Le sucrose stéarate est quant à lui, un émulsifiant anionique de faible poids moléculaire qui s'organise de manière plus compacte à l'interface, créant une couche externe moins perméable. De plus, sa charge va permettre de diminuer les risques de coalescence, de par l'augmentation de la répulsion électrostatique entre les gouttelettes.

L'instabilité de certaines émulsions a été montrée par l'augmentation significative de la taille moyenne. Comme le montre la figure 44, avec l'utilisation de caséinates comme émulsifiant (pour δ100), la taille moyenne augmente à partir de 40 jours. Cette augmentation rapide de la taille suivie d'un ralentissement est typique d'une déstabilisation due au mûrissement d'Ostwald, phénomène qui s'auto-ralentit.

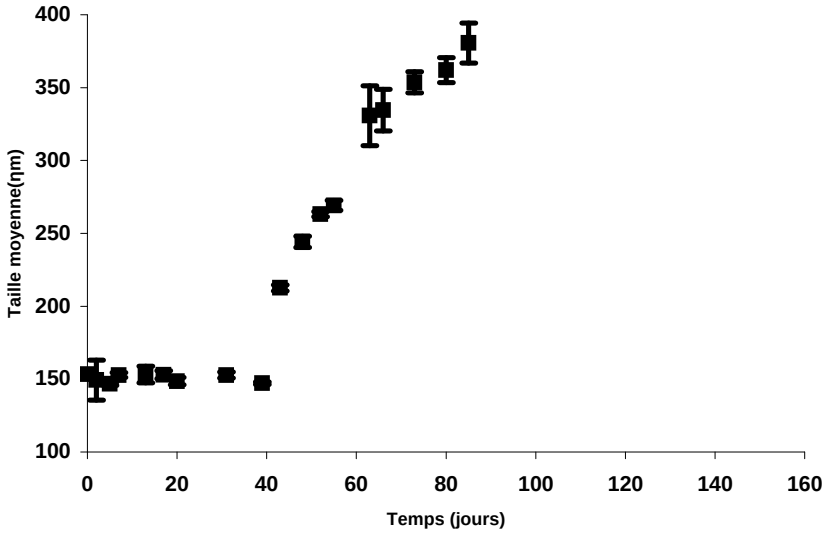


Figure 44 : Évolution de la taille moyenne d'émulsion préparée avec des caséinates de sodium.

δ100, φ=1 %, β=8 %.

La taille moyenne des émulsions, à δ100, préparées avec des émulsifiants à haut poids moléculaire est de l'ordre de 150 à 190 ηm. Les émulsifiants à bas poids moléculaire, dans les mêmes conditions, permettent d'obtenir des tailles moyennes inférieures de l'ordre de 100 à 130 ηm. Cette différence peut être expliquée par l'empilement plus compact des petites molécules et de leur tendance à imprimer une courbure plus importante à l'interface. Cependant le sucrose stéarate ne suit pas cette règle et possède une taille moyenne de 160 ηm, soit la gamme de taille obtenue pour les émulsifiants à haut poids moléculaire.

Même si la stabilité de la plupart de ces émulsions ne dépasse pas 2 mois, ces émulsifiants peuvent être envisagés comme solution alternative au F127, pour des usages à court terme, car leurs propriétés de surface (charge et affinité avec une cible biologique) leurs confèrent des potentialités intéressantes en vectorisation. C'est pourquoi nous avons continué à décrire l'influence de certains de ces émulsifiants sur les Isasomes.

I)– 2 – 2 Influence de la concentration d'émulsifiant (β) sur la taille des Isasomes.

La vectorisation de molécules d'intérêt, notamment en biologie, nécessite la création de vecteurs de faible taille, afin qu'ils puissent circuler dans les petits vaisseaux du système sanguin. Comme on l'a montré le paragraphe I) - 1 – 1, le temps de sonication ne permet pas de moduler la taille des Isasomes. Nous avons donc tenté de moduler cette taille en modifiant la concentration d'émulsifiant. Pour les émulsifiants F127, caséines, WPI, lécithine, SSL et sucrose stéarate, nous avons observé l'évolution de la taille moyenne des émulsions en faisant varier β de 1 à 50 pour un δ100 (Cubosomes préemptés). Les tailles moyennes ont été mesurées 1 jour après la fabrication de l'émulsion par granulométrie laser.

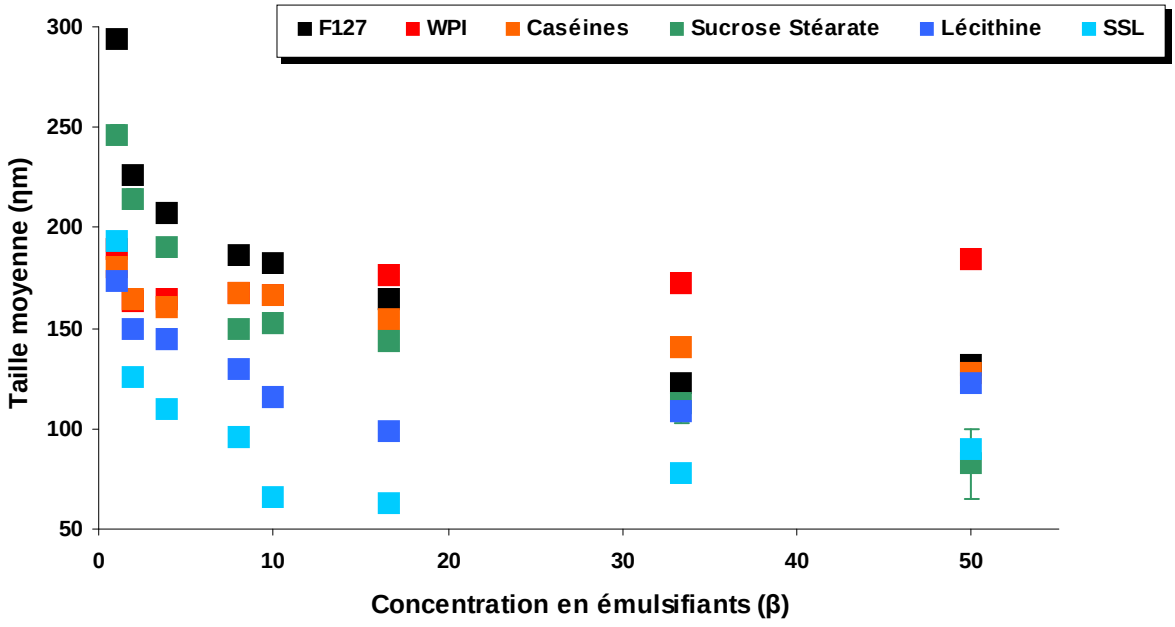


Figure 45 : Évolution de la taille moyenne des émulsions à δ100 en fonction de la concentration en émulsifiant (β).

φ=1 %, mesure à J+1.

Comme attendu, l'augmentation de la concentration d'émulsifiant permet de diminuer la taille des émulsions (figure 45). Dans les conditions testées, les émulsifiants à haut poids moléculaire (F127 et protéines) ont une faculté moins grande à abaisser cette taille moyenne. Ceci s'explique par les différents mécanismes de stabilisation de l'interface. Ils stabilisent l'interface de manière stérique et ne forment pas une couche aussi compacte que les émulsifiants à bas poids moléculaire.

Ces derniers (lécithine, SSL, sucrose stéarate) possèdent une courbure interfaciale plus importante, du fait de leur compacité à l'interface, dictant une taille de gouttelette plus petite. À forte concentration, le SSL est capable de stabiliser des gouttelettes de moins de 70 ηm. À de si petit diamètres, il apparaît peu probable d'obtenir une organisation de type cubique dont le paramètre de maille est compris entre 9 ηm, pour la phase Pn3m, et 12 ηm pour la phase Im3m. Ces dispersions ne contiennent donc sûrement qu'une faible fraction de Cubosomes et principalement de simples émulsions, voire des micelles mixtes (voir partie I)-2-5).

Nous pouvons donc moduler aisément la taille de ces émulsions en fonction de l'émulsifiant utilisé ou de sa concentration.

I)– 2 – 3 Influence du δ sur la taille moyenne des émulsions

Nous avons décrit les tailles moyennes des particules à δ100 en fonction de l'émulsifiant utilisé. Pour β=8 % les gouttelettes ont une taille comprise entre 130 et 190 ηm, mais nous ne savons pas si, dans les mêmes conditions, la taille des autres structures émulsifiées est équivalente. Nous avons donc mesuré la taille moyenne des Isasomes en fonction du δ et de différents émulsifiant (figure 46).

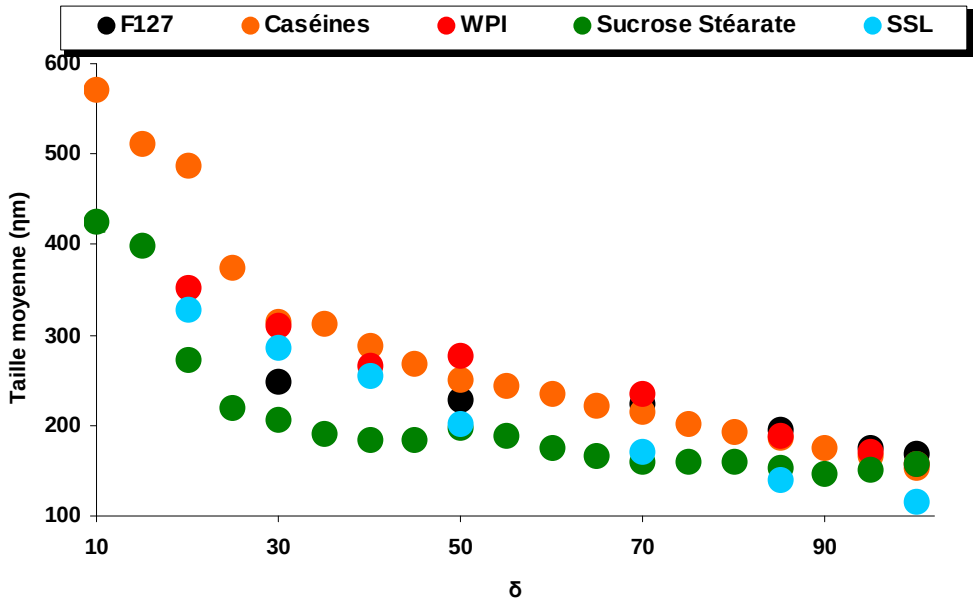


Figure 46 : Évolution de la taille moyenne des Isasomes en fonction du δ et des émulsifiants utilisés.

Mesures à J+1, β=8 %, φ=1 %.

En règle générale, plus le δ augmente et plus la taille des gouttelettes semble diminuer. Ainsi, plus la structuration est importante et plus les mésophases sont dispersables en de petites unités. Une différence claire est observable entre les émulsifiants à haut (F127, protéines) et bas poids moléculaires (SSL, sucrose stéarate). En effet, ces derniers (points verts et bleus) sont capables de former des gouttelettes plus petites de par leur courbure spontanée et leur faculté à diminuer davantage la tension interfaciale.

Afin d'observer l'influence de ces deux types d'émulsifiants à l'interface, nous avons voulu tester des mélanges d'émulsifiants à haut et bas poids moléculaire. En effet, les Isasomes sont amenés à être utilisés dans des milieux complexes ou de nombreuses molécules tensioactives peuvent se retrouver en compétition pour accéder à l'interface. La figure 47 représente l'évolution des tailles des gouttelettes à différents ratios de mélange de sucrose stéarate (S1670) et de caséinates pour différents δ.

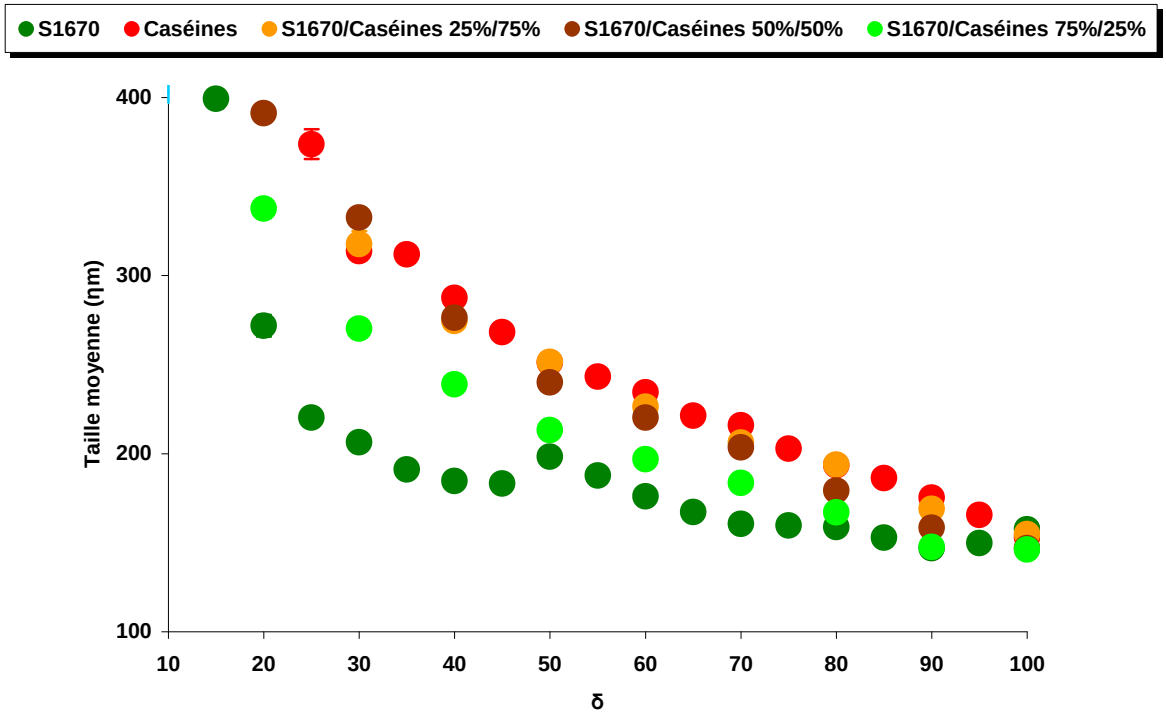


Figure 47 : Évolution de la taille moyenne des Isasomes en fonction du δ et du mélange d'émulsifiants S1670- Caséinates à différents ratios.

Mesures à J+1, β=8 %, φ=1 %.

Il apparaît qu'un jour après l'émulsification, les caséinates prédominent à l'interface pour des ratios de 25/75% et 50/50% (S1670/caséinates). Pour un ratio de 75/25%, la taille des gouttelettes diminue par l'effet du sucrose stéarate qui devient prédominant à l'interface, en comparaison aux précédents ratios. Lorsque le ratio augmente, on imagine aisément que le sucrose stéarate vient s'intercaler dans les trous laissés vacants à l'interface par les caséinates.

La même étude a été effectuée pour différents ratios de S1670 et de F127 (figure 48).

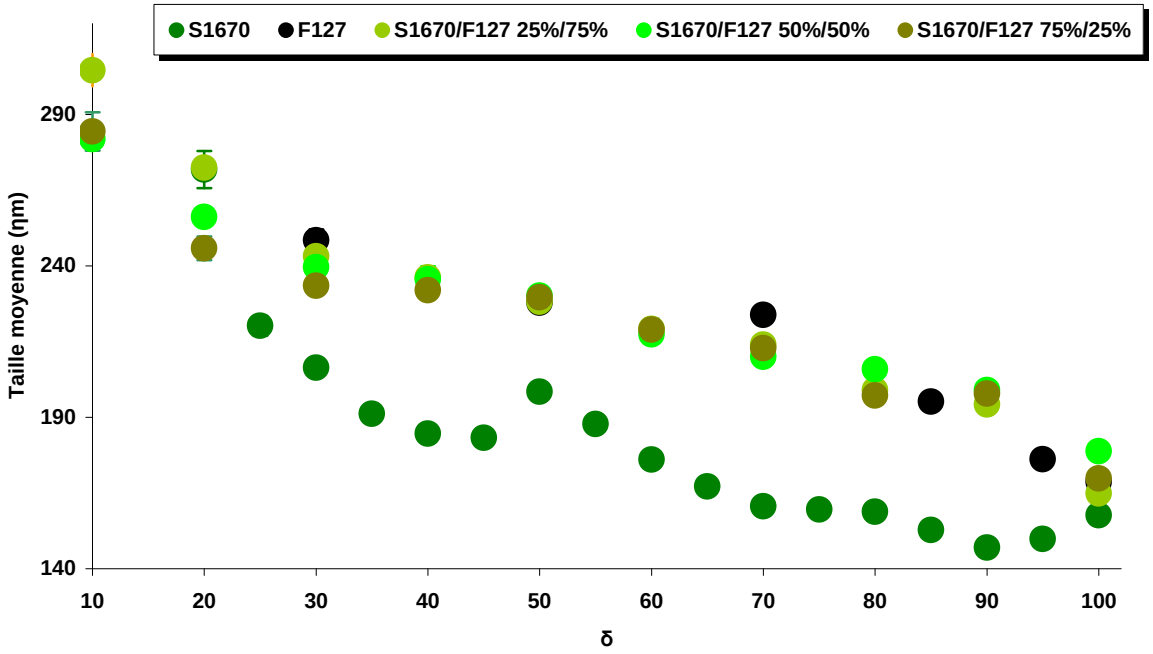


Figure 48 : Évolution de la taille moyenne des Isasomes en fonction du δ et du mélange d'émulsifiants S1670- F127 à différents ratios.

Mesures à J+1, β=8 %, φ=1 %.

Contrairement a ce qui a été observé précédemment, quel que soit le ratio S1670/F127, le F127 prédomine à l'interface et imprime son propre rayon de courbure. À la différence des caséinates, le F127 semble s'adsorber rapidement à l'interface et est peu désorbé par un autre émulsifiant. L'accès préférentiel à l'interface du F127 est peut-être expliqué par son affinité plus importante avec les monoglycérides.

I)– 2 – 4 Potentiel zêta des Isasomes

Les émulsifiants utilisés permettent de moduler la taille des Isasomes, en fonction de leur nature ou de leur concentration. Dans l'objectif d'utiliser ces structures émulsifiées comme vecteur, il convient d'observer l'influence des émulsifiants sur la charge de surface des Isasomes. En effet, une charge de surface plus ou moins négative modifiera l'interaction entre les Isasomes et la membrane plasmique, chargée elle aussi négativement.

Nous avons donc mesuré les potentiels zêta des émulsions stabilisées par différents émulsifiants en fonction du δ (figure 49).

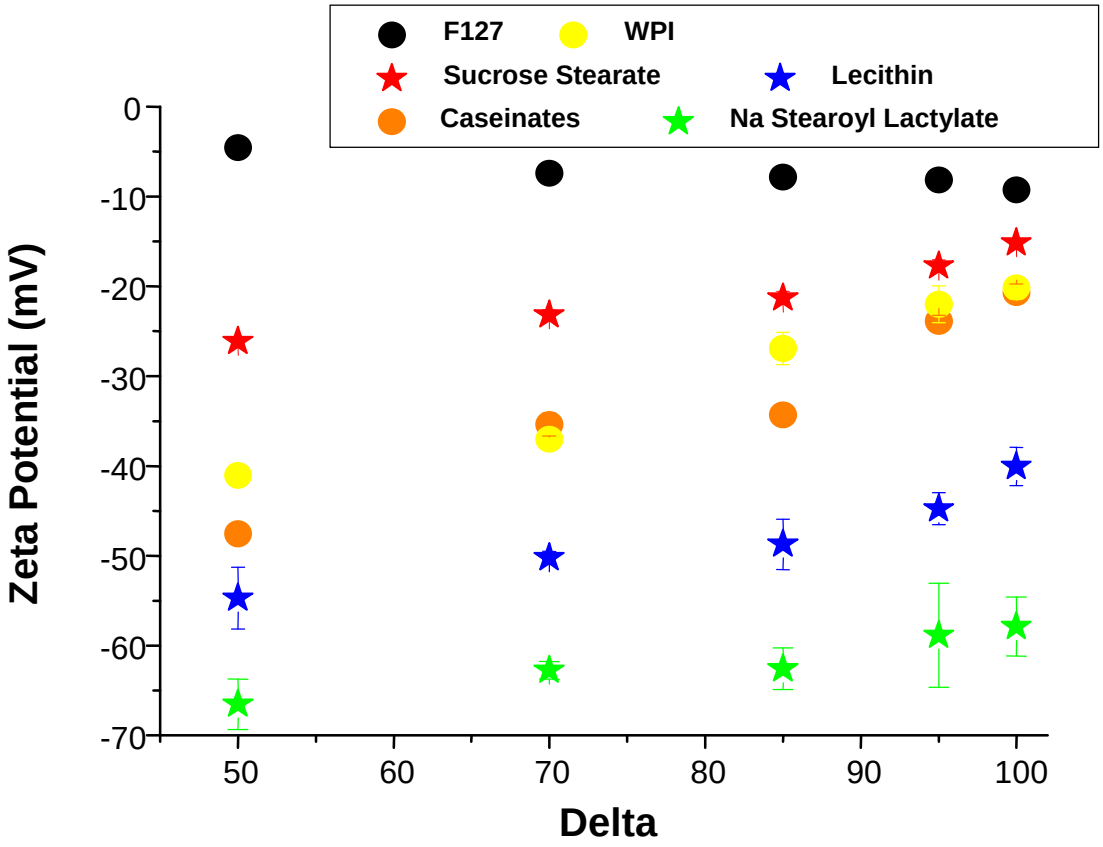


Figure 49 : Évolution des potentiels zêta des Isasomes en fonction du δ et de l'émulsifiant utilisé.

Mesures à J+1, β=8 %, φ=1 %. Les étoiles et les ronds sont utilisés respectivement pour les émulsifiants à bas et haut poids moléculaires.

Une première lecture de la figure 49, nous permet de constater que le potentiel zêta augmente avec le δ, sauf pour le F127 où la tendance est inverse. Cette augmentation (ou diminution dans le cas du F127) s'explique par la composition du Dimodan U apportant la monolinoléine. En effet, ce mélange comporte une petite proportion d'acides gras libres, chargés négativement, et qui vont exposer leur charge à l'interface. Ces charges restent cependant peu nombreuses et de faible intensité, expliquant les légères modifications de charge globale des gouttelettes.

Le F127 étant neutre, les charges de surface devraient être nulles, hors la présence des charges négatives des acides gras libres donne une charge de surface de -5 à -10 mV.

La gamme de charge de surface obtenue est extrêmement grande et donc intéressante pour l'utilisation des Isasomes en tant que vecteur. En effet, le SSL confère un potentiel zêta

d'environ –65 mV alors que les Isasomes stabilisés par le S1670 possèdent une charge de surface comprise entre -15 et -25 mV (en fonction du δ).

Nous avons décrit une large gamme d'émulsifiants possiblement disponibles pour stabiliser les Isasomes et qui permettent de moduler à volonté leurs stabilités, leurs tailles ou leurs charges de surface. Il est bien sûr nécessaire de vérifier que ces émulsifiants sont bien capables d'émulsionner la même variété de structures que le F127.

I)– 2 – 5 Influence des émulsifiants sur le diagramme de phase

Une large palette d'émulsifiants se sont montrés capables de stabiliser les émulsions sur des temps plus ou moins longs, leurs conférant des propriétés spécifiques. Il convient dès lors de vérifier leur influence sur les mésophases émulsionnées contenant des mélange de monolinoléine / limonène (figure 50).

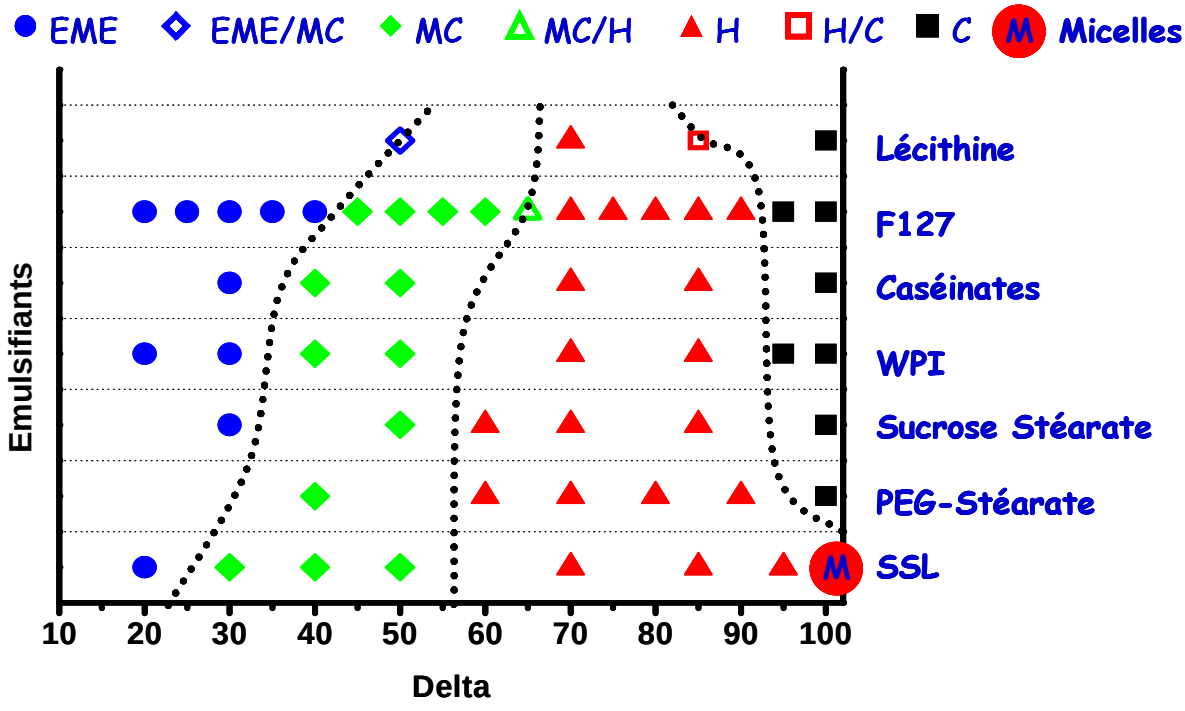


Figure 50 : Influence des émulsifiants sur les mésophases de monolinoléine/limonène, en comparaison à la référence F127.

Mesures à J+4, β=8 %, φ=1 %. Avec MC = Fd3m (Micellaire Cubique), H = Hexosome et C = Cubosome. Les pointillés représentent les zones approximatives de changement de phase.

En comparaison à la référence F127, dans les conditions citées en légende de la figure 50, tous les émulsifiants choisis sont capables de stabiliser les différentes mésophases. Seul le SSL ne suit pas cette règle. En effet, le SSL ne permet pas de stabiliser des phases cubiques. Comme pressenti dans la partie I)-2-2, en observant des tailles de gouttelettes inférieures à 70ηm à δ100, celles-ci ne contiennent pas de mésophase. Cet émulsifiant semble avoir une très forte affinité avec la monolinoléine et semble moins favoriser les courbures négatives que d'autres émulsifiants comme le sucrose stéarate par exemple. La phase Fd3m est présente dès le δ25 et laisse place à la phase hexagonale à δ55. Au-delà de δ95, le SSL et la monolinoléine forment préférentiellement des micelles mixtes ou des vésicules de petites tailles.
La lécithine donne le phénomène inverse lorsqu'elle interagit avec la structure interne. Elle favorise une courbure négative et permet d'obtenir des EME pour des plus grandes valeurs de delta que pour le F127. Ainsi les domaines d'organisation sont plus restreints, la phase hexagonale ne débutant qu'à δ70 et se terminant à δ90.
Les autres émulsifiants semblent avoir le un comportement similaire au F127 en termes de capacités de stabilisation des mésophases mais également en termes d'interactions avec celles-ci.

Synthèse et conclusion partielle

Nous avons démontré que la dispersion de mésophases de monolinoléine/limonène est possible grâce à l'utilisation d'une large palette d'émulsifiants. Nous avons ainsi accès à des Isasomes de tailles comprises entre 60 et 200 ηm (pour des conditions opératoires similaires : β=8 %, φ=1%) et des charges de surface variables (entre -65 et -5 mV). Les émulsifiants testés ont montré différentes affinités avec la structure interne, se traduisant par une modification de la localisation des changements de phase dans le diagramme, en comparaison au F127. Néanmoins peu d'émulsifiants se sont montrés capable de stabiliser les Isasomes sur le long terme.
En effet, parmi tous les émulsifiants testés, seul le sucrose stéarate a permis leur stabilisation sur plus de 6 mois, à l'instar de l'émulsifiant référence qu'est le F127. Le S1670 est donc une alternative intéressante à l'utilisation du F127, permettant d'obtenir des Isasomes de taille légèrement inférieure, une charge de surface négative et une plus grande plage de présence d'Hexosomes dans le diagramme de phase.

II) Rôle de la quantité de phase dispersée et évolution structurale des Isasomes.

Cette partie concerne l'émulsification des Isasomes sans molécules hôtes ajoutées et contenant du limonène, une petite molécule aromatique, utilisée comme huile et permettant de varier leur structure interne. La formulation d'Isasomes est complexe et conduit à des structures internes et des tailles modulables en fonction de très nombreux paramètres parfois inter-dépendants. L'objectif de cette thèse a été d'identifier ces paramètres et d'observer leurs influences sur ces structures. Dans la partie précédente, nous avons vu l'effet de différents émulsifiants sur les structures, les tailles et la stabilité de l'émulsion. L'accent sera porté ici sur l'influence de la fraction de mésophase dispersée, l'évolution temporelle du système et le stockage.

II) - 1 Préambule

Les Isasomes formulés avec le mélange monolinoléine/limonène ont été largement étudiés dans la littérature. Les variations des structures internes en fonction de différents paramètres ont déjà été décrit. Cependant, certaines interactions restent à être élucider, notamment l'influence de la quantité de phase dispersée (φ) sur la structure interne des Isasomes. Une étude préliminaire de Samuel Guillot (figure 51, données non publiées), a montré que la structure interne d'un mélange à δ57 peut être une phase de type L_2 pour des quantités de phase dispersée supérieures à 15 % et de type micellaire cubique (Fd3m) pour des valeurs de φ inférieures à 15 %.

Ainsi, à une valeur de β fixée, il semblerait que la structure interne des Isasomes dépende de la fraction de phase émulsifiée. Du fait que β soit constant, la quantité de F127 dans les différents échantillons ne l'est pas. En effet, comme la quantité d'émulsifiant est calculée en

pourcentage de phase dispersée ; lorsque celle-ci augmente, la quantité d'émulsifiant augmente également. Or, il a été montré qu'une variation de la quantité d'émulsifiant peut induire des transformations sur ce type de particules [89], et notamment une transition L_2-Fd3m par augmentation de la concentration en F127.

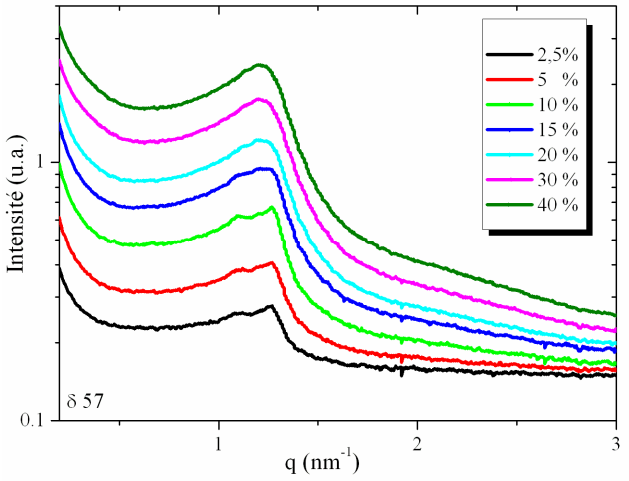


Figure 51 : Intensité diffusée par SAXS d'Isasomes à δ57 pour différentes quantités de mésophase dispersée (d'après S. Guillot, données non publiées).

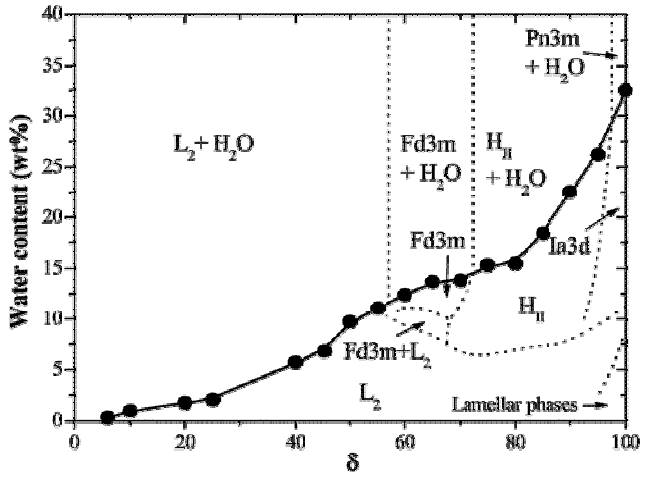
Stabilisés par du F127 à β=8 %, analysés à J+1.

Néanmoins, ces observations n'ont pas été publiées ni confirmées par d'autres travaux. Cette information est pourtant essentielle si l'on veut utiliser ces vecteurs dans le domaine biologique. En effet, les différents tests biologiques s'effectuent à des dilutions très fortes des échantillons (de l'ordre du 1/250ème de la concentration initiale), afin de limiter les problèmes de cytotoxicité. À de telles dilutions, la détermination d'une quelconque structure interne des Isasomes par SAXS n'est pas réalisable, pour des raisons d'intensité de signal trop faible. Lors de nos expériences sur synchrotron, les concentrations de l'ordre de 0,5 % nous sont apparues comme étant proches de la limite raisonnable pour la détermination de la structure interne.

Nous avons donc voulu confirmer ces résultats afin de vérifier la structure interne de nos Isasomes en fonction de la dilution (donc de la quantité de phase dispersée).

II) – 2 Influence de la fraction de mésophase dispersée à β constant

Dans la majeure partie de ce travail, nous avons émulsifié différents types de mésophases à une concentration relativement faible de 1 %, et dont la proportion monoglycéride/limonène est toujours représentée par le paramètre δ. Dans la littérature, ces mêmes Isasomes ont été réalisés à des concentrations supérieures à 5 % [117]. À cette concentration de phase dispersée, il a été montré que les structures internes des Isasomes correspondaient à celles des mésophases non émulsifiées (en volume) [93]. Le diagramme suivant (figure 52), concernant les phases en volume nous indique, dans le cas d'excès d'eau, la structure attendue si l'émulsifiant n'interagit pas avec la structure interne.
Ces structures ont été déterminées dans un délai court après leur fabrication, soit après 24 ou 48 heures.



.

Figure 52 : Mésophases observées pour les mésophases en volume de DimodanU/limonène/Eau, en fonction de la valeur de δ (d'après [93]).

Il est à noter qu'à δ57 se situe la transition de phase L_2-Fd3m explicitée dans la partie (II)-1). L'addition de F127 fait diminuer le diamètre des gouttelettes qui favorisera l'EME, ayant un paramètre de maille plus petit que la phase Fd3m.
Ce diagramme sert donc de référence quant aux structures présentes en fonction du δ, 48 heures après fabrication.

Au vu des différences observées (figure 51) en fonction du pourcentage de phase dispersée, nous avons voulu comparer les mésophases présentes en émulsions (à différents φ) avec celles de référence (en volume). La figure 53 montre les mésophases présentent à différentes δ pour des φ de 0,5, 1, 2, 5, 10 et 20%.

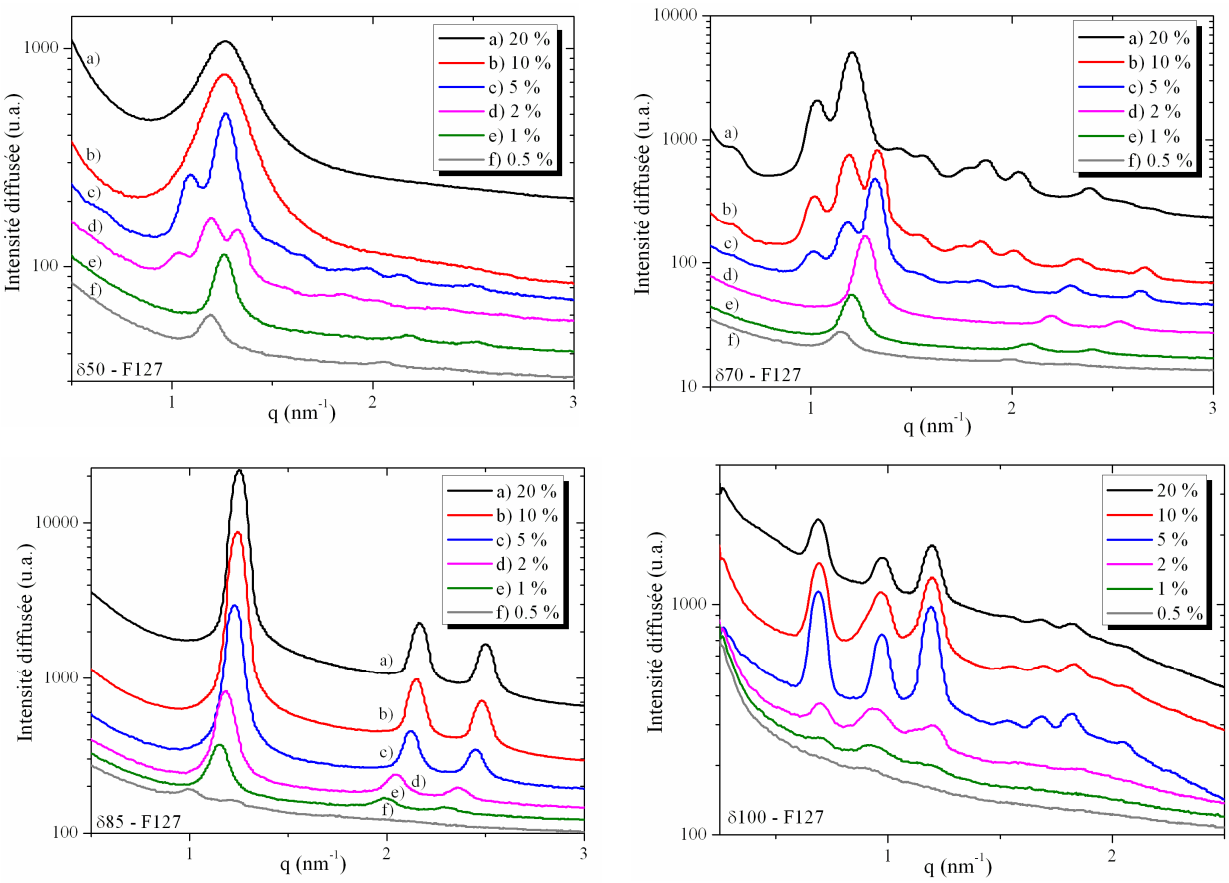


Figure 53 : Intensité diffusée par SAXS pour des Isasomes à différents δ en fonction de la quantité de mésophase dispersée (de haut en bas et de gauche à droite, δ50, 70, 85 et 100).
Stabilisés par du F127 à β=8 %, analysés à J+15.

Pour les grandes quantités de mésophase (φ>10 %), la structure interne correspond bien à celle des phases en volume, on retrouve ainsi une phase L_2 pour δ50, la structure micellaire cubique Fd3m pour δ70, la phase hexagonale inverse H_{II} pour δ85.

Cependant pour les plus faibles quantités de phase dispersée, les structures internes ne correspondent plus aux phases présentes en volume. À δ50, lorsque la quantité de phase dispersée φ diminue, on obtient successivement une phase EME (20 à 10 %), Fd3m (5 à 2 %)

puis Hexagonale (2 à 0,5 %). Or, d'après de précédentes études, à δ50 et à φ=5 %, la structure devrait être une phase L_2 et nous obtenons ici une phase Fd3m.

De manière générale, pour les formulations à δ50, 70, 85 ou 100, mesurées après 15 jours de stockage, la structure interne est modifiée et se déplace vers la droite du diagramme de phase (vers des structures de courbures moins négatives) lorsque φ diminue.

Deux hypothèses sont alors à examiner :

- À β constant, la concentration d'émulsifiant dans la solution augmente avec φ. L'émulsifiant pourrait donc influer sur la structure interne des Isasomes.
- Au cours du vieillissement des structures, un des composés de la formulation semble être modifié, et influe ainsi sur l'organisation interne des Isasomes.

La première hypothèse expliquerait une augmentation du paramètre de maille de la structure cubique (à δ100) lorsque φ augmente. Cette évolution du paramètre de maille étant due à l'intégration progressive du F127 dans la structure, ayant un effet structurant. Hors nous n'observons pas ce phénomène. La structure cubique Im3m est présente quelque soit φ et le paramètre de maille n'évolue pas ; la position des pics restant identiques. Aussi, la première hypothèse ne peut pas expliquer l'évolution des structures observées en fonction de φ aux δ50, 70 et 85.
Il semblerait qu'au cours du stockage (15 jours), le limonène et/ou la monolinoléine subissent une modification impactant l'organisation interne des Isasomes.

Nous pouvons néanmoins établir un diagramme de phase à 15 jours pour des émulsions de monolinoléine/limonène, stabilisées par du F127, en fonction de la quantité de phase dispersée (figure 54).

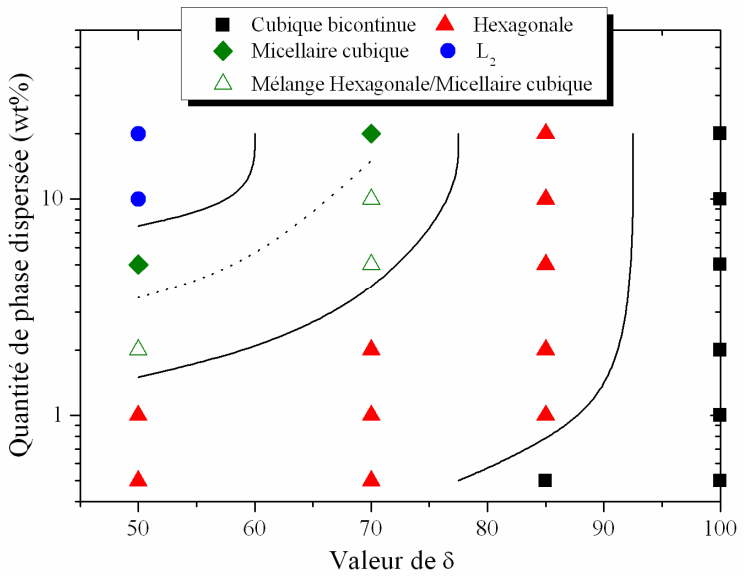
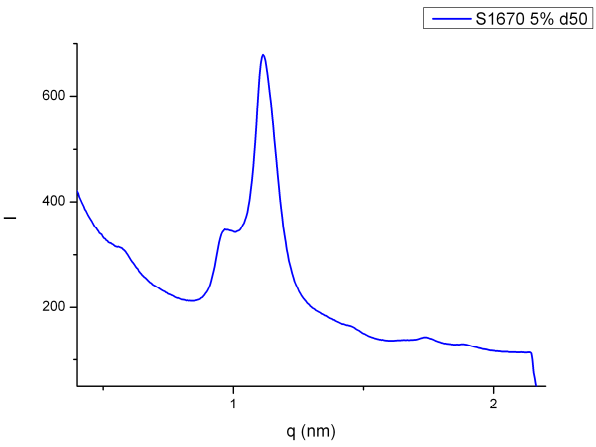


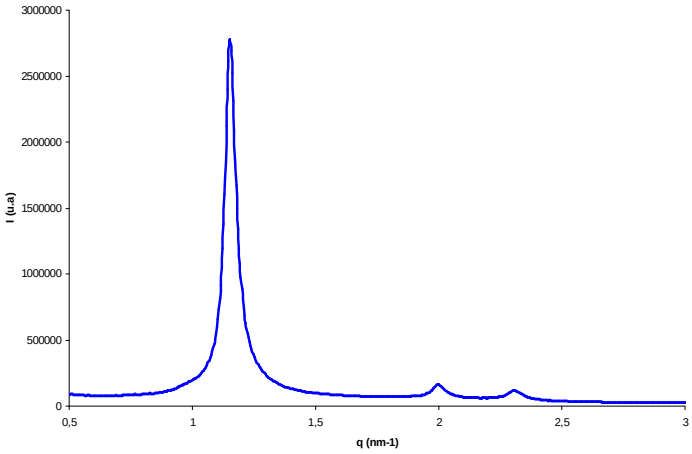
Figure 54 : Structure interne des Isasomes stockés à température ambiante et mesurées après 15 jours en fonction du paramètre δ caractérisant le mélange initial.

Stabilisés par du F127 à β=8 %, analysés à J+15.

Afin de confirmer la deuxième hypothèse, nous avons mesuré par SAXS la structure interne d'un même échantillon à 30 jours d'intervalle (figure 55).



Mesure à 7 jours (HASYLAB)



Mesure à 37 jours (ESRF)

Figure 55 : Intensité diffusée par SAXS du même échantillon mesuré à 30 jours d'intervalle.

Stabilisé par du S1670, pour β=8 %, φ=5 % et δ50.

La structure interne 7 jours après la fabrication est de type Fd3m alors qu'elle devient hexagonale après 37 jours. Cette observation nous indique que, dans l'étude de la variation de structure avec φ, vient se superposer un phénomène de vieillissement des émulsions.
Un ou plusieurs des constituants de l'émulsion monolinoléine/limonène semblent donc être impactés par le stockage. Cette « non-stabilité » de la structure interne au cours du temps n'a jamais été montrée par les recherches antérieures sur ces dispersions de monolinoléine/limonène et sur les Isasomes en général (du fait de leur caractérisation dans des temps courts après leur fabrication). Ce phénomène, non décrit précédemment, nous a incité à décrire ces émulsions dans le temps en terme de structure interne et de le caractériser en fonction des paramètres de production et de formulation.

Nous nous attacherons dès lors de comprendre le mécanisme de modification des structures au cours du temps et de caractériser l'influence des paramètres de fabrication sur cette évolution.

II) – 3 Évolution temporelle des émulsions de monolinoléine/limonène

Note : sauf indication contraire, tous les échantillons ont subit la même histoire en termes de condition de préparation et de conditions de stockage.

II) – 3 – 1 Évolution de la structure interne

Après avoir suivi la stabilité de la taille des émulsions en fonction du temps, il est apparu nécessaire de s'assurer également de la stabilité des structures émulsifiées à long terme. Nous avons pu suivre l'évolution des structures internes des Isasomes contenant du limonène par SAXS, sur synchrotron, sur une durée d'environ 50 jours (figure 56).

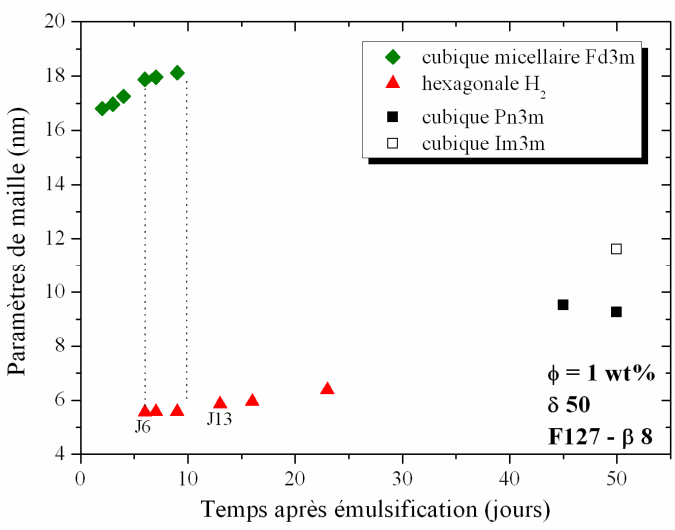


Figure 56 : Évolution de la structure des Isasomes et de leurs paramètres de maille en fonction du temps.

Stabilisés par du F127 à δ50, φ=1 % et β=8 %.

Nous constatons pour une dispersion à δ50 (φ=1 %), stabilisée par le F127, que la structure interne évolue très fortement sur l'intervalle de temps choisi. Après deux jours de fabrication l'émulsion est organisée sous forme micellaire cubique Fd3m, le paramètre de maille augmente jusqu'à 6 jours. Dès lors la structure évolue en une phase hexagonale. Le paramètre de maille des Hexosomes augmente également au cours du temps jusqu'à ce que la structure interne devienne cubique (symétrie Pn3m puis un mélange Pn3m / Im3m).

L'augmentation du paramètre de maille dans une même phase est similaire à l'évolution du paramètre de maille en fonction de l'augmentation du δ, démontrée par Guillot et coll. [93] (figure 57).

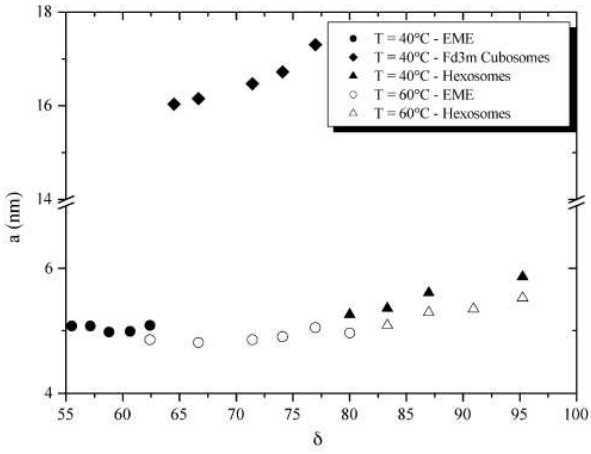


Figure 57 : Évolution du paramètre de maille de différentes structures en fonction du paramètre δ .

Stabilisé par du F127, φ=10% et β=8 %.

L'évolution temporelle du système étudié dans la figure 56 est donc similaire à une augmentation virtuelle du paramètre δ. Cela est d'autant plus vrai qu'à 45 jours les particules deviennent des Cubosomes, d'abord de type Pn3m puis au bout de 50 jours, de type Im3m après intégration progressive du F127 dans les structures.

Deux hypothèses peuvent donc être avancées pour expliquer la modification des structures internes au cours du temps :

- Une dégradation de la tête hydrophile du lipide (glycérol) et l'apparition progressive d'acide oléique dans la phase interne. Cependant, il a été montré que l'augmentation du rapport acide oléique/monooléine transforme les particules de Cubosomes vers des particules représentées par de plus basses valeurs de δ (exemple Hexosome) [89], c'est-à-dire dans le sens inverse du phénomène observé ici. L'évolution du système n'est donc pas due à une dégradation progressive du lipide, car elle ne conduit pas vers des structures de courbures plus négatives (Cubosomes bicontinus).

- Le seul autre constituant capable d'expliquer ce phénomène est donc le limonène. Une dégradation ou une évaporation du limonène entraînerait une concentration plus importante de monolinoléine dans la phase dispersée et donc à une valeur de δ plus grande. Cette conclusion est donc en parfait accord avec le phénomène observé de changement de structure interne mimant une augmentation du δ. De plus, lors d'une émulsification, l'obtention de Cubosomes n'est possible qu'à de très faibles quantités de limonène (< 5 % de la mésophase) ou plus simplement sans limonène (δ100) (Figure 26). Il apparaît donc que le phénomène observé dans le temps est associé au limonène, qui peut soit sortir de la structure par évaporation, soit se dégrader en différents sous-produits. Une première indication porte sur les particules finalement obtenues après 50 jours ; on retrouve le mélange de Cubosomes Pn3m et Im3m d'une émulsion à δ100 déjà décrite dans la littérature et avec la même valeur du paramètre de maille de la phase Pn3m à 9,3 ηm [93]. Cela pourrait signifier qu'après 50 jours de stockage, le limonène a complètement disparu de la structure interne.

Il est à noter qu'aucune évolution des structures dans le temps n'a été observée précédemment avec les Isasomes contenant du tetradécane, molécule très stable avec un point de vaporisation élevé. Concernant les études antérieures utilisant du limonène, les structures ont souvent été analysées juste après l'émulsification, sans étude sur la stabilité à long terme de la structure interne. Les changements de structure interne dépendent ainsi de la molécule intégrée aux Isasomes (drogue ou toute autre molécule permettant de modifier la courbure interfaciale).

II) – 3 – 2 Confirmation de la perte de limonène au cours du stockage.

Afin de confirmer notre hypothèse de perte du limonène au cours du temps, nous avons utilisé deux techniques permettant de la tracer.

- Suivi de la disparition du limonène par spectroscopie Infra-Rouge (IR).

Le spectre Infra-Rouge du R-(+)-Limonène a été mesuré seul et est présenté dans la figure 58.

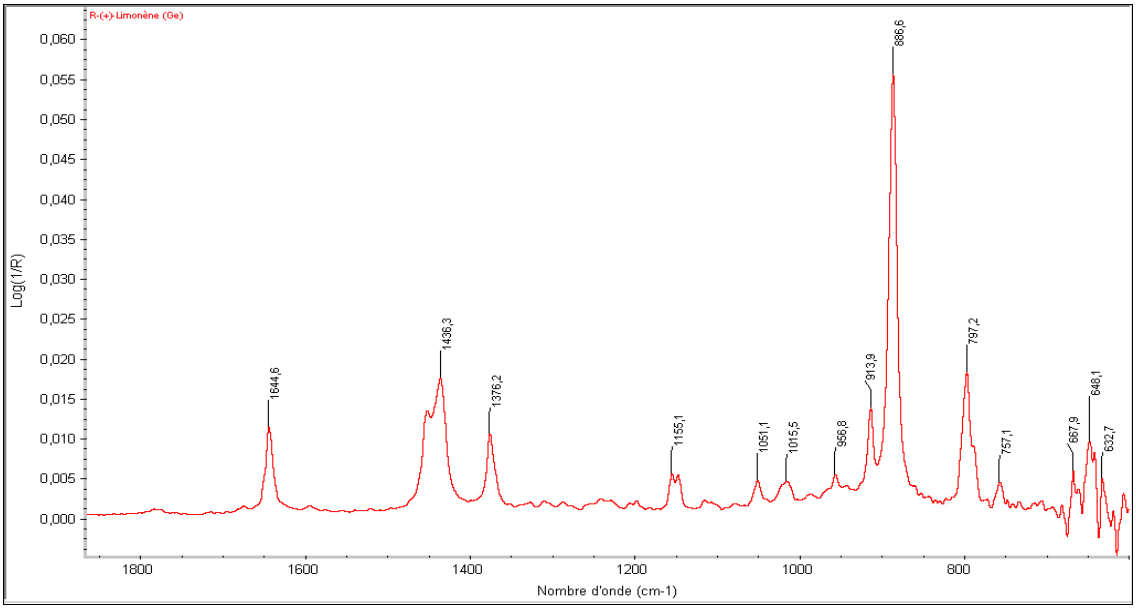


Figure 58 : Spectre Infra rouge du R-(+)-Limonène.

Trois pics sont caractéristiques de la molécule, à des nombres d'onde de 1644 cm^{-1} pour la liaison C=C, à 1436 cm^{-1} pour la liaison CH_2 du cycle et à 886 cm^{-1} pour la vibration de la liaison C-H du groupe méthyle terminal hors plan.

Afin de choisir quel pic serait le meilleur indicateur de la quantité de limonène présente dans l'émulsion, nous avons observé la variation des pics caractéristiques pour trois valeurs de δ (δ50, 80 et 100), c'est-à-dire pour trois concentrations de limonène.

La figure 59 présente le spectre IR des émulsions de F127 à δ50, 80 et 100.

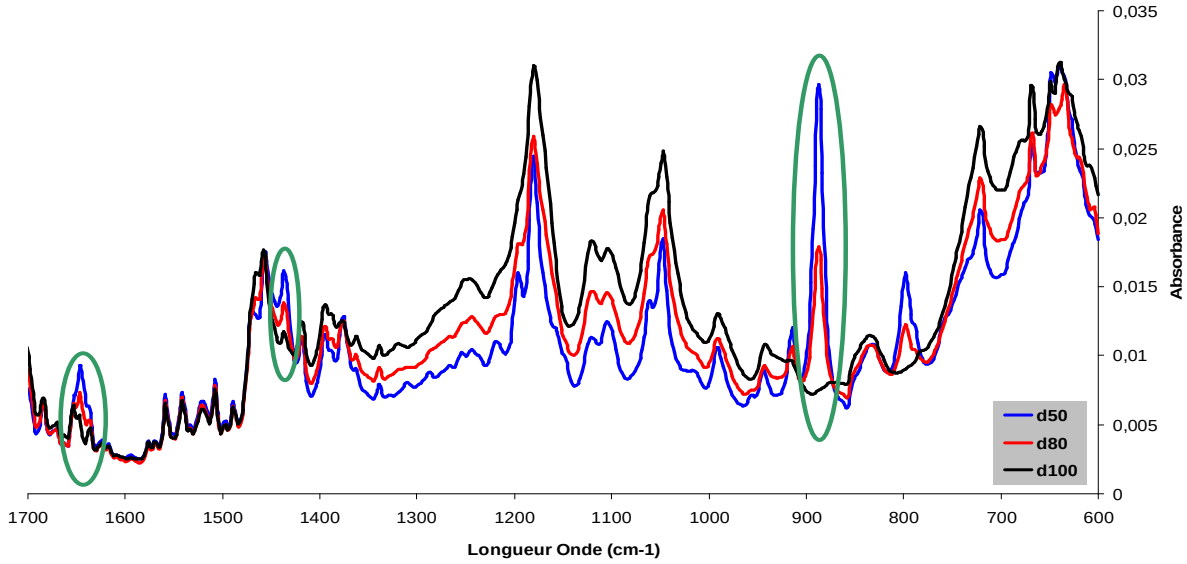


Figure 59 : Spectre d'absorption IR d'Isasomes à δ50, 80 et 100, stabilisé par du F127.

Les cercles verts soulignent les pics caractéristiques du R-(+)-Limonène.

Il apparaît clairement que le pic à 886 cm^{-1} est le plus aisé à distinguer et à mesurer. Nous avons donc décidé de suivre, comme indicateur de la quantité de limonène présent dans l'émulsion, l'aire du pic entre 877 et 898 cm^{-1}, caractéristique de la liaison C-H du groupe méthyle terminal hors plan, au cours du temps pour une émulsion stabilisée par du F127 à δ50, φ=1 % et β=8 %. La figure 60 décrit la décroissance de l'aire du pic à 886 cm^{-1}, expliquant la diminution de la quantité de limonène présente dans l'émulsion au cours du temps.

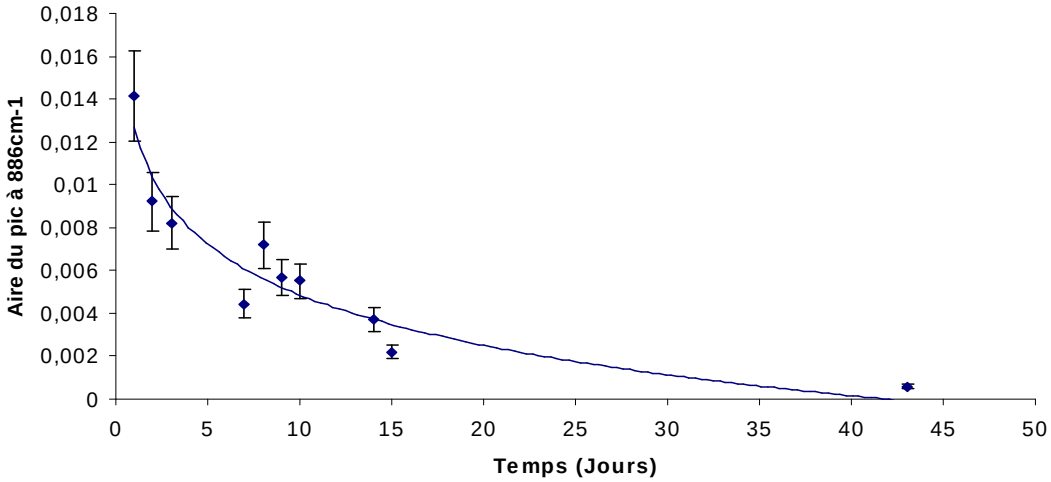


Figure 60 : Évolution de l'aire du pic entre 877 et 898 cm^{-1}, caractéristique du limonène en fonction du temps.

Stabilisation par du F127 à δ50, φ=1 % et β=8 %. Ecart type moyen de 15% calculé à partir de 5 mesures pour chaque point.

Même si le protocole utilisé ne nous permet pas de déterminer précisément les quantités de limonène perdues, nous pouvons affirmer que c'est bien le limonène qui est responsable du changement de structure des Isasomes au cours du temps. La décroissance continue du pic caractéristique du limonène par IR prouve la disparition du limonène. Cependant, nous ne pouvons pas encore conclure sur son évaporation ou sur la dégradation de la molécule.

- Suivi de la disparition du limonène par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

Pour confirmer le mécanisme de disparition du limonène, c'est-à-dire entre son évaporation des Isasomes ou de sa dégradation au sein des particules, nous avons réalisé des expériences de RMN liquide. Nous avons comparé des spectres RMN du limonène dans du chloroforme deutéré, de la monolinoléine dans le DMSO et d'une émulsion à δ50 préparée dans du D_2O.

La première étape a consisté en la détermination des pics caractéristiques du limonène qui nous permettra de suivre sa présence, sa dégradation ou son évaporation au cours du temps. Nous avons donc superposé (figure 61) les spectres du limonène seul, de la monolinoléine et d'une émulsion à δ50.

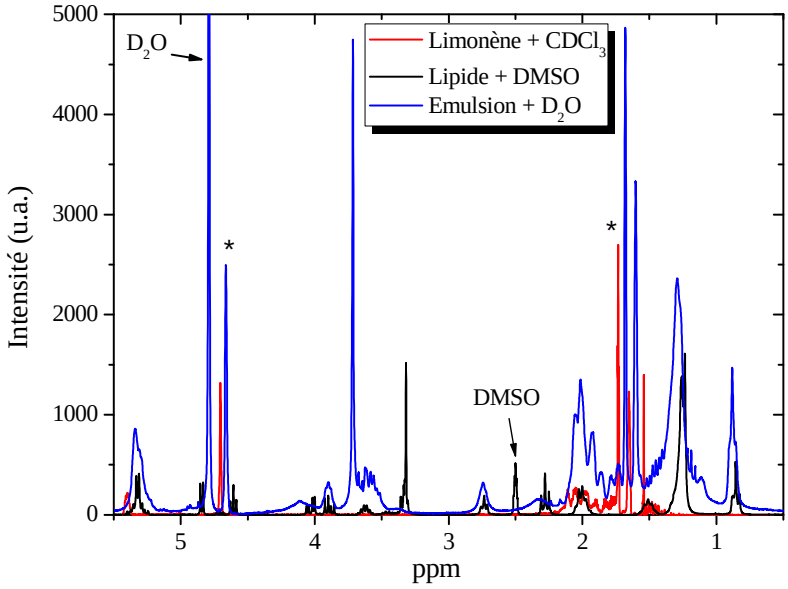


Figure 61 : Spectres RMN du limonène dans du chloroforme deutéré ($CDCl_3$: 7,26 ppm), de l'émulsion préparée dans du D_20 (4,79 ppm) et du lipide dans du DMSO (2,5 ppm).

Analyse à J+1.

Les pics caractéristiques du limonène (courbes rouges) ont été choisis comme étant ceux présents à 1,6 ; 1,8 et 4,7 ppm (astérisques sur la figure 61).

Le procédé d'émulsification par sonication est un traitement sévère qui pourrait avoir un impact sur la dégradation de molécule sensible, telle que le limonène. Nous avons donc observé si cette sonication avait un effet sur la stabilité du limonène. La figure 62 montre le spectre RMN du limonène dans du chloroforme deutéré ayant subit ou non une sonication et après 15 jours de stockage à 4°C ou à température ambiante.

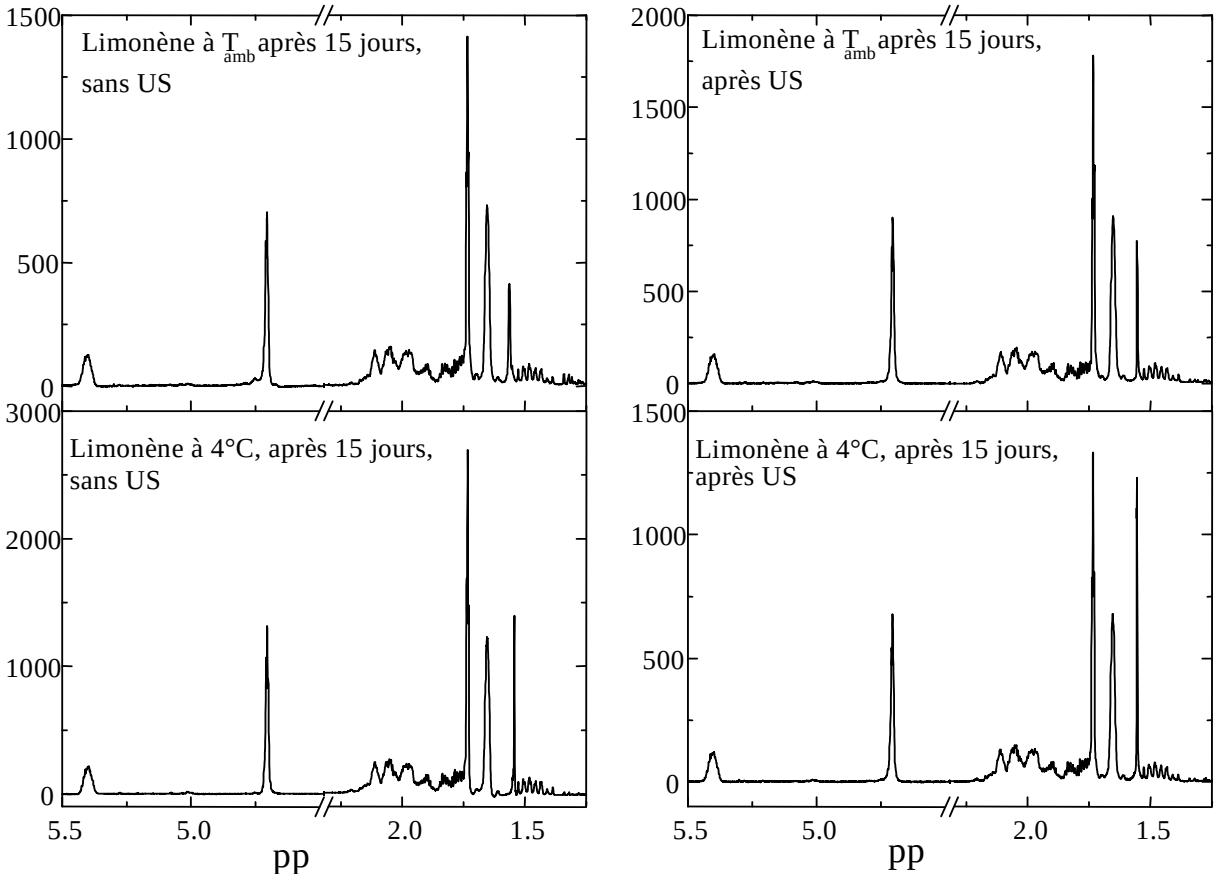


Figure 62 : Comparaison de spectres RMN du limonène dans le $CDCl_3$ sans ultrasons (à gauche) et après ultrasons (à droite), après 15 jours de stockage à température ambiante (en haut) ou à 4°C (en bas).

Analyse à J+15.

Tout d'abord, nous n'avons pas observé de différences (apparition ou disparition de pics) entre les spectres d'échantillons stockés à 4°C ou à T_{amb} après 15 jours sans ultrasons appliqués ; le limonène conserve ainsi son intégrité dans le temps. Ensuite, nous avons

comparé des échantillons de limonène avant et après application des ultrasons pendant une durée de 8 minutes : là encore aucune différence n'a été trouvée ; ainsi, les ultrasons ne dégradent pas le limonène.
Ces résultats montrent donc que le limonène n'est pas dégradé dans le temps, avec ou sans traitement ultrasons. Il est donc nécessaire de suivre l'intensité des pics caractéristiques du limonène en émulsion en fonction du temps pour confirmer son évaporation.

Ainsi, nous avons comparé les spectres d'une émulsion à δ50 après sa fabrication et après un stockage de 15 jours à 4°C et à température ambiante (figure 63).

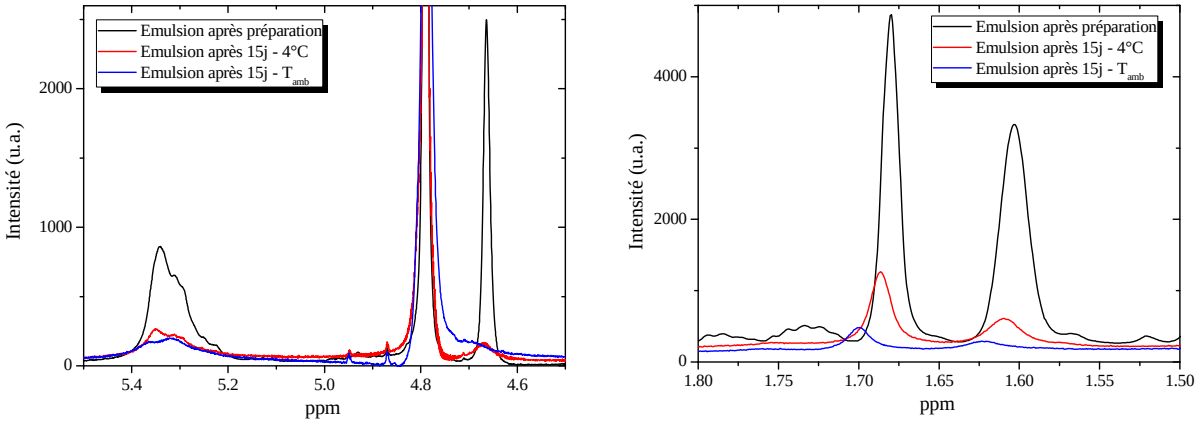


Figure 63 : Diminution de l'intensité RMN des pics du limonène au sein de l'émulsion à δ50 après 15 jours de stockage à 4°C et température ambiante.

Lorsqu'on compare les spectres RMN des émulsions juste après préparation et après 15 jours aux 2 températures de stockage, on remarque que les pics les plus intenses du limonène ont disparu ou diminué en intensité : c'est le cas notamment du pic vers 4,7 ppm qui a très fortement diminué après 15 jours à 4°C et pratiquement totalement disparu à température ambiante. Il en est de même pour l'intensité des deux pics à 1,60 et 1,68 ppm caractéristiques du limonène, qui ont fortement diminué après 15 jours – d'autant plus que la température de stockage est élevée.
Le limonène semble donc s'évaporer au cours du temps. Il est à noter que plus la température de stockage est basse et plus sa disparition des Isasomes est lente.

Les transformations de structures internes des Isasomes décrites dans le temps dans la figure 56 sont donc la traduction de la disparition (par évaporation) du limonène de la structure et non de sa dégradation.
Les expériences ultérieures s'attacheront ainsi à confirmer et décrire l'influence des paramètres de production et de stockage sur la cinétique d'évaporation du limonène. La quantification de ces influences nous permettra de déterminer les leviers disponibles aux formulateurs, afin d'optimiser la rétention de principes actifs à l'intérieur des Isasomes. En effet, le limonène est utilisé ici comme un composant technologique mais il peut également être considéré comme une molécule aromatique d'intérêt, que l'on désire protéger et conserver à l'intérieur des Isasomes. La limitation de l'évaporation du limonène, nous permettra d'améliorer leurs capacités de rétention de principes actifs.

II) – 3 – 3 Influence de l'émulsifiant

Nous avons vu précédemment que le choix de l'émulsifiant était primordial pour la stabilité de l'émulsion au cours du temps. Qu'en est-il concernant leur rôle sur la cinétique d'évaporation du limonène ? Nous avons donc réitéré le suivi par IR du signal du limonène sur 15 jours afin de comparer les cinétiques d'évaporation en fonction de l'émulsifiant utilisé. Puis nous avons suivi l'évolution de la structure des Isasomes au cours du temps et en fonction de ces mêmes émulsifiants.

La figure 64 montre le pourcentage de limonène restant dans l'émulsion en fonction du temps et de l'émulsifiant. Nous avons testé ici l'émulsifiant de référence F127, le sucrose stéarate S1670, ainsi qu'une cire de Carnauba pégylée PEG12 (cire émulsifiante) répertoriée comme ayant un effet filmogène aux interfaces. Il était donc intéressant d'observer si cet effet filmogène permet de ralentir l'évaporation du limonène.

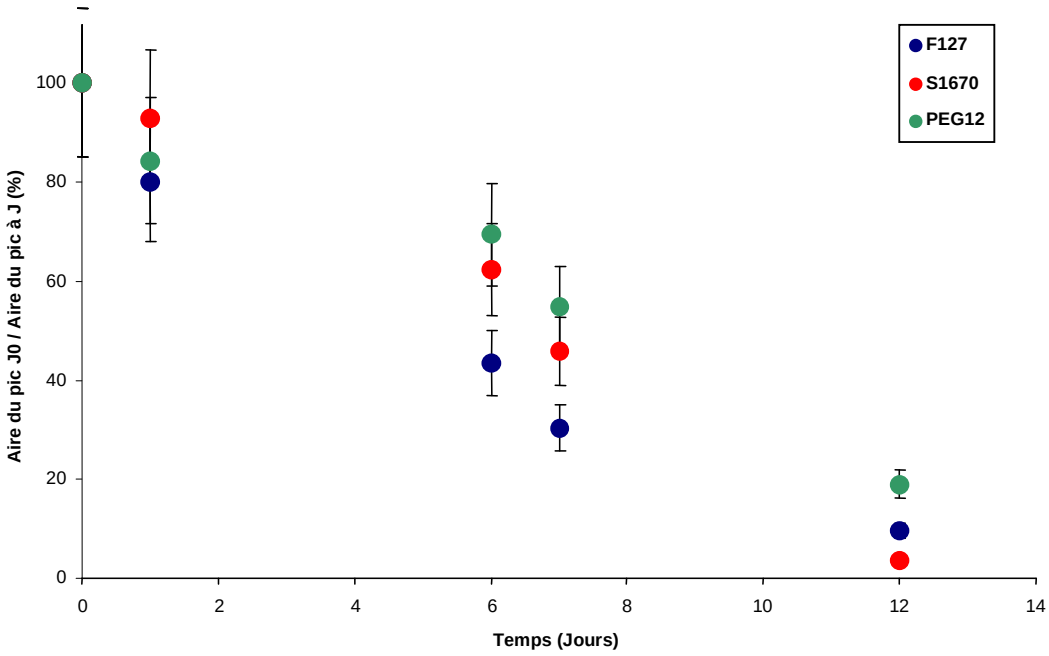


Figure 64 : Rapport, en pourcentage, de l'aire du pic entre 877 et 898 cm^{-1} en fonction de l'aire initiale, en fonction du temps et de l'émulsifiant.

Isasomes préparés à δ50, φ=1 % et β=8 % , stabilisés par du F127, du sucrose stéarate (S1670) ou de la cire de Carnauba pégylée (PEG12).

Durant les douze premiers jours, nous pouvons observer une évaporation plus ou moins rapide du limonène en fonction de l'émulsifiant utilisé. L'analyse des spectres IR dans les conditions opératoires définies dans le Chapitre II, ne permet pas de conclure en des différences de quantité de limonène mais bien en cinétique d'évaporation. Au vu des résultats de la figure 64, il apparaît que la cinétique d'évaporation est linéaire dans les conditions opératoires utilisées.. L'évaporation du limonène des Isasomes formés par les 3 émulsifiants est donc considérée comme linéaire (les coefficients de corrélation linéaire sont respectivement de 0,96 pour le PEG12 et le F127 et de 0,99 pour le S1670). Nous analyserons la valeur de la pente des droites de régression, qui expriment la vitesse de diminution de l'aire du pic en fonction du temps) pour traduire la rapidité avec laquelle le limonène s'évapore des émulsions.

La cire de Carnauba pegylée (PEG12) semble mieux « imperméabiliser » l'interface (pente = -6,2) que le F127 (pente = -7,4) et lui-même mieux que le sucrose stéarate S1670 (pente = -8). La cire de Carnauba pégylée formerait une couche moins perméable à l'interface, réduisant la cinétique d'évaporation du limonène.

L'étanchéité interfaciale est un facteur clé de la capacité des Isasomes à la rétention de molécules hôtes du type du limonène. Les capacités de certains émulsifiants de former une couche interfaciale compacte sont donc d'importance dans l'optimisation des Isasomes en tant que vecteurs.

Nous avons ensuite étudié l'évolution des structures internes des Isasomes en fonction de l'émulsifiant et du temps.

Sur la figure 65 (gauche), nous montrons le cas du S1670 pour une émulsion à δ50 (φ=1 %). Comme nous avons pu l'observer avec le F127 (figure 57), le limonène s'évapore, modifiant la structure interne en fonction du temps ; semblant partir de cubosomes micellaires (Fd3m) pour arriver à des structures cubiques bicontinus après 16 jours.

À l'instar du F127, le S1670 permet d'émulsifier initialement la structure Fd3m, mais la cinétique de transformation est beaucoup plus rapide (obtention des cubosomes bicontinus au bout de 2 semaines seulement). Ceci traduit l'importance de la couche d'émulsifiant dans la cinétique d'évaporation de la molécule odorante qu'est le limonène. Le rôle de cette couche a d'ailleurs été identifié pour l'externalisation d'une molécule hôte (TEMPO) des Isasomes dans la thèse d'Iréna Milosevic [185]. Par ailleurs nous confirmons que le sucrose stéarate est le moins efficace des trois émulsifiants pour la rétention du limonène.

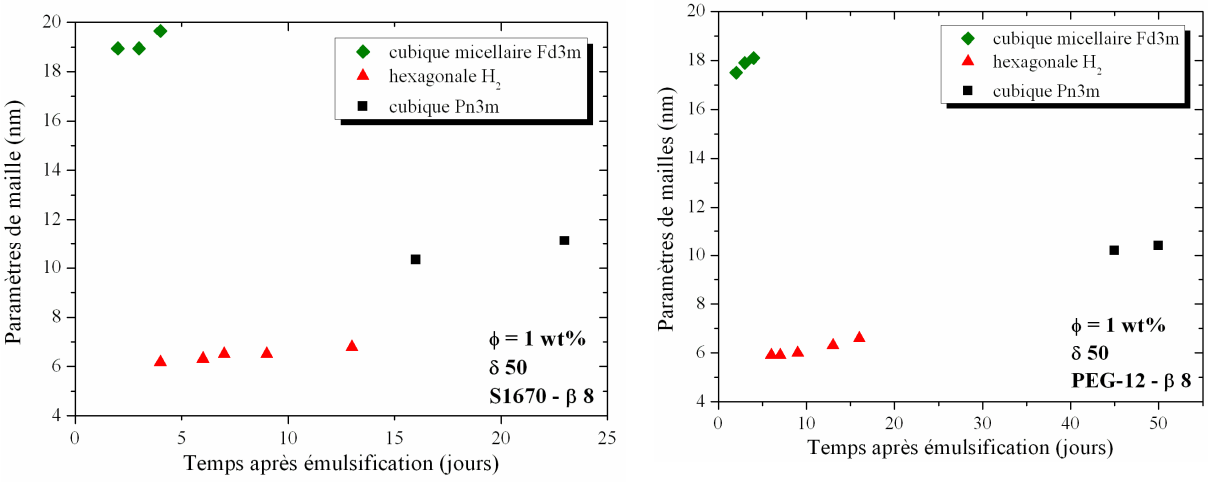


Figure 65 : Évolution de la structure des Isasomes et des paramètres de maille des différentes structures en fonction du temps.

À gauche, stabilisation par le S1670 ; à droite, stabilisation par le PEG-12 stéarate.

Isasomes préparés à δ50, φ=1 % et β=8 %.

Par ailleurs, les paramètres de maille des structures obtenues sont plus importants qu'avec le F127, ce qui indique que le S1670 semble aussi intégrer la structure émulsifiée. Par exemple, après 23 jours, la phase cubique est de type Pn3m a un paramètre de maille de 11,1 nm, ce qui est bien supérieur à celui d'une mésophase cubique monolinoléine/eau à 9,1 nm (figure 52).

La participation du S1670 à la phase dispersée n'est pas étonnante dès lors que le S1670 est une molécule tensioactive à bas poids moléculaire qui peut s'insérer facilement dans la structure.

Il est à noter le rôle de co-émulsifiant des monoglycérides, qui réduisent la séparation entre l'intérieur des particules et la phase continue. Il semble naturel que le limonène disparaisse plus rapidement de la structure interne qu'avec le polymère tribloc F127.

En utilisant la cire de carnauba pegylée pour stabiliser les émulsions, on constate que les Isasomes à δ50 (φ=1 %) se transforment en hexosomes au bout de 6 jours. Le PEG12 semble un peu plus efficace à retenir le limonène que le S1670. De même, le PEG12 interagit moins avec la structure interne que le S1670 (paramètre de maille de 10,4 nm pour la phase cubique bicontinue finale), ce qui confirme les observations faites par IR sur les différentes vitesses d'évaporation du limonène en fonction de l'émulsifiant.

II) – 3 – 4 Influence de la fraction de mésophase

Nous avons suivi ces transformations de structures internes pour une quantité de phase dispersée plus importante, soit φ=10 % (figure 66).

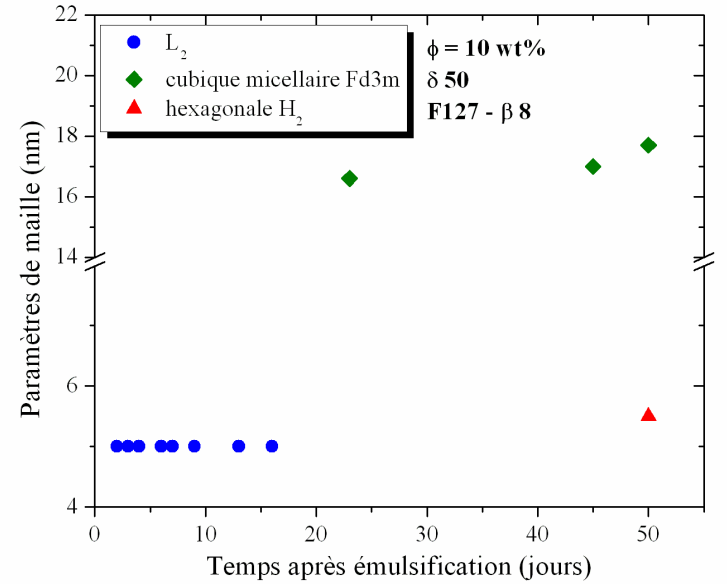


Figure 66 : Évolution de la structure des Isasomes et des paramètres de maille des différentes structures en fonction du temps.

Isasomes stabilisés par du F127, préparés à δ50, φ=10 % et β=8 %.

Pour le F127, la phase émulsifiée à δ50 correspond bien, cette fois, à la phase en volume, de type L_2 décrite dans la littérature. Nous constatons que l'augmentation de φ confère une plus grande stabilité des Isasomes contenant du limonène dans le temps. En effet, la phase L_2 initiale se maintient durant au moins 16 jours et la transition Fd3m-H_2 ne s'effectue qu'après 50 jours, au lieu de 6 jours pour φ=1 % (figure 56).

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette conservation plus longue des structures initiales.

- La vitesse d'évaporation d'une molécule étant positivement corrélée à la surface d'échange, la différence entre les surfaces des gouttelettes à φ=1 % ou φ=10 %, pourrait expliquer ce phénomène. Or, dans les conditions opératoires de notre étude, l'interface d'une gouttelette à φ=1 % est de $1{,}13.10^{-13}$ m^2 alors qu'elle est de $2{,}12.10^{-13}$ m^2 à φ=10 %. Il en est de même pour la surface totale de l'émulsion qui est de 3,2 m^2 à φ=1 % et de 23,1 m^2 à φ=10 %. D'après ces résultats et si l'on considère que le limonène s'évapore plus vite lorsque l'interface totale augmente, alors l'émulsion à φ=10 % perdrait du limonène plus rapidement qu'à φ=1 %. Les transitions de phases seraient donc plus rapides. Or, nous observons le

phénomène inverse. La surface interfaciale n'explique donc pas les conservations plus longues des structures à φ=10 %.

- Si l'on considère que l'évaporation du limonène suit une cinétique constante quelle que soit sa concentration, alors l'émulsion à φ=10 % perdrait tout son limonène 10 fois plus tard que l'émulsion à φ=1 %, car elle contient 10 fois plus de limonène. C'est effectivement ce que l'on observe si l'on suit la transition de phase entre la structure Fd3m et H_{II} des figures 56 et 66. À φ=1 %, la transition a lieu après 6 jours alors qu'elle a lieu après 50 jours à φ=10 %, soit approximativement 10 fois plus tard.

Lorsque la quantité de phase dispersée (φ) augmente, les structures sont conservées plus sur des temps plus longs, car le limonène possède une vitesse d'évaporation constante, indépendante de sa concentration.

Cette observation est confirmée par la figure 67, où le F127 a été remplacé par le sucrose stéarate et la cire de carnauba pégylée.

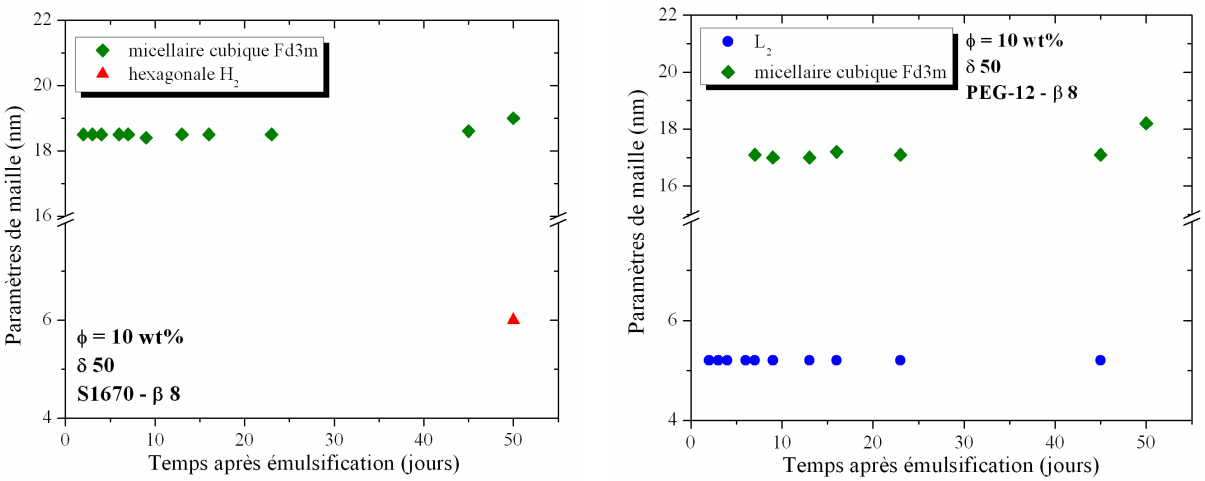


Figure 67 : Évolution de la structure interne des Isasomes et des paramètres de maille des différentes structures en fonction du temps : à gauche, stabilisation par le S1670 ; à droite, par le PEG12.

Isasomes stabilisés par du S1670 et PEG 12, préparés à δ50, φ=10 % et β=8 %.

Cependant, nous pouvons observer des différences dans la localisation temporelle des transitions de phase en comparaison avec le F127. En effet, chaque émulsifiant possède une affinité avec la structure de monoglycéride et une couverture interfaciale spécifiques. Après l'émulsification, le sucrose stéarate stabilise une phase Fd3m, montrant sa plus grande affinité avec la structure, en comparaison avec le F127 qui stabilise une EME.

Le PEG12 stabilise également une EME, mais la transition de phase entre la phase Fd3m et la phase hexagonale n'a pas été observée après 50 jours. Le PEG12 semble donc mieux imperméabiliser l'interface que le F127, ce qui confirme les observations faites par les mesures IR d'évaporation du limonène (figure 68).

II) – 3 – 5 Influence de la température de stockage

Afin de limiter le problème d'évaporation du limonène et donc à l'évolution de la structure interne des Isasomes, nous avons dans un premier temps cherché des conditions de stockage permettant de conserver la structure initiale après dispersion. En effet, les expériences de RMN ont montré qu'un stockage à basse température réduirait la vitesse d'évaporation du limonène.

Nous avons ainsi testé différentes températures de stockage des échantillons (-5, 5 et 25 °C) contenant des structures susceptibles d'évoluer vers d'autres arrangements (δ 50, 70 et 85). Après émulsification, chaque dispersion a été scindée en trois parties, stockées aux différentes températures indiquées avant la mesure par SAXS (figure 68).

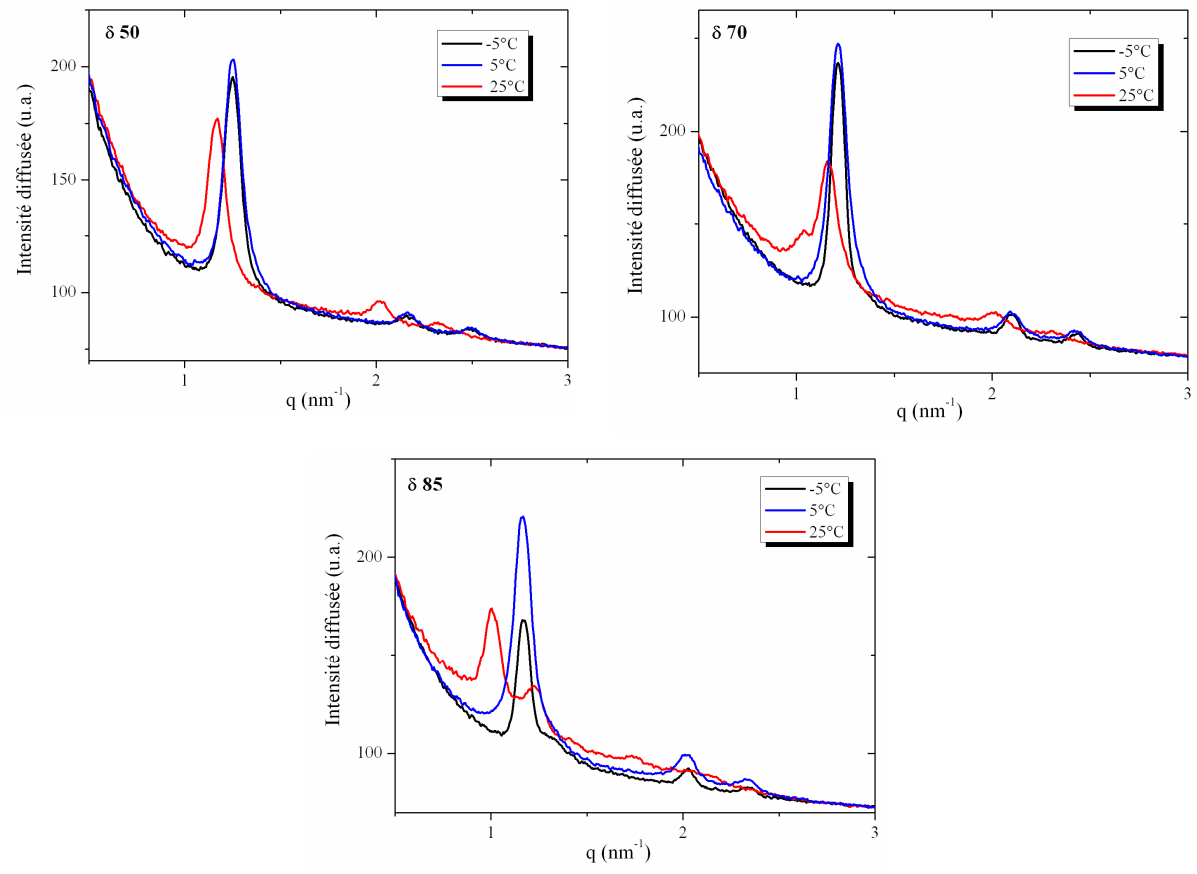


Figure 68 : Influence de la température de stockage de l'émulsion sur l'évaporation du limonène et donc de la structure interne.

Stabilisés par du F127, à δ50, φ=1 % et β=8 % après 14 jours.

On constate que les échantillons placés à -5 et 5 °C ont une structure identique après 14 jours, quelle que soit la valeur de δ : le type de structure est conservé et les paramètres de maille demeurent constants. L'état du système apparaît donc identique à ces deux températures de stockage. La perte de limonène durant le transport des échantillons, à température ambiante, jusqu'au lieu d'analyse, peut expliquer une perte de limonène pour ces deux échantillons. Concernant le stockage à 25°C, nous retrouvons le phénomène explicité précédemment, c'est-à-dire une évolution de la structure interne vers des structures de courbure interfaciale moins négative. Cela se traduit par une augmentation du paramètre de maille (déplacement des pics vers de plus petites valeurs de q) si l'on conserve la même structure (δ50), voire l'apparition de pics de Bragg issus d'une structure additionnelle (δ70), ou un changement de phase (δ85 avec une transition hexagonale/cubique bicontinue).

L’évaporation du limonène de la structure interne des émulsions mène, pour de faibles concentration en limonène, à une phase cubique de type Pn3m (exemple à δ85). Le paramètre de maille de cette phase cubique est de 8,85 ηm, ce qui est très proche de celle de cette même phase pour δ100 qui est de 8,80 ηm. Or à δ100, la formulation ne contient pas de limonène. Cette similitude de paramètre de maille indique donc que le limonène a disparu complètement de l’émulsion initialement à δ85, au cours du stockage de 14 jours à 25°C.

Lors des expériences en RMN (figure 62), nous avions comparé les spectres des échantillons stockés à 4 et 25 °C (température ambiante). Nous avons observé que l’échantillon stocké à 4°C contenait plus de limonène que celui stocké à température ambiante. Néanmoins, une part importante du limonène s’est tout de même évaporé par rapport à l’échantillon mesuré juste après l’émulsification. Ceci confirme les résultats de SAXS (figure 68) qui montre une phase hexagonale à δ50 malgré le stockage à basse température, alors qu’elle était initialement de type Fd3m.

L’évolution de la structure interne des Isasomes contenant du limonène dépend donc très fortement de la température de stockage. La constance du système aux basses températures nous indique que l’amplitude du phénomène lié à la présence du limonène est manifestement corrélée à un certain écart de température. Cependant un stockage à basses températures ne fait que ralentir la perte en limonène et ne la stoppe pas.

II) – 3 – 6 Influence de l’agitation au cours du stockage

Nous avons tenté d’observer si l’agitation de la dispersion avait un effet sur la structure interne des Isasomes. Les échantillons ont été agités 12 heures par jour. La moitié de chaque échantillon a été réservée pour comparaison et n’a subit aucune agitation. La figure 69 montre les intensités diffusées par SAXS pour des Isasomes à δ50 et 70.

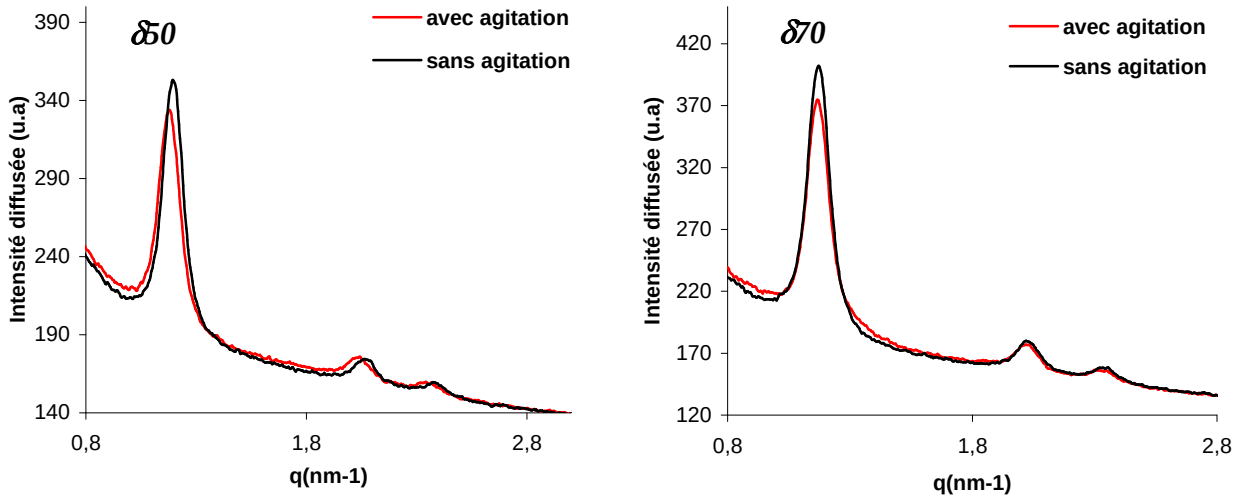


Figure 69: Influence de l'agitation sur des Isasomes à δ50 (gauche), et δ70 (droite).

Stabilisés par du F127, à φ=1 % et β=8 % après 14 jours.

À partir des intensités diffusées aux rayons X des échantillons sélectionnés, nous avons constaté qu'agiter les dispersions avait une faible influence sur l'évolution des émulsions structurées après dispersion. On peut noter que pour δ50 et δ70 les pics des échantillons références sans agitation, sont légèrement supérieurs à ceux ayant subit une agitation. Le décalage des pics vers des plus petites valeurs de q, se traduit par un paramètre de maille plus grand, soit une augmentation virtuelle du paramètre δ, et donc une structuration plus importante. Ainsi à δ50 et δ70, les paramètres de maille de la phase hexagonale des échantillons n'ayant pas subis d'agitation sont respectivement de 6,07 et 6,14 alors que ceux des échantillons agités sont de 6,18 et 6,23.

La figure 70 montre l'effet de l'agitation sur des Isasomes préparés à δ85 (gauche) et la comparaison d'un échantillon à δ85 agité à 25°C ou conservé sans agitation à 4°C (après 14 jours).

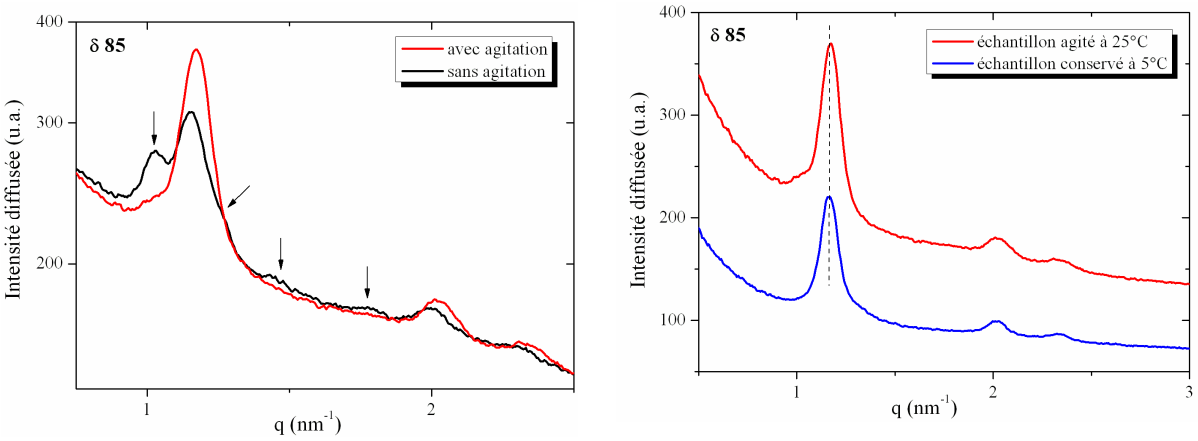


Figure 70: Gauche : Influence de l'agitation sur des émulsions à δ85 à température ambiante. Les flèches indiquent les pics qui correspondent à la phase cubique Pn3m. Droite : Comparaison entre un échantillon agité à 25°C et un échantillon conservé sans agitation pendant 14 jours à 4°C.

Stabilisés par du F127, à φ=1 % et β=8 % après 14 jours.

Après l'émulsification, les Isasomes préparés à δ85 possèdent une structure interne de type hexagonale. Après 14 jours, l'échantillon non agité a vu son limonène s'évaporer, transformant la structure interne en phase cubique bicontinue. L'échantillon agité a, quant à lui, conservé une structure hexagonale, contenant donc toujours du limonène. Dans ce cas, l'agitation a permis de limiter le départ du limonène de la structure. En comparant les spectres de diffusion associés à l'échantillon agité conservé à 25°C et au même échantillon non agité et conservé à 4°C, on constate que les pics de Bragg sont pratiquement aux même positions, démontrant ainsi une structure interne quasi-identique. Ce résultat indique qu'un brassage régulier des hexosomes permet de conserver du limonène en leur sein. Par ailleurs, les pics de diffusion après agitation sont plus intenses, ce qui montre que l'agitation a aussi favorisé l'augmentation du nombre de particules structurées.

L'augmentation de l'intensité des pics de Bragg, dénotant une augmentation du nombre de gouttelettes structurées, due à l'agitation, a également été observé pour des Isasomes préparés à δ100 (et ne contenant donc pas de limonène) (figure 71).

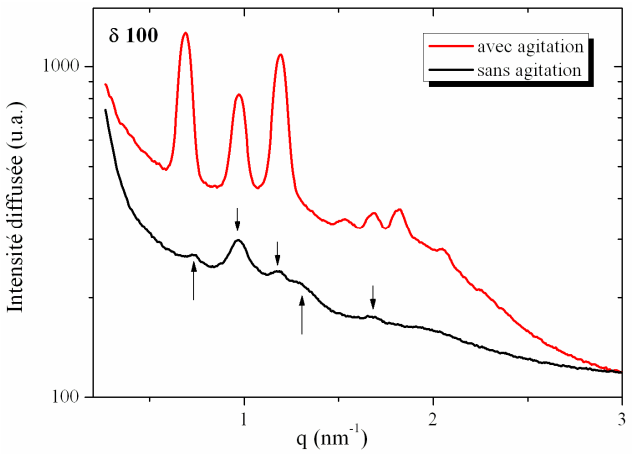


Figure 71: Influence de l'agitation sur des Isasomes à δ100.

Stabilisés par du F127, à φ=1 % et β=8 % après 14 jours. Les flèches orientées vers le bas correspondent aux pics issus de la phase Im3m, et vers le haut de la phase Pn3m.

Sans agitation, des Cubosomes de deux types coexistent, de symétries cubiques Pn3m et Im3m, correspondant à l'intégration du F127 dans la structure. Cette intégration de l'émulsifiant est grandement facilitée lorsque l'échantillon est agité. En effet, après 14 jours, l'échantillon agité ne contient plus qu'une structure de type cubique bicontinue de symétrie Im3m. De même, l'intensité des pics à fortement augmentée, dénotant une quantité beaucoup plus grande de particules srtucturées.

Les conditions de stockage (agitation et température) ont donc une importance primordiale sur l'évolution de la structure interne des Isasomes. De plus ces influences ne sont pas équivalentes en fonction de la structure interne.
Globalement, l'agitation régulière des échantillons après émulsification va permettre d'obtenir un nombre plus important de gouttelettes structurées.

Ainsi, il est primordial de ne plus définir un Isasome seulement par son paramètre δ mais bien par :

- son couple molécule structurante/huile (ici monolinoléine/limonène),
- ses quantités initiales de monolinoléine/limonène (δ initial),
- ses molécules hôtes ajoutées,
- sa quantité de phase dispersée (φ),
- l'émulsifiant utilisé ainsi que sa concentration (β),

- ses conditions de stockage (temps, température, agitation).

Contrairement à ce que laisse transparaître la littérature, les Isasomes ne sont pas des systèmes figés et mais bien des systèmes évolutifs. Il convient dès lors de prendre en compte et de définir pour chaque étude ses conditions de préparation et de stockage.
Nous nous sommes attachés à décrire l'influence de plusieurs paramètres de préparation et de stockage afin de connaître au mieux la structure interne des Isasomes (monolinoléine/limonène). Cette connaissance approfondie, nous permet désormais d'étudier leurs comportements lors de l'ajout de molécules hôtes et ainsi étudier leurs capacités de vecteur et leur limite d'utilisation.

Chapitre 4 :

APPLICATIONS DES ISASOMES

Les Isasomes sont des objets très complexes et sensibles à un grand nombre de paramètres tels que : les conditions de préparation et/ou de stockage. Nous avons donc caractérisé l'impact de tous ces paramètres sur leur structure et leur évolution. Ces mésophases émulsifiées de monolinoléine/limonène peuvent maintenant être testés en tant que vecteur. Nous avons donc voulu observer l'influence de l'ajout de molécules hôtes sur les structures internes, puis l'importance de la perméabilité interfaciale afin de tester ces Isasomes en biologie cellulaire.

I) Solubilisation de molécules hôtes

Nous avons décrit dans le chapitre précédent, les conditions opératoires qui permettent d'obtenir des émulsions stables, utilisables comme réservoirs à principe actif. Avant de conclure à leur véritable capacité vectorisatrice, il convient de tester le comportement de ces Isasomes à un ajout de molécule hôte ou dans un milieu complexe. Nous avons voulu vérifier l'impact de principes actifs comme des molécules aromatiques, des huiles, des vitamines, des molécules de différentes tailles, solubilités et fonction ; sur la structure interne des Isasomes.
Nous avons ajouté à des Hexosomes (δ85) et des Cubosomes (δ100) à φ=5 %, 10 % de chaque molécule hôte (en masse par rapport à la masse initiale de phase dispersée). Ces Isasomes ont été stabilisés par l'émulsifiant F127.

Nous avons mesuré, après huit jours de vieillissement, l'impact des molécules hôtes sur les structures internes en comparaison aux Isasomes seuls. Les proportions utilisées (φ=5 %, 10% de molécule hôte) nous permettent de réduire l'impact sur les changements de structures liées à l'évaporation possible de certaines des molécules hôtes, à l'instar du limonène. Comme nous l'avons montré dans le chapitre III partie II)–3-4, le fait d'avoir un pourcentage de phase dispersé élevé permet de ralentir les phénomènes d'évaporation, ou du moins de masquer leurs impacts sur la variation du paramètre de maille au cours des premiers jours de stockage.

La Figure 72 montre les paramètres de mailles des structures identifiées par SAXS pour des émulsions à δ100 + 10 % de molécule hôte.

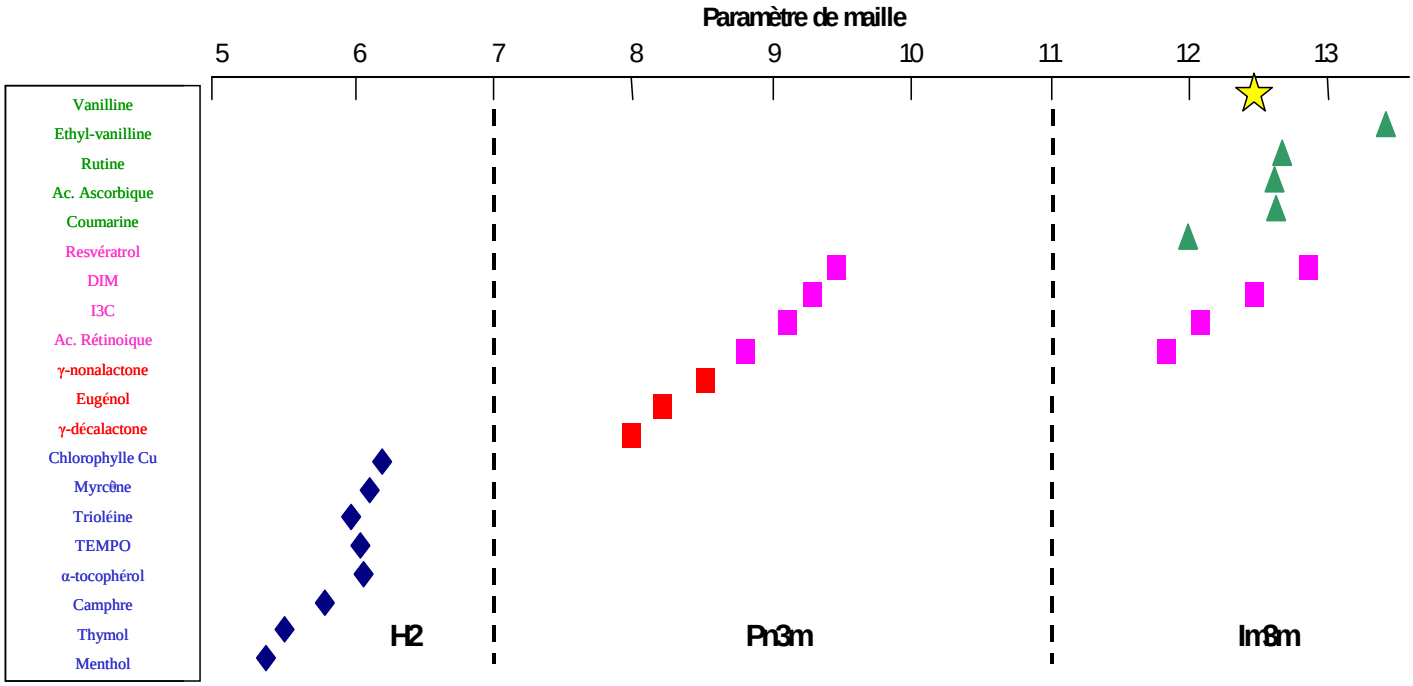


Figure 72 : Paramètres de maille des mésophases émulsifiées à δ100, additionnées de 10% de molécules hôtes.

φ=5 % et β=8 % analysés à J+8. ☆ : Paramètre de maille de référence pour un Cubosome sans molécule hôte (12,4 ηm)

L'ajout de molécules hôtes de différentes formes, tailles et solubilités, entraîne une très forte variation de la structure interne des émulsions à δ100. En effet, l'ajout de certaines molécules comme le menthol, modifie la structure interne en une phase hexagonale. Cela nous permet de dire que cette première classe de molécule joue le même rôle que le limonène, et permet de moduler la structure interne des Isasomes. À l'inverse, l'addition d'autres molécules comme la vanilline, n'entraîne que peu de modifications du paramètre de maille de la phase Im3m, en comparaison avec le Cubosome de référence sans ajout de molécule hôte.

Les observations de l'influence de l'ajout de ces molécules sur des émulsions à δ85 sont synthétisées dans la figure 73.

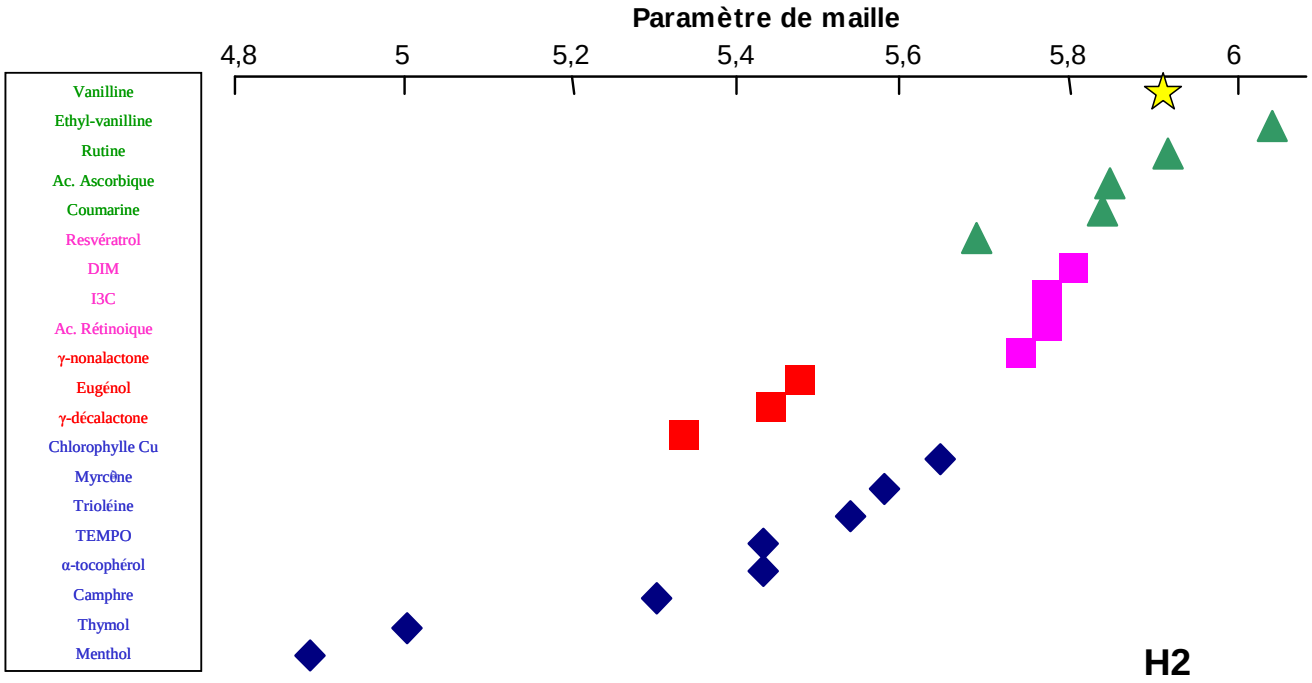


Figure 73 : Paramètres de maille des mésophases émulsifiées à δ85, additionnées de 10 % de molécules hôtes.

φ=5 % et β=8 %, analysés à J+8. ☆ : Paramètre de maille de référence pour un Hexosome sans molécule hôte (5,9 ηm)

Comme dans le cas des Isasomes à δ100 (figure 72), les molécules hôtes testées possèdent des influences diverses sur une émulsion à δ85. Là encore, le menthol ou le thymol (molécule proche du limonène), ont tendance à diminuer le paramètre de maille de la phase hexagonale, et donc de se déplacer vers les plus petits δ dans le diagramme de phase du mélange monolinoléine/limonène. D'autres molécules comme la vanilline ou la rutine, n'ont que peu d'influence sur le paramètre de maille de la phase hexagonale, en comparaison à l'Hexosome sans molécule hôte.

Ces premiers résultats nous permettent de classer ces différentes molécules en 4 grandes classes (Tableau VI).

Tableau VI: Classification des molécules hôtes en fonction de leurs influences sur la structure interne des émulsions à δ85 et δ100.

Diminution du paramètre de maille

Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Vanilline	Resvératrol	Gamma-Nonalactone	Chlorophylle Cu
Ethyl-vanilline	DIM	Eugénol	Myrcène
Rutine	I3C	Gamma-Décalactone	Trioléine
Ac. Ascorbique	Ac. Rétinoïque		TEMPO
Coumarine			Alpha-Tocophérol
			Cardamome
			Camphre
			Thymol
			Menthol

- Classe 1 (en vert).

Les molécules de la classe 1 ne modifient que peu le paramètre de maille de référence lorsqu'elles sont ajoutées à des Hexosomes ou Cubosomes à δ85 et δ100. Lors de leur ajout à un Cubosome à δ100, la structure Im3m est conservée. Ces molécules sont très solubles dans l'eau et doivent donc se situer à l'intérieur des canaux d'eau et peu présentes à l'interface. Cependant, on peut observer une diminution du paramètre de maille en partant de la Vanilline, jusqu'à la Coumarine et en passant par la Rutine. Cette diminution de paramètre de maille peut être expliquée par leur, plus ou moins grande, volume adopté dans les canaux d'eau, les forçant à moduler leur taille.

- Classe 2 (en rose) et Classe 3 (en rouge).

Les molécules de la classe 2 font légèrement diminuer le paramètre de maille de la phase hexagonale lors de leur ajout à un Hexosome à δ85. Lors de leur utilisation avec un Cubosome à δ100, la mésophase n'est plus totalement arrangée en symétrie Im3m. En effet, un mélange de symétries Pn3m/Im3m, avec prédominance du premier arrangement est présent.

Les molécules de la Classe 3 font notablement diminuer le paramètre de la phase hexagonale à δ85 et modifient complètement la symétrie cubique à δ100 en structure Pn3m.
Ces légères différences de structures internes en comparaison avec la référence, laissent à penser que ces molécules se situent aux abords de l'interface. Le plus souvent ces molécules ont une solubilité à la fois dans l'eau et dans l'huile.

- Classe 4 (en bleu)

Cette dernière classe de molécules hôtes modifie considérablement l'arrangement des auto-assemblages de monolinoléine émulsifiés. En effet, le paramètre de maille de la phase hexagonale à δ85 est très inférieur à celui de la référence (5,9 ηm), allant même jusqu'à 4,9ηm, lors de l'ajout de menthol. Cette influence des molécules hôtes est encore plus remarquable lorsqu'elles sont ajoutées à un Cubosome à δ100. En effet, la structure cubique bicontinue est transformée en phase hexagonale. Ces molécules jouent le même rôle que le limonène et permettent de moduler la structuration interne des Isasomes. Elles sont donc solubilisées dans les chaînes lipophiles d'acides gras des molécules de monolinoléine ; modifiant leurs auto-assemblages et augmentant la courbure interfaciale. Ces molécules sont le plus souvent des petites molécules très insolubles dans l'eau, comme par exemple le myrcène.

La structure, le poids moléculaire et la solubilité des molécules hôtes, déterminent leur influence sur la structure des Isasomes. Les molécules des classes 1 et 4 influent sur la structure interne des Isasomes de par leur localisation, respectivement, dans les canaux d'eau et dans les chaînes d'acides gras. Les classes 2 et 3 possèdent des influences diverses et variantes en fonction de la formulation. En effet, à δ85 l'Eugénol possède exactement la même structure que le TEMPO, or à δ100, ce dernier forme une phase hexagonale. Le mélange (à δ85) avec le limonène interfère sur l'influence des molécules sur les structures.

II) Imperméabilisation de l’interface

Les Isasomes se sont donc montrés capable de solubiliser de nombreuses molécules d’intérêts nutritionnels, pharmaceutiques ou cosmétiques. Cependant, à l’instar du limonène, certaines d’entre elles peuvent subir un phénomène d’évaporation au cours du temps. C’est pourquoi nous avons voulu tester une stratégie d’enfermement de celles-ci grâce à l’utilisation de molécules à haut point de fusion. Nous nous sommes intéressés aux cires, complexes provenant d’un ester d’acide gras et d’alcool. Ces cires ont généralement été extraites du monde végétal, comme par exemple la cire présente sur la surface des feuilles, permettant de limiter la perte d’eau de la plante lors de grande sécheresse. Cependant, le monde animal utilise aussi ces molécules à des fins différentes. Les abeilles fabriquent une cire lui permettant de construire des nids protecteurs à leur progéniture. Leur point de fusion élevé (aux alentours de 80°C) en fait de solides matériaux résistants à l’eau et à la température. Nous allons donc vérifier si leurs propriétés filmogène et de cristallisation peuvent être appliquées aux Isasomes afin d’augmenter leur pouvoir de rétention.
Nous avons choisi de tester différents types de cires, ayant des compositions (même si elles ne sont pas parfaitement connues) et des caractéristiques de cristallisation différentes. En effet, leurs compositions sont extrêmement complexes et varient notamment en termes de composition en acides gras et en pureté.

II) – 1) Cire d’abeille et cire de Carnauba

Ces deux cires de compositions complexes ont été classifiées dans la classe 3, lorsque nous les avons ajouté à des Hexosomes et Cubosomes à hauteur de 10% (voire partie précédente). C’est-à-dire que ces molécules sont principalement solubilisées dans la partie lipidique de l’émulsion avec peu d’interaction avec la structure de monolinoléine. Cires de productions végétales ou animales, leur composition est complexe et une partie conséquente du mélange possède un point de fusion bien inférieur à 70 °C.

Afin de vérifier leur inclusion dans les Isasomes et leur localisation possible, nous avons réalisé des observations en cryo-MET, après addition de 10 % de cires à des Cubosomes à δ100 (Figure 74).

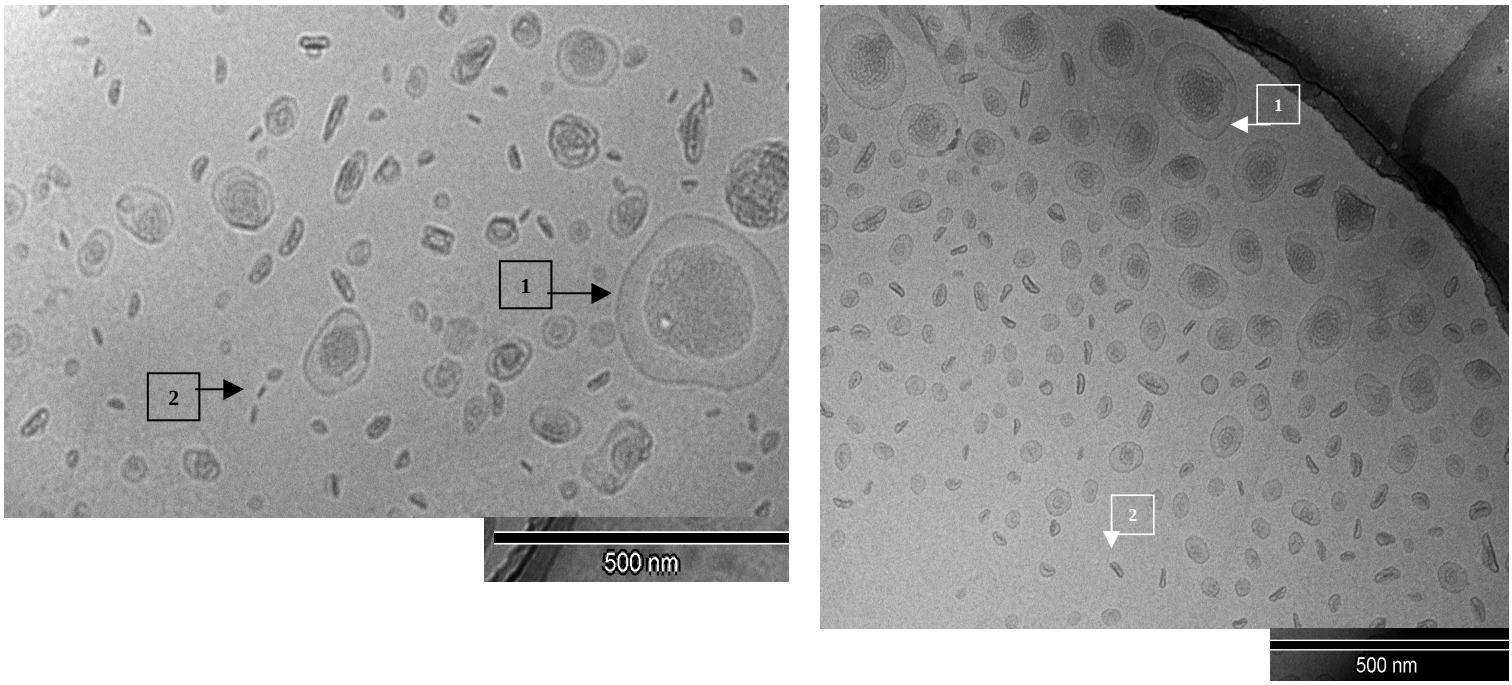


Figure 74 : Image de cryo-MET de Cubosomes à δ100, avec 10 % de cire d'abeille (à gauche) ou de cire de Carnauba (à droite).

Stabilisés par du F127, à φ=1 % et β=8 % après 5 jours. 1 : vésicule large entourant la structure cubique. 2 : Cristaux de cire.

L'observation par microscopie nous permet de constater qu'une très grande partie de ces deux cires sont sous forme de cristaux isolés, non combinés aux Isasomes (encadré 1 - figure 74). Les cristaux sont parfois accolés à une vésicule. De plus, on observe que les Isasomes sont entourés d'une couche non structurée externe importante (encadré 2 - figure 74).
Ces couches non structurées pourraient être constituées de la fraction des cires ayant le plus bas point de fusion et restant sous forme liquide.

Ces cires ne paraissent pas se situer dans ou à l'interface des Isasomes, elles ne semblent donc pas être utilisables afin de limiter le relargage de molécules hôtes inclues dans les Isasomes.
Une cire ayant un point de fusion plus élevée pourrait former de couches externes liquides plus fines et privilégier une coque solide.

II) – 2 Cire de son de riz

La cire de son de riz est extraite de la couche externe du grain de riz (le son), lui servant de coque protectrice. Son point de fusion est élevé, de l'ordre de 88 °C. Nous l'avons utilisé dans les mêmes conditions que les cires précédentes (Figure 75).

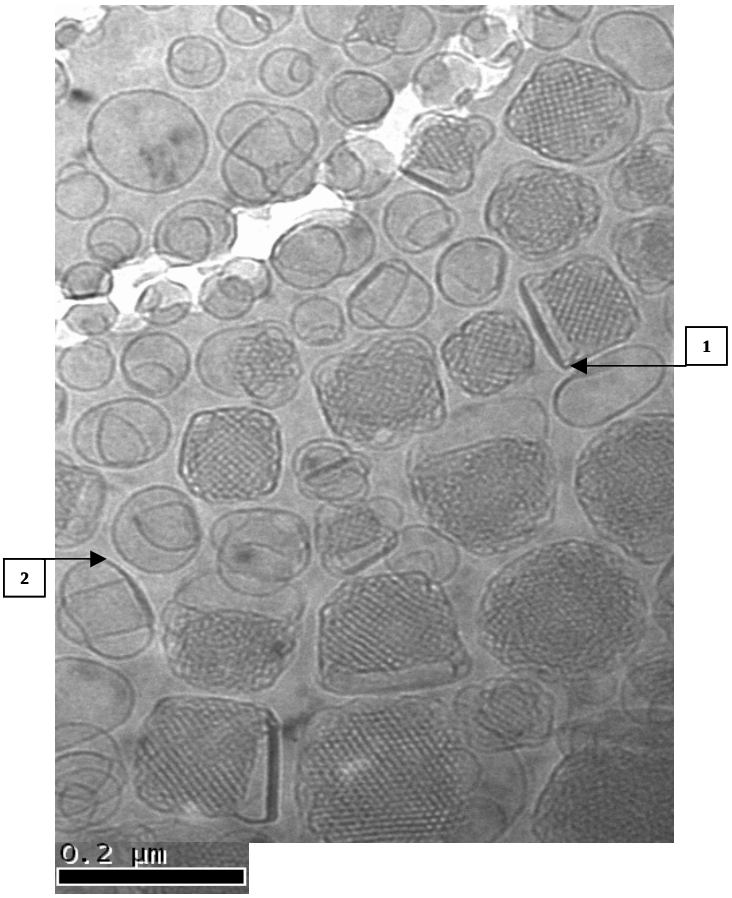


Figure 75 : Image de cryo-MET de Cubosomes à δ100, avec 10 % de cire de son de riz.

Stabilisés par du F127, à φ=1 % et β=8 % après 5 jours. 1 : Cristaux de cire accolés aux cubosomes. 2 : Cristaux de cire collés à des vésicules.

A la différence des cires à plus bas point de fusion, la cire de son de riz ne forme pas de couche externe liquide autour des cubosomes. Seules apparaissent classiquement les petites vésicules de stabilisation décrites dans le Chapitre I (partie II) – 2 – 1). Cependant, de

nombreuses vésicules seules sont présentes dont une fraction est fusionnée avec des cristaux de cires (encadré 2 - figure 75).

De manière très intéressante certains cristaux de cires se retrouvent accolés aux vésicules de stabilisation des cubosomes (encadrés 1 dans la figure 75). Ces cristaux pourraient former une barrière physique limitant les échanges entre les milieux intra et extra-gouttelettes.
Cette présence de cristaux de cire à l'interface des Isasomes a également été montré pour des Hexosomes (Figure 76).

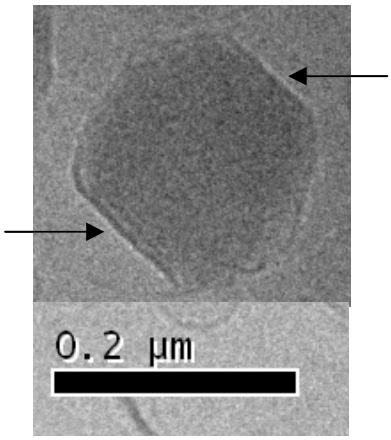


Figure 76 : Image de cryo-MET d'Hexosomes à δ85, avec 10 % de cire de son de riz.
Stabilisés par du F127, à φ=1 % et β=8 % après 5 jours. Les flèches montrent les cristaux de cire présents à l'interface.

Ces observations montrent qu'il serait possible de confiner les Isasomes entre plusieurs cristaux de cire, leur conférant une protection physique et donc d'éventuellement réduire la perte de constituants de la phase dispersée.
Afin de créer une véritable barrière continue à l'interface nous avons voulu tester deux cires émulsifiantes.

II) – 3) Cires émulsifiantes

Les cires émulsifiantes combinent des propriétés de stabilisation interfaciale et de cristallisation, avec un point de fusion élevé. Dans l'objectif de créer une couche cristalline interfaciale, nous avons testé de la cire de Carnauba pégylée (PEG12) et un mélange de composition non connue : CARNICO ayant un point de fusion d'environ 80 °C.
La figure 77 montre les clichés réalisés en cryo-microscopie avec la cire CARNICO (les clichés réalisés avec le PEG 12 sont similaires).

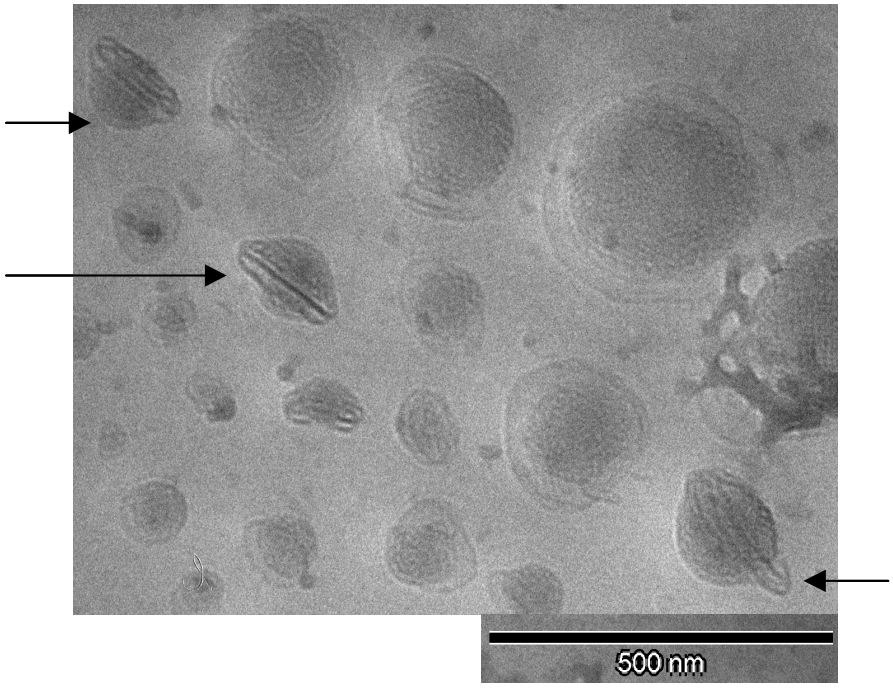


Figure 77 : Image de cryo-MET de Cubosomes à δ100, avec 10% de cire émulsifiante CARNICO.

Stabilisés par du CARNICO, à φ=1 % et β=8 % après 5 jours Les flèches montrent les cristaux de cire présents à l'interface.

Lors de ces observations en cryo-MET en utilisant des cires émulsifiantes, aucuns cristaux isolés n'ont été observés. La totalité des cires mises en œuvre sont donc utilisées aux interfaces des Isasomes. En effet, très peu de vésicules seules ont été observées. Ces cires semblent donc avoir une affinité importante avec les structures des Isasomes. Certains

Isasomes montrent, comme dans le cas d'utilisation de cire à bas point de fusion (cire d'abeille et Carnauba), une couche à la périphérie des Isasomes, probablement liquide, démontrant la solubilisation d'une partie de ces cires à la périphérie des structures.
Cependant, une autre population d'Isasomes montre des structures cristallines de cires d'aspect circulaire, voir annulaire.
Cette structuration notable des cristaux de cires est montrée dans la figure 78.

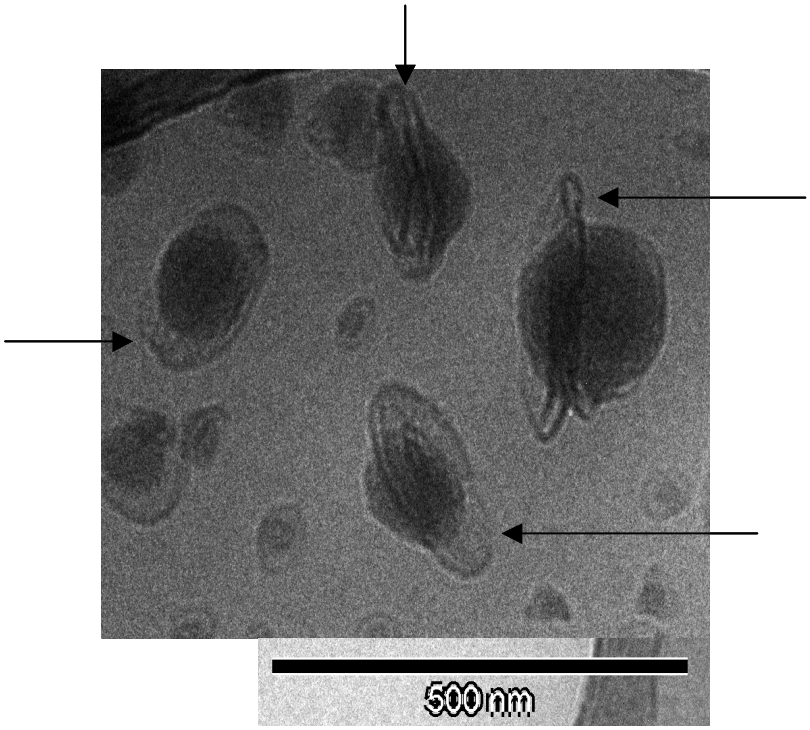


Figure 78 : Image de cryo-MET de Cubosomes à δ100, avec 10 % de cire émulsifiante PEG12.

Stabilisés par du PEG12, à φ=1 % et β=8 % après 5 jours Les flèches montrent les cristaux de cire présents à l'interface.

De manière surprenante, la cire émulsifiante adopte la forme d'un anneau en périphérie directe des Cubosomes.

Nous avons donc testé l'utilisation de cires simples ou émulsifiantes, comme barrière physique implémentable à l'interface des Isasomes. Néanmoins cette surface n'est couverte que partiellement par la cire, et une coque cristalline entière n'a pas été obtenue dans les conditions choisies.. Cependant, des couches liquides ont été visualisées à la périphérie des

Isasomes. Ceci permet d'expliquer pourquoi l'utilisation de la cire de Carnauba pégylée (PEG12) a permis de ralentir la perte de limonène par rapport au F127. Ces cires émulsifiantes seront également testées en vectorisation en biologie cellulaire.

III) Utilisation en biologie cellulaire

III) – 1 Stabilité des Isasomes

Avant de pouvoir utiliser les Isasomes en tant que vecteurs en biologie cellulaire, il convient de vérifier qu'ils sont bien stables dans les conditions d'utilisation. Pour cela, nous avons vérifié que la structure des Isasomes est conservée lorsqu'ils sont incubés dans le milieu de culture cellulaire.

III) – 1 – 1 Stabilité en présence de sérum

Nous avons suivi la conservation des structures internes d'Hexosomes et de Cubosomes après ajout de Sérum de Veau Fœtal (SVF) par SAXS. Des Hexosomes (δ85) et Cubosomes (δ100) âgés de 3 jours et stabilisés par du F127 et du S1670 (φ=1 % et β=8 %), ont été mis en contact avec du SVF, pendant 48 heures.
Après les 48 heures d'incubation, les structures hexagonales et cubiques ont été conservées pour les deux émulsifiants utilisés. Les paramètres de maille des phases ont cependant augmenté avec le temps. Ainsi le paramètre de maille de la phase hexagonale des Isasomes stabilisés par le F127 et le S1670, ont respectivement évolué de 5,99 à 6,09 ηm et de 6,25 à 7,11 ηm. La détermination des paramètres de maille pour les phases cubiques n'a pas pu être effectuée. En effet, la dilution subit par les échantillons a considérablement réduit l'intensité diffusée par l'échantillon. Cependant, même si l'intensité des pics de diffusion est faible, la conservation de la structure cubique reste visible. Les émulsions à δ100, stabilisées par le S1670, semblent tout de même perdre la structure cubique au-delà de 48 heures en présence de SVF.

La durée d'incubation des Isasomes dans le milieu de culture cellulaire n'excèdera pas quelques heures, lors des expériences en biologie cellulaire. On peut donc considérer qu'ils conservent leur structure interne initiale et seront parfaitement utilisables.

III) – 1 – 2 Stabilité du Nile Red inclus dans les Isasomes

La localisation et l'internalisation des Isasomes dans les cellules ont été déterminés par microscopie confocale et visualisation de la fluorescence du Nile Red, préalablement inclus dans les Isasomes. Il a donc fallu vérifier que le Nile Red était bien conservé à l'intérieur des émulsions au cours du temps. Pour cela, nous avons mesuré l'intensité de la fluorescence émise par le Nile Red chargé dans des Hexosomes et Cubosomes, stabilisés par du F127, S1670 et PEG12 (δ85 - δ100, φ=1 % et β=8 %) et stockés durant 15 jours (Tableau VII).

Tableau VII : Variation de l'intensité de fluorescence du Nile Red incorporé dans les Hexosomes et Cubosomes, préparés avec du F127, S1670 et PEG12.

La fluorescence du Nile Red est obtenue en excitant à λ = 550nm et la fluorescence émise est récoltée dans un spectre allant de 560 à 730 ηm. Les valeurs correspondent à l'intensité de fluorescence obtenue. δ85 et 100, φ=1% et β=8 %, stockés à température ambiante.

	δ70		**δ100**	
Age	**1**	**15**	**1**	**15**
PEG12	6	3,75 (-37,5%)	5	5
F127	5	4 (-20%)	6	6
S1670	6	4 (-33,3%)	5	4.5 (-10%)

Nous pouvons observer que le Nile Red est entièrement conservé à l'intérieur des Cubosomes stabilisés par les trois émulsifiants, même si une légère perte d'intensité est à signaler avec l'utilisation du S1670. Le Nile Red est donc protégé de l'oxydation durant au moins 15 jours, à l'intérieur des Cubosomes. Cette observation est différente pour l'inclusion du Nile Red dans des Hexosomes.

En effet, après 15 jours de stockage à température ambiante, l'intensité de fluorescence du Nile Red a diminué, en moyenne de 30%. Durant le stockage, l'évaporation du limonène entraîne un réarrangement continu de la structure interne. Cette instabilité peut être la cause de l'oxydation du Nile Red et donc de la diminution de l'intensité de fluorescence mesurée.

Il convient donc d'utiliser les Isasomes chargés de Nile Red, en vectorisation cellulaire durant les premiers jours après leur fabrication.

Nous avons donc démontré que dans les conditions utilisées lors des protocoles de biologie cellulaire, les Isasomes conservent leurs structures internes lorsqu'ils sont plongés dans du sérum et qu'ils conservent durablement du Nile Red. On peut donc suivre et quantifier la vectorisation par ces particules stabilisées par les émulsifiants F127, S1670 et PEG12. Il convient dès lors de vérifier que ces Isasomes n'induisent pas de toxicité cellulaire lorsqu'ils sont ajoutés au milieu de culture.

III) – 2 Test de toxicités des Isasomes seuls

Nous avons mesuré la toxicité des Hexosomes et Cubosomes, stabilisés par du F127, S1670 et PEG12 après une incubation dans le milieu de culture cellulaire de 1 heure à 37 °C. Les cellules (U87MG) ont ensuite été lavées et le test de viabilité à l'Alamar blue a été effectué. Pour cela nous avons observé la toxicité de ces Isasomes pour des dilutions au 1/125ème, 1/250ème et 1/500ème ; à partir d'une solution de départ à φ=1 %, pour δ70 et δ100, et β=8 % (figure 79).

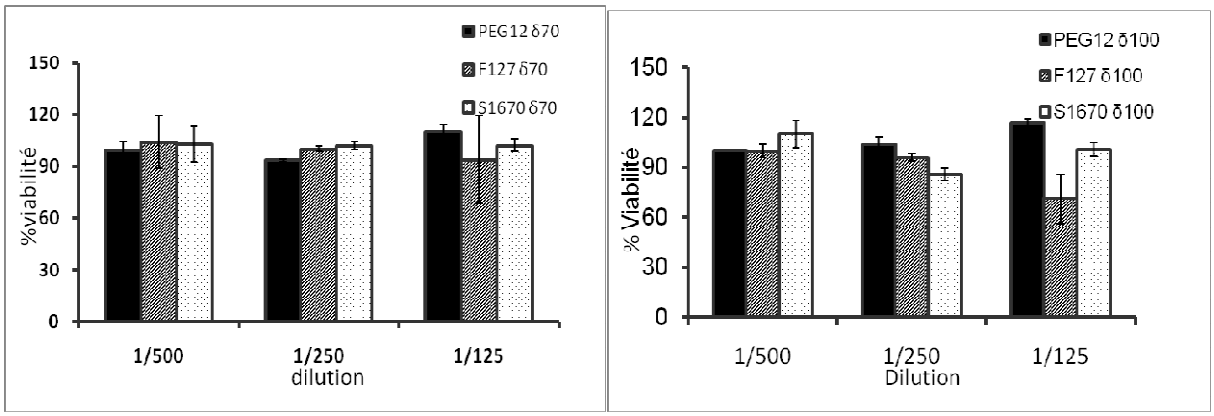


Figure 79 : Évaluation de la toxicité des Hexosomes et Cubosomes préparés avec du F127, S1670 et PEG12 incubé au 1/125ème, 1/250ème et 1/500ème.

Les cellules U87MG sont incubées avec les émulsions pendant 1h à 37 °C. Après lavage, les cellules sont cultivées dans un milieu frais pendant 24h avant d'évaluer la toxicité par le test à l'Alamar Blue. φ=1 % avant dilution, δ70 à gauche et δ100 à droite, β=8 %.

Les Hexosomes et Cubosomes utilisés semblent ne pas induire de toxicité notable aux dilutions testées. Seuls les Cubosomes stabilisés avec du F127 semblent être toxiques pour les cellules U87MG à la dilution 1/125. Nous utiliserons donc par la suite les dilutions 1/250 et 1/500 pour les expériences de vectorisation.

Il est à noter qu'il n'y a pas de différence significative de toxicité entre les Cubosomes et Hexosomes. Ils contiennent, à la différence des Cubosomes, du limonène, qui à de forte dose, est considéré comme toxique. Cependant dans nos conditions opératoires cette toxicité du limonène est inexistante.

À la vue des résultats de la figure 79, les trois émulsifiants utilisés apparaissent comme être équivalent en termes de toxicité cellulaire. Leur utilisation pour la stabilisation des Isasomes est donc confirmée, ils ne sont pas responsables de toxicité propre.

Dans les conditions opératoires utilisées, les Isasomes sont donc quasiment neutres en termes de toxicité cellulaire. Ils peuvent être utilisés comme vecteur. Il convient cependant de décrire leur capacité à être internalisés et à observer leur localisation dans la cellule.

III) – 3 Internalisation des Isasomes

Afin de vérifier la localisation des Isasomes après leur mise en contact avec les cellules, nous avons suivi, par microscopie confocale, leur localisation grâce à la fluorescence du Nile Red, préalablement chargé à l'intérieur des structures (figure 80).

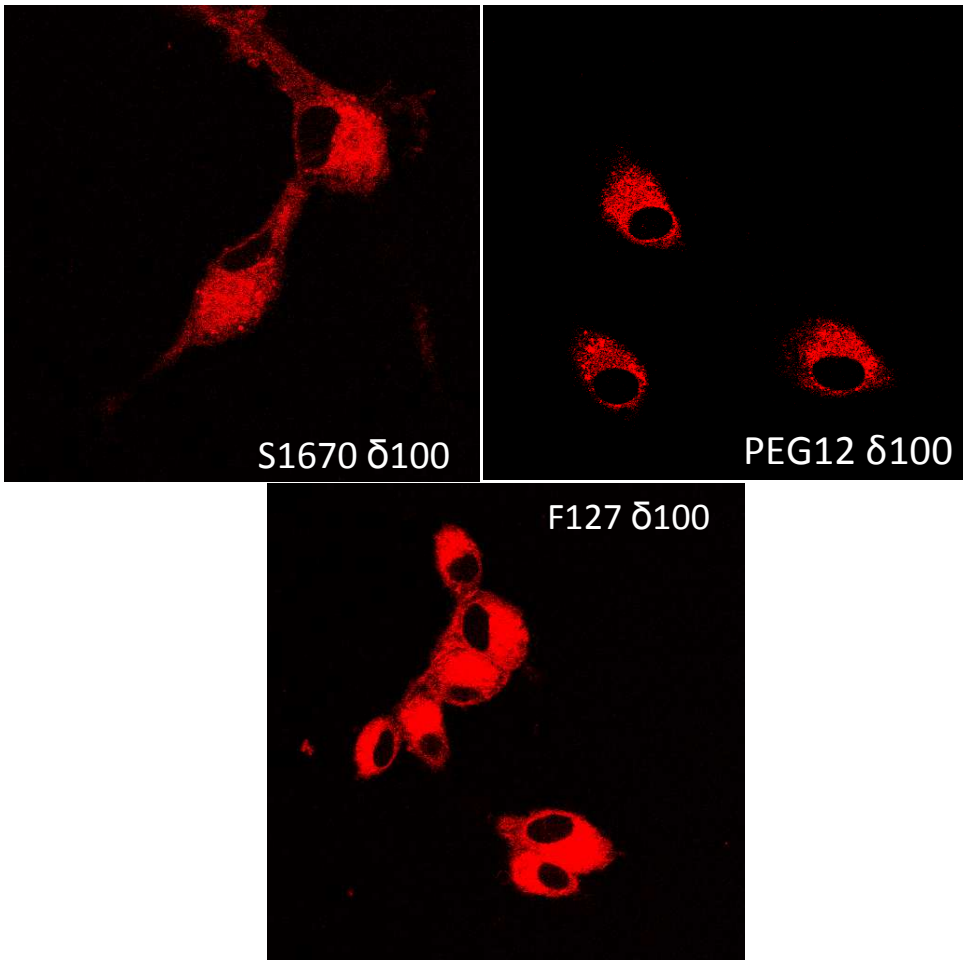


Figure 80 : Localisation cellulaire des Cubosomes stabilisés par du S1670, PEG12 et F127 après 1 heure d'incubation à 37 °C sur cellules U87MG.

Dilution au 1/250ème, δ100, φ=1 % et β=8 %. Microscopie confocale avec fluorescence du Nile Red.

Les images de microscopie confocale de la figure 80, permettent d'affirmer que les Cubosomes ont été internalisés et ce, quelque soit l'émulsifiant utilisé. Ils se localisent dans l'ensemble du cytoplasme et sont stoppés par la membrane nucléaire. Il est à noter que les

Hexosomes sont également internalisés et présents dans le cytoplasme (résultats non montrés).

La figure 81 montre l'intensité de fluorescence du Nile Red contenu dans les Isasomes internalisés, mesurée par cytométrie en flux, en fonction de leur dilution. Après incubation et lavage, pour éliminer les Isasomes non internalisés, les intensités de fluorescence sont mesurées et normalisées.

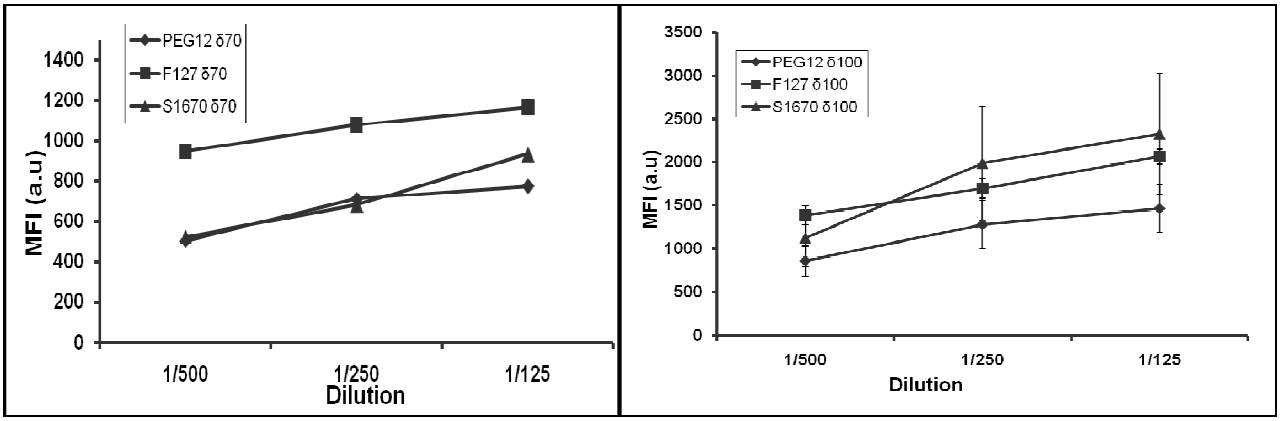


Figure 81 : Mesure de la fluorescence du Nile Red contenu dans les Isasomes internalisés, en fonction de la structure interne et de la dilution utilisée.

Dilutions au 1/125ème, 1/250ème et 1/500ème, δ70 et δ100, φ=1 % et β=8 %. 1 heure d'incubation à 37 °C sur les cellules U87MG.

Il apparaît que les Cubosomes sont plus facilement internalisés en comparaison aux Hexosomes. Cela pourrait être expliqué par leur plus grande affinité structurelle avec la membrane cellulaire. De manière globale les émulsions préparées avec le F127 semblent mieux s'internalisée que celles stabilisées par les autres émulsifiants. Le F127 pourrait entraîner une déstabilisation de la membrane plasmique de par le grand volume de sa molécule et augmenter ainsi sa perméabilité.

La variation d'intensité de fluorescence du Nile Red, et donc l'internalisation des Isasomes varie peu en fonction de la dilution. Cela traduirait leur capacité à être internalisés très rapidement, au bout de quelques minutes seulement.

Nous avons donc voulu suivre la cinétique d'internalisation de ces mêmes émulsions à une dilution au 1/250ème (Figure 82).

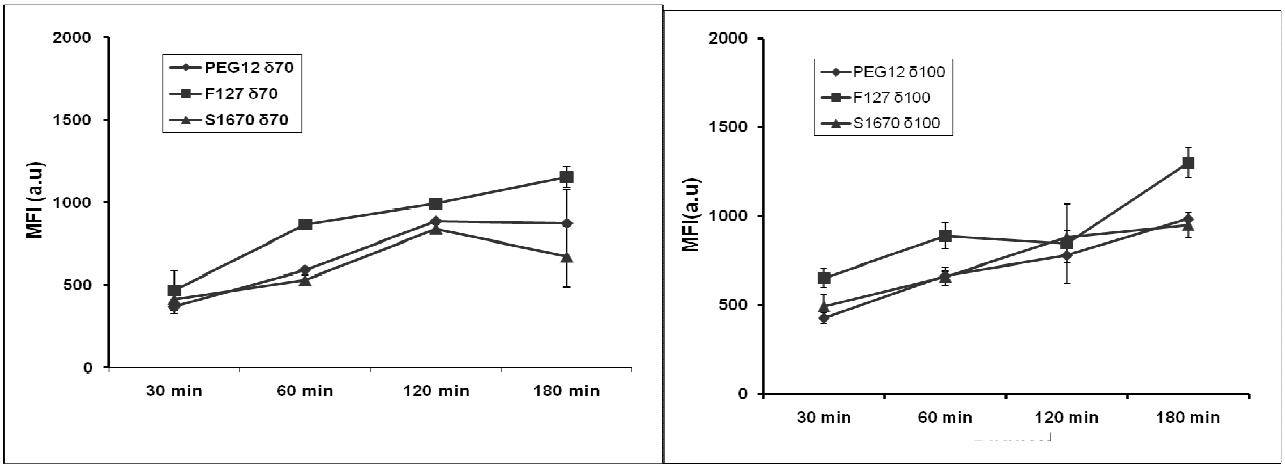


Figure 82 : Cinétique d'internalisation des Isasomes (δ70 et δ100) stabilisés par du S1670, PEG12 et F127.

Les cellules U87MG sont incubées avec des émulsions chargées en Nile Red diluées au 1/250 à 37 °C. L'intensité de fluorescence est mesurée au cytomètre en flux à différents temps. δ70 et δ100, φ=1 % et β=8 %.

Cette cinétique d'internalisation confirme la plus grande capacité d'internalisation des Hexosomes stabilisés par le F127. La figure 82 confirme également que l'internalisation des Isasomes est un phénomène rapide. Elle est simplement doublée entre 30 minutes et 180 minutes d'incubation. Il semblerait donc que l'internalisation débute dès la mise en contact des cellules avec les Isasomes. Des images de microscopie confocale montrent qu'après 6 minutes d'incubation, une grande partie des émulsions ont déjà été internalisées (résultats non montrés).

Les Isasomes ont donc montré leur très forte capacité à être internalisés rapidement après la mise en contact avec les cellules et ce, quelque soit l'émulsifiant utilisé. Cependant, le F127 semble davantage déstabiliser la membrane plasmique et donc augmenter temporairement sa perméabilité.

Ces capacités vont être testées en conditions « réelles », c'est-à-dire en incluant des molécules actives à l'intérieur des Isasomes afin de vérifier qu'une fois internalisés ils libèreront le principe actif et que celui-ci sera efficace.

III) – 4 Vectorisation du Paclitaxel

Le Paclitaxel est une molécule communément utilisée comme molécule référence dans les tests de vectorisation cellulaire. En effet, cette molécule possède un fort pouvoir de toxicité envers les lignées de cellules cancéreuses, bloquant leur cycle mitotique. Le Paclitaxel est une molécule purement lipophile et qui, aux concentrations utilisées, ne modifient pas les structures des Isasomes.

Nous avons inclus du Paclitaxel dans des Hexosomes et Cubosomes stabilisés par le F127 afin d'obtenir des concentrations de 0,1 et 0,2 µmol/L^{-1} de Paclitaxel, pour des dilutions au 1/500ème et au 1/250ème. Nous avons pris comme référence la même quantité de Paclitaxel solubilisé dans du DMSO afin de visualiser l'impact de sa vectorisation par les Isasomes. Pour chaque essai, nous avons re-vérifié la cytotoxicité des vecteurs seuls (c'est-à-dire sans Paclitaxel) ainsi que du DMSO (figure 83).

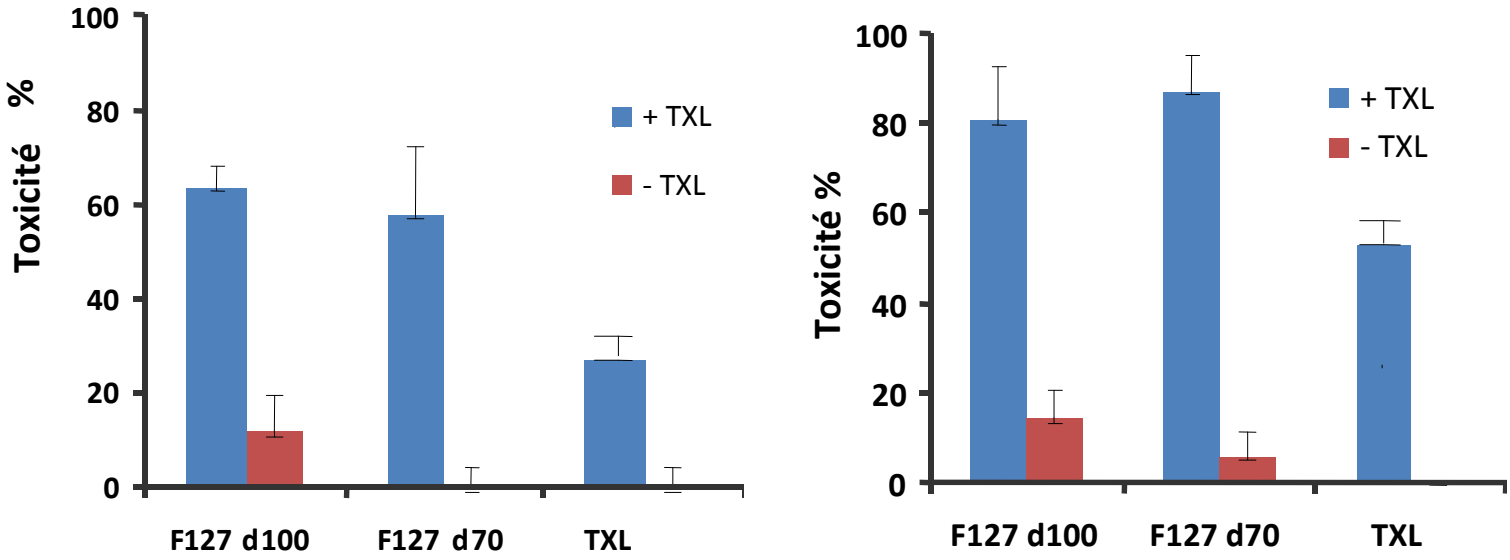


Figure 83 : Cytotoxicité induite par le paclitaxel (TXL) vectorisé par les Isasomes stabilisés par le F127 – dilution au 1/250ème soit 0,2 µM de Paclitaxel.

La cytoxicité est évaluée par le test à l'Alamar Blue après 24 heures (à gauche) et 72 heures (à droite). Incubation sur cellules U87MG pendant 2 h. 0,2 µmol/L^{-1} de Paclitaxel, dilution au 1/250ème, δ70 et δ100, φ=1 % et β=8 %.

Comme cela avait été démontré dans le test de cytotoxicité, les Isasomes stabilisés par du F127 présente une très légère toxicité, de l'ordre de 10% après 24 ou 72 heures, pour les Cubosomes. L'effet vectorisateur des Isasomes est clairement établi lors de cette expérience. En effet, la toxicité du Paclitaxel vectorisé par les Isasomes est 2 fois plus importante que le Paclitaxel seul. Ceci est vrai après 24 heures (60% de toxicité contre 30%) et après 72 heures avec quasiment 90% de toxicité induit par la vectorisation du Paclitaxel contre 50% pour la molécule seule.

Ces résultats confirment la rapidité d'internalisation des Isasomes et de leur bonnes capacités de vectorisation. L'effet du Paclitaxel est observé durant 72 heures, ce qui peut être expliqué par le temps de « digestion » des Isasomes à l'intérieur des cellules et la libération progressive du principe actif. En comparaison, l'effet de la vectorisation du Paclitaxel par les Isasomes après 24 heures est équivalent à l'effet du Paclitaxel seul après 72 heures. Il apparaît clairement que la rapidité d'internalisation des Isasomes est un paramètre clé.
Il est à noter que l'on observe peu de différences de toxicité induite par les Cubosomes ou par les Hexosomes. Cependant, il semblerait que la faible différence observée à 24 heures, serait due à l'internalisation plus rapide des Cubosomes.

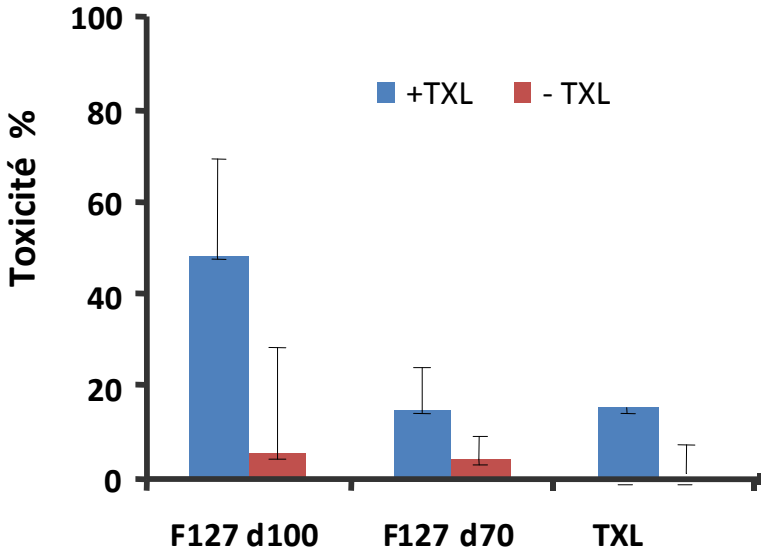


Figure 84 : Cytotoxicité induite par le paclitaxel (TXL) vectorisé par les Isasomes stabilisés par le F127 – dilution au 1/500ème soit 0,1 µM de Paclitaxel.

La cytoxicité est évaluée par le test à l'Alamar Blue après 24 heures (à gauche) et 72 heures (à droite). Incubation sur cellules U87MG pendant 2 h. 0,1 µmol/L^{-1} de Paclitaxel, dilution au 1/500ème, δ70 et δ100, φ=1 % et β=8 %.

Pour une concentration de Paclitaxel plus faible (0,1 µM), donc une dilution plus importante des Isasomes (1/500ème), on observe des toxicités beaucoup plus faibles (figure 84). Seuls les Cubosomes conservent leur capacité à être internalisés rapidement, en comparaison aux Hexosomes. Après 24 heures l'effet vectorisateur des Hexosomes semble nul au regard de la même toxicité obtenue par le Paclitaxel seul.

III) – 5 Vectorisation de l'ATRA.

Afin de confirmer les observations précédemment effectuées, nous avons voulu vérifier les pouvoirs de vectorisation des Isasomes avec une autre molécule. L'ATRA (All-Trans Retinoic Acid), une fois internalisée, permet une surexpression de la protéine GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Cette protéine est ensuite détectée par une méthode immunofluorescente au microscope confocal. Le protocole utilisé est le même que celui choisi pour la vectorisation du Paclitaxel, à savoir une incubation des Isasomes 2 heures à 37 °C sur des cellules U87MG, pour une concentration d'ATRA de 0,2 µM ; en comparaison à la même concentration d'ATRA libre dans le milieu de culture (Figure 85).

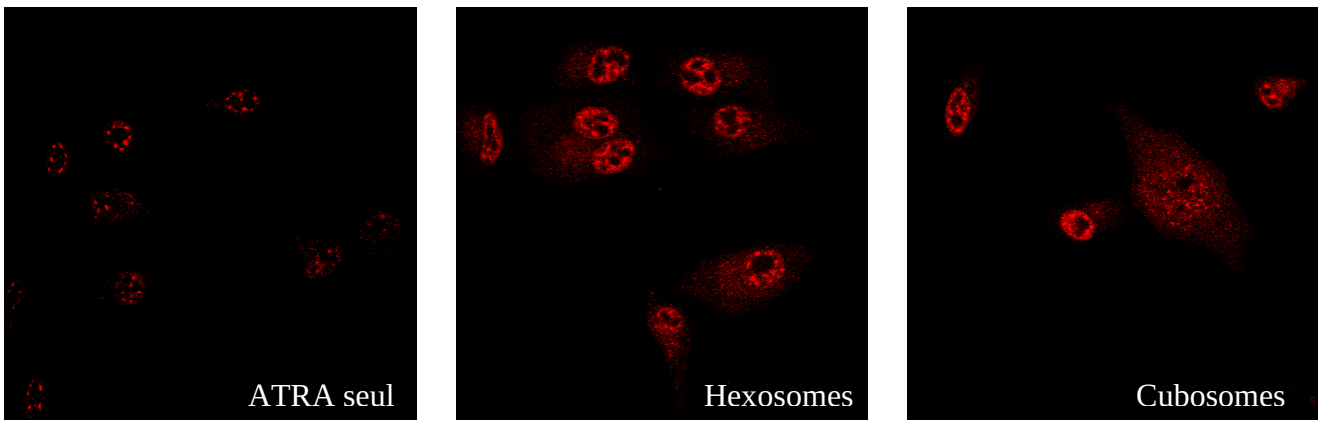


Figure 85 : Surexpression de la GFAP induite par l'ATRA seul (gauche) ou vectorisé par les Hexosomes (milieu) ou les Cubosomes (droite) ; stabilisés par le F127 – dilution au 1/250ème soit 0,2 µM d'ATRA.

Incubation sur cellules U87MG pendant 2 h. 0,2 µmol/L^{-1} d'ATRA, dilution au 1/500ème, δ70 et δ100, φ=1 % et β=8 %. Immunofluorescence avec anticorps primaires anti-GFAP et anticorps secondaire marqué à l'Alexa568.

Comme pour la vectorisation du Paclitaxel, l'effet vectorisateur des Isasomes est clairement établi. En effet, la fluorescence observée dans les cas de la vectorisation par les Isasomes (images du milieu et de droite) est plus intense que celle de l'ATRA seul, non vectorisé. Cependant il est difficile, avec cette expérience de conclure à des différences d'efficacité vectorisatrice des Cubosomes comparés aux Hexosomes.

Les Isasomes sont donc de bons vecteurs utilisables en biologie cellulaire. Ils permettent, dans le cas du Paclitaxel, de doubler son efficacité, en lui permettant de franchir plus facilement et plus rapidement la membrane plasmique. Les Cubosomes semblent être particulièrement indiqués pour la vectorisation. Ils sont plus vite internalisés que les Hexosomes et leur affinité avec la membrane plasmique semble plus importante. Plus l'internalisation est rapide et plus le bénéfice de la vectorisation peut être important. Il est tout de même nécessaire de contrôler la toxicité induite par le F127, en ajustant la concentration des Isasomes à un niveau adapté.

Conclusion

Nous avons montré dans cette étude que les Isasomes sont des particules ayant un potentiel vectorisateur très intéressant. Cependant leur fabrication et le maintien des auto-assemblages dans le temps ne sont pas choses aisées.

Nous avons montré la possibilité de diversifier l'émulsifiant utilisé pour stabiliser ces Isasomes, permettant de faire varier à volonté les tailles de gouttelettes ainsi que leur charge de surface. Le sucrose stéarate s'est montré une très bonne alternative au F127 classiquement utilisé. Son avantage est sa charge négative et son innocuité en toxicité cellulaire.

Les conditions de fabrication et de stockage sont déterminantes dans la compréhension des Isasomes et de l'évolution de leurs structures internes. En effet, dans le cas des mélanges monolinoléine/limonène, ce dernier s'est vu décrire une évaporation dans le temps qui modifie ainsi les structures internes. Ce phénomène a été décrit pour la première fois. Ainsi, nous avons suivi l'évaporation d'une molécule odorante dans le temps par l'analyse de sa structure par SAXS.

Nous avons alors tenté de réduire cette évaporation en changeant l'émulsifiant. La cire de carnauba pégylée, connue pour son pouvoir filmogène s'est montrée capable de réduire la vitesse d'évaporation du limonène.

Une fois les influences des conditions opératoires définies, nous avons utilisé ces Isasomes comme réservoirs à molécules d'intérêt. Nous avons alors décrit les différentes influences que ces molécules ont sur les structures internes, en fonction, de leur structure, de leur masse moléculaire et de leur solubilité.

Enfin, nous avons utilisé les Isasomes comme vecteurs pour des molécules médicamenteuses. Leur utilisation a permis d'améliorer la disponibilité et l'efficacité de telles molécules.
Afin d'optimiser la couverture interfaciale nous avons ajouté des cires émulsifiantes qui se sont vues capables de former des cristaux à l'interface des Isasomes, ouvrant la voie à des expérimentations futures pour encapsuler ces mésophases émulsifiées.

Perspectives

L’évolution des Isasomes a été décrite ici en fonction des paramètres de fabrication et de stockage. Cela nous permet d’approfondir les possibles applications de ces Isasomes comme vecteurs. La présence d’eau, d’huile et d’une grande interface promet à ces particules de belles perspectives comme vecteurs notamment de molécules pharmaceutiques.
De nouveaux tests *in vivo*, sur l’animal, semble être l’étape ultérieure à ce travail de thèse, mettant les Isasomes dans des conditions réalistes, souvent défavorables.

L’approfondissement de l’influence de l’ajout de cires aux Isasomes est une piste intéressante. En effet, la combinaison des bénéfices des deux structures pourrait faire naître une nouvelle classe de particules. De plus, les mécanismes d’adsorption des cristaux de cires aux Isasomes sont peu compris, leurs compositions étant très complexes.

Ce travail de thèse avait pour but de mieux comprendre l’évolution des Isasomes et l’influence des molécules hôtes. Nous avons voulu ouvrir le plus de pistes de réflexions possibles afin de rendre l’utilisation commerciale de ses particules réalistes dans un avenir proche.

ANNEXE I : Brevets déposés sur les Isasomes.

Method of preparing controlled release preparation for biologically active materials and resulting compositions. N°5151272
S. Engstrom, B. Lindman, K. Larsson. FLUID CARBON INTERNATIONAL AB. 1992.

Controlled release composition for a biologically active material dissolved or dispersed in a L2 phase. N°5371109
S. Engstrom, B. Lindman, K. Larsson. DRILLETTEN AB. 1994.

Mesophase-stabilized emulsions and dispersions for use in low-fat and fat free food product. N°6068876.
M. Miller, A. Akashe; D. Das. KRAFT FOODS. 2000.

Liquid crystalline phase drug delivery vehicle. N°6235312
H.K. Hobbs, S. Bekendorf, S.H-W. Wu. EASTMAN CHEMICAL COMPANY. 2001.

Use of mesomorphic phases in food products. N°6368652.
I. Heertje, H.A. Hendrickx, A.J. Knoops, E.C. Royers, H. Turksma. CONOPCO. 2002.

Food Composition containing a monoglyceride mesomorphic phase. N°6569478
M. Leser, S. Vauthey. NESTEC. 2003.

Functionalized cubic liquid crystalline phase materials and methods for their preparation and use. N° 6656385.
M.L. Lynch, P.T. Spicer. PROCTER AND GAMBLE. 2003.

Cubic liquid crystalline compositions and methods for their preparations. N°6773627.
M.L. Lynch, P.T. Spicer. CHILDREN'S HOSPITAL RESEARCH FOUNDATION. 2004.

Formulation solubilizing water-insoluble agents and preparation method thereof. N°6994862.
S.Y. Jeong, I.C. Kwon, H. Chung. KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY. 2006.

Easily dispersible lipidic phase. N°2008/0311211.
M. Leser, L. Sagalowicz, M. Michel, P. Frossard, C. Appolonia-Nouzille. NESTEC. 2008.

Oil in water emulsion for creating new product consistencies. N°2008/0299200.
M. Leser, L. Sagalowicz, M. Michel, S. Guillot, O. Glatter, M. Tomsic. NESTEC. 2008.

Oil in water emulsion and ist use for the delivery of functionality. N°2008/0255247.
L. Sagalowicz, M. Leser, M. Michel, H.J. Watzke, S. Acquistapace, R. Bertholet, B. Holst, F. Robert. NESTEC. 2008.

Oil in water emulsion and its use for the delayed release of active elements. N° 2010/0172875.
V.A. Phan, N. Godinot, L. Sagalowicz, M. Leser, F. Robert. NESTEC. 2010.

Références Bibliographiques

[1] Nano-emulsions : New applications and optimization of their preparation.
J.M. Gutiérrez, C. Gonzàlez, A. Maestro, I. Solè, C.M. Pey, J. Nolla. Current Opinion in Colloid and Interfaces Science. 2008, 13, 245-251.
[2] Emulsion Science : Basic Principles.
F. Leal-Calderon, V. Schmitt, J. Bibette. Publié par Springer, 2007.
[3] Émulsification – Élaboration et étude des émulsions.
P. Brochette. Techniques de l'ingénieur, 1999.
[4] Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: Effect of chilled or frozen storage.
M. Cortés-Munoz, D. Chevalier-Lucia, E. Dumay. Food Hydrocolloids. 2009, 23, 640-654.
[5] Influence of surfactant structure on the contribution of micelles to Ostwald ripening in oil-in-water emulsions.
S. Ariyaprakai, S.R. Dungan. Journal of Colloid and Interface Science. 2010, 343, 102-108.
[6] Aging mechanisms of oil-in-water emulsions based on a bioemulsifier produced by *Yarrowia lipolytica*.
J.R. Trindade, M.G. Freire, P.F.F Amaral, M.A.Z. Coelho, J.A.P. Coutinho, I.M. Marrucho. Colloids and Surface A. 2008, 312, 149-154.
[7] From colloidal aggregation to spinodal decomposition in sticky emulsions.
P. Poulin, J. Bibette, D.A. Weitz. The European Physical Journal B. 1999, 7, 277-281.
[8] Re-coalescence of emulsion droplet during high-energy emulsification.
S.M. Jafari, E. Assadpoor, Y. He, B. Bhandari. Food Hydrocolloids. 2008, 1191-1202.
[9] Avalanches of coalescence events and local extensional flows – stabilisation or destabilisation due to surfactant.
D.Z. Gunes, X. Clain, O. Breton, G. Mayor, A.S. Burbidge. Journal of Colloid and Interface Science. 2010, 343, 79-86.
[10] Livre – Surfactants and interfacial Phenomena. Third Edition.
M.J. Rosen. Editions Wiley-Interscience. 2004.
[11] Revue – Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations.
J.M.R. Patino, C.C. Sànchez, M.R.R. Niño. Advances in Colloid and Interface Science. 2008, 140, 95-113.
[12] Mixed micelles as delivery systems for enhanced emulsifier adsorption at the air/water interface: Sodium Stearoyl Lactylate (SSL)/Tween80 solutions.
D.O. Grigoriev, M.E. Leser, M.Michel, R. Miller. Colloids and Surface A. 2007, 301, 158-165.
[13] Interfacial and foaming properties of some food grade low molecular weight surfactants.
J-B. Bezelgues, S. Serieye, L. Crosset-Perrotin, M.E. Leser. Colloids and Surface A. 2008, 331, 56-62.
[14] On the possible role of surface elasticity in emulsion stability.
D. Georgieva, C. Schmitt, F. Leal-Calderon, D. Langevin. Langmuir. 2009, 25(10), 5565-5573.
[15] Evaluation of the emulsifying properties of some cationic starches.
A. Vermeire, F. Kiekens, S. Corveleyn, J-P. Remon. Drug Development and Industrial Pharmacy. 1999, 25(3), 367-371.
[16] Milk proteins as vehicles for bioactives.
Y.D. Livney. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2010, 15, 73-83.

[17] Equilibrium of adsorption of mixed milk protein/surfactant solutions at the water/air interface.
C. Kotsmar, D.O. Grigoriev, F. Xu, E.V. Aksenenko, V.B. Fainerman, M.E. Leser, R. Miller. Langmuir. 2008, 24(24), 13977-13984.
[18] Revue – Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers..
E. Dickinson. Food Hydrocolloids. 2009, 23, 1473-1482.
[19] Revue – Solid-stabilized emulsions.
F. Leal-Calderon, V. Scmitt. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2008, 13, 217-227.
[20] Revue – Food emulsions and foams : stabilization by particles.
E. Dickinson. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2010, 15, 40-49.
[21] Aqueous foams stabilized with particles and non-ionic surfactants.
S. Zhang, D. Sun, X. Dong, C. Li, J. Xu. Colloids and Surfaces A. 2008, 324, 1-8.
[22] The role particles in stabilising foams and emulsions.
T.N. Hunter, R.J. Pugh, G.V. Franks, G.J. Jameson. Advances in Colloid and Interface Science. 2008, 137, 57-81.
[23] Pickering emulsions stabilized solely by layered double hydroxides particles: The effect of salt on emulsion formation and stability.
F. Yang, S/ Liu, J. Xu, Q. Lan, F. Wei, D. Sun. Journal of Colloid and Interface Science. 2006, 302, 159-169.
[24] Oil-in-water emulsions stabilized by highly charged polyelectrolyte-grafted silica nanoparticles.
N. Saleh, T. Sarbu, K. Sirk, G.V. Lowry, K. Matyajaszewski, R.D. Tilton. Langmuir. 2005, 21(22), 9873-9878.
[25] Stabilization of oil-water emulsions by hydrophobic bacteria.
L.S. Dorobantu, A.K.C. Yeung, J.M. Foght, M.R. Gay. Applied and Environmental Microbiology. 2004, 70(10), 6333-6336.
[26] Stabilization of water-in-oil emulsion by *Rhodococcus opacus* B-4 and its application to biotransformations.
K. Honda, S; Yamashita, H. Nakagawa, Y. Sameshima, T. Omasa, J. Kato, H. Ohtake. Applied and Environmental Microbiology. 2008, 78(5), 767-773.
[27] Role of the counterions on the adsorption of ionic surfactants.
I.B. Ivanov, K.G. Marinova, K.D. Danov, D. Dimitrova, K.P. Ananthapadmanabhan, A. Lips. Advances in Colloid and Interface Science. 2007, 134-135, 105-124.
[28] Direct Measurements of the effects of salt and surfactant on interaction forces between colloidal particles at water-oil interfaces.
B.J. Park, J.P. Pantina, E.M. Furst. Langmuir. 2008, 24, 1686,1694.
[29] Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema – An *in vivo* study.
E. Yilmaz, H-H. Borchert. International Journal of Pharmaceutics. 2006, 307, 232-238.
[30] Lecithin-based cationic nanoparticles as a potential DNA delivery system.
Z. Cui, F. Qui, B.R. Sloat. International Journal of Pharmaceutics. 2006, 313, 206-213.
[31] Revue – Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA.
S. Zhang, B. Zhao, H. Jiang, B. Wang, B. Ma. Journal of Controlled Release. 2007, 123, 1-10.
[32] Revue – Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes.
L. Wasungu, D. Hoekstra. Journal of Controlled Release. 2006, 116, 255-264.
[33] Positively charged microémulsions for topical application.
E. Peira, M.E. Carlotti, C. Trotta, R. Cavalli, M. Trotta. International Journal of Pharmaceutics. 2008, 346, 119-123.

[34] Interaction of DNA oligomers with cationic lipidic monolayers: complexation and splitting.
S. Erokhina, T. Berzina, L. Sristofolini, O. Konovalov, V. Erokhin, M.P. Fontana. Langmuir. 2007, 23, 4414-4420.
[35] The partitioning of emulsifiers in o/w emulsions: A comparative study os SANS, ultrafiltration and dialysis.
K. Oehkle, V.M. Garamus, A. Heins, H. Stöckmann, K. Schwarz. Journal of Colloid and Interface Science. 2008, 322, 294-303.
[36] Adsorption of polar lipids at the water-oil interface.
P. Reis, R. Miller, M. Leser, H. Watzke, V.B. Fainerman, K. Holmberg. Langmuir. 2008, 24, 5781-5786.
[37] Dynamic adsorption and characterization of phosopholipid and mixed phospholipid/protein layers at liquid/liquid interfaces.
Q. He, Y. Zhang, G. Lu, R. Miller, H. Möhwald, J. Li. Advances in colloid and interface science. 2008, 140, 67-76.
[38] Revue – Mono- and multilayer covered drops as carriers.
D.O. Grigoriev, R. Miller. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2009, 14(1), 48-59.
[39] Livre – Intermolecular and surfaces forces – Second edition.
J. Israelachvili. Edité par Academic Press Inc. 480 pages. 1991.
[40] The characteristic curvature of ionic surfactants.
E.J. Acosta, J.S. Yuan, A.S. Bhakta. Journal of surfactants and detergents.2008, 11(2), 145-158.
[41] Thèse - Elaboration et consolidation thermique de gels à base de substances émulsionnées cristallisables.

N. Drelon. Thèse de l'Université de Bordeaux I. 2006.
[42] Revue – Surfactant self-assembly objects as novel drug delivery vehicles.
C.J. Drummond, C. Fong. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2000, 4, 449-456.
[43] Relationship between solubility and micellization of surfactants : the temperature range of micellization.
Y. Moroi. Progress in Colloid and Polymer Science. 1988, 77, 55-61.
[44] Over the behaviour of the fatty acids, alkalis and soaps in the presence of water. III. Soaps as crystalloids.
F. Krafft, H. Wiglow. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft. 1895, 28, 2566-2573.
[45] Revue – Monoglyceride self-assembly structures as delivery vehicles.
L. Sagalowicz, M.E. Leser, H.J. Watzke, M. Michel. Trends in Food Science and Technology. 2006, 17, 204-214.
[46] Revue – Self-assembly of polar food lipids.
M.E. Leser, L. Sagalowicz, M. Michel, H.J. Watzke. Advances in Colloid and Interface Science. 2006, 123-126, 125-136.
[47] Control of internal structure of MLO-based Isasomes by the addition of diglycerol monooleate and soybean phosphatidylcholine.
A. Yaghmur, L. De Campo, L. Sagalowicz, M.E. Leser, O. Glatter. Langmuir. 2006, 21-22 (24), 9919-9927.
[48] The structure of mesomorphic phases and micelles in aqueous glyceride systems.
K. Larsson. Zeitschrift für Physikalische Chemie Neue Folge. 1967, 56, 173-198.
[49] The structure of the liquid-crystalline phases of lipid-water systems.
V. Luzzati, F. Husson. The Journal of Cell Biology. 1962, 12, 207-219.

[50] Structure of the cubic phases of lipid-water systems.
V. Luzzati, A. Tardieu, T. Gulik-Krzywicki, E. Rivas, F. Reiss-Husson. Nature. 1968, 220, 485-488.
[51] Phase behaviour of aqueous systems of monoglycerides.
E.S. Lutton. Journal of the American Oil Chemists Society. 1965, 42(12), 1068-1070.
[52] Thèse – Cubic cell membrane architectures – Taking another look at membrane bound cell spaces.
T. Landh. Thèse à l'université de Lund (Suède). 1996.
[53] Revue – Cubic membranes: a legend beyond the Flatland of cell membrane organization.
Z.A. Almsherqi, S.D. Kohlwein, Y. Deng. The Journal of Cell Biology. 2006, 173(6), 839-844.
[54] Cubic lipid-water phases : Structures and biomembrane aspects.
K. Larsson. The Journal of Physical Chemistry. 1989, 98(21), 7304-7314.
[55] The dynamic ER : Experimental approaches and current questions.
C.M. Federovic, D. Ron, R.Y. Hampton. Current Opinion in Cell Biology. 2005, 17, 409-414.
[56] Three-dimensional periodic cubic membrane structure in the mitochondria of amoebae *Chaos carolinensis*.
Y. Deng, M. Mieczkowski. Protoplasma. 1998, 203, 16-25.
[57] Cubic membranes: a structure-based design for DNA uptake.
Z. Almsherqi, S. Hyde, M. Ramachandran, Y. Deng. Journal of the Royal Society Interface. 2008, 5(26), 1023-1029.
[58] Ordered nanostructured amphiphile self-assembly materials form endogenous nonionic unsaturated monoethanolamide lipids in water.
S.M. Sagnella, C.E. Conn, I. Krodkiewska, M. Moghaddam, J.M. Seddon, C.J. Drummond. Lnagmuir. 2010, 26(5), 3084-3094.
[59] Aqueous self-assembly of phytantriol in ternary systems:effect of monooléine, distearoylphosphatidylglycerol and three water-miscible solvents.
P. Wadsen-Hindrichsen, J. Bender, J. Unga, S. Engström. Journal of Colloid and Interface Science. 2007, 315, 701-713.
[60] Phase behaviour of Phytantriol/water bicontinuous cubic Pn3m cubosomes stabilized by laponite disc-like particles.
F. Muller, A. Salonen, O. Glatter. Journal of Colloid and Interface Science. 2010, 342, 392-398.
[61] Preparation of phytantriol cubosomes by solvent precursor dilution for the delivery of protein vaccines.
S.B. Rizwan, D. Assmus, A. Boehnke, T. Hanley, B.J. Boyd, T. Rades, S; Hook. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2011. In press.
[62] Liquid crystalline phases and their dispersions in aqueous mixtures of glycerol monooleate and glyceryl monooleyl ether.
G. Popescu, J. Barauskas, T. Nylander, F. Tiberg. Langmuir. 2007, 23(2), 496-503.
[63] Influence of composition and preparation parameters on the properties of aqueous monoolein dispersions.
G. Wörle, M. Drechsler, M.H.J. Koch, B. Siekmann, K. Westesen, H. Bunjes. International Journal of Pharmaceutics. 2007, 329, 150-157.
[64] Self-assembly in monoélaidine aqueous dispersions: direct vesicles to cubosomes transition.
A. Yaghmur, P. Laggner, M. Almgren, M. Rappolt. PloS ONE. 2008, 3(11), e3747.
[65] Nanostructural studies on monoélaidine-water systems at low temperatures.
C.V. Kulkarni. Langmuir. 2011. Sous presse.
[66] Engineering bicontinuous cubic structures at the nanoscale – the role of chain splay.

C.V. Kulkarni, T-Y. Tang, A.M. Seddon, J.M. Seddon, P. Ces, R.H. Templer. Soft Matter. 2010, 6, 3191-3194.
[67] The temperature-composition phase diagram and mesophase structure characterization of monopentadecenoin in water.
J. Briggs, M. Caffrey. Biophysical Journal. 1994, 67, 1594-1602.
[68] A novel cubic phase of medium chain lipid origin for the delivery of poorly water soluble drugs.
G.A. Kossena, W.N. Charman, B.J. Boyd, C.J.H. Porter. Journal of Controlled Release. 2004, 99, 217-229.
[69] Phase behaviour of the monoerucin/water system.
H. Qui, M. Caffrey. Chemistry and Physic of Lipids. 1999, 100(1-2), 55-79.
[70] Imaging soft matter with the atomic force microscope: Cubosomes and Hexosomes.
C. Neto, G. Aloisi, P. Baglioni, K ,Larsson. The Journal of Physical Chemistry B. 1999, 103(19), 3896-3899.
[71] *In situ* study of soft matter with atomic force microscopy and light scattering.
C. Neto. Progress in Colloid and Polymer Science. 2000, 115, 195-199.
[72] Investigating reversed liquid crystalline mesophases.
L. Sagalowicz, R. Mezzenga, M.E. Leser. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2006, 11, 224-229.
[73] A 13C NMR study of aqueous dispersions of reversed lipid phases.
M. Monduzzi, H. Ljusberg-Wahren, K. Larsson. Langmuir. 2000, 16, 7355-7358.
[74] NMR of liquid crystals and micellar solutions.
M. Monduzzi. The Royal Society of Chemistry. 2005, 34, 523-552.
[75] Reversible phase transitions in emulsified nanostructured lipid system.
L. De Campo, A. Yaghmur, L. Sagalowicz, M.E. Leser, H. Watzke, O. Glatter. Langmuir. 2004, 20(13), 5254-5261.
[76] Revue – The multiple faces of self-assembled lipidic systems.
G. Tresset. PMC Biophysics. 2009, 2(3), 1-25.
[77] Revue – Lyotropic crystals and their dispersions relevant in foods.
K. Larsson. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2009, 14, 16-20.
[78] La structure des colloïdes d'association. I. Les phases liquide-cristallines des systèmes amphiphiles-eau.
V. Luzzati, H. Mustacchi, A.E. Skolios, F. Husson. Acta Crystallographia. 1960, 13, 660-667.
[79] Transitions induced by solubilized fat into reverse hexagonal mesophases.
I. Amar-Yuli, N. Garti. Colloids and Surface B. 2005, 43, 72-82.
[80] Equilibrium and non-equilibrium structures in complex food systems.
R. Mezzenga. Food Hydrocolloids. 2007, 21, 674-682.
[81] Detailed structure of diamond-type lipid cubic nanoparticles.
B. Angelov, A. Angelova, B. Papahadjopoulos-Sternberg. Journal of the American Chemical Society. 2006, 128(17), 5813-5817.
[82] Watching fat digestion.
J.S. Patton, M.C. Carey. Science. 1979, 204, 145-148..
[83] Aqueous lipid phases of relevance to intestinal fat digestion and adsorption.
M. Lindström, H. Ljusberg-Wahren, K. Larsson, B. Borgström. Lipids. 1981, 16(10), 749-754.
[84] Phase behavior in the system pine oil monoglycerides-Polowamer 407-water at 20°C.
T. Landh. Journal of Physical Chemitry. 1994, 98, 8453-8467.
[85] Self-assembled lipid superstructures : Beyond vesicles and liposomes.
J. Barauskas, M. Johnsson, F. Tiberg. NanoLetters. 2005, 5(8), 1615-1619.

[86] “Sponge” nanoparticle dispersions in aqueous mixtures of diglycerol monooleate, glycerol dioleate and polysorbate 80.
J. Barauskas. A. Misiunas, T. Gunnarsson, F. Tiberg, M. Johnsson. Langmuir. 2006, 22(14), 6328-6334.
[87] Soft matter dispersions with ordered inner structures, stabilized by ethoxylated phytosterols.
D. Libster, A. Aserin, D. Yariv, G. Sholam, N. Garti. Colloids and Surface B. 2009, 1, 202-215.
[88] Useful modified cellulose polymers as new emulsifiers of Cubosomes.
M. Uyama, M. Nakano, J. Yamashita, T. Handa. Langmuir. 2009, 25(8), 4336-4338.
[89] Influence of the stabilizer concentration on the internal liquid crystalline order and the size of oil-loaded monolinoléine-based dispersions.
S. Guillot, S. Salentinig, A. Chemelli, L. Sagalowicz, M.E. Leser, O. Glatter. Langmuir. 2010, 26(9), 6222-6229.
[90] Nanoparticles form lipid-based liquid crystals: emulsifier influence on morphology and cytotoxicity.
S. Murgia, A.M. Falchi, M. Mano, S. Lampis, R. Angius, A.M. Carnerup, J. Schmidt, G. Diaz, M. Giacca, Y. Talmon, M. Monduzzi. Journal of Physical Chemistry B. 2010, 114(10), 3518-3525.
[91] Emulsified microemulsions and oil-containing liquid crystalline phases.
A. Yaghmur, L. De Campo, L. Sagalowicz, M.E. Leser, O. Glatter. Langmuir. 2005, 21, 569-577.
[92] Revue – Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions.
A. Yaghmur, O. Glatter. Advances in Colloid and Interface Science. 2009, 147-148, 333-342.
[93] Determination of water content in internally self-assembled monoglyceride-based dispersions from the bulk phase.
A. Salonen, S. Guillot, O. Glatter. Langmuir. 2007, 23(18), 9151-9154.
[94] A study of the emulsified microemulsions by SAXS, cryo-TEM, SD-NMR, and electrical conductivity.
R. Lutz, A. Aserin, E.J. Wachtel, E. Ben-Shoshan, F. Danino, N. Garti. Journal of Dispersion Science and Technology. 2007, 28(8), 1149-1157.
[95] Structural and rheological investigation of Fd3m inverse micellar cubic phases.
M. Pouzot, R. Mezzenga, M. Leser, L. Sagalowicz, S. Guillot, O. Glatter. Langmuir. 2007 , 23, 9618-9628.
[96] Dispersions of liquid crystalline phases of the monooléine/oleic acid/ Pluronic F127 system.
M. Nakano, T. Teshigawara, A. Sugita, W. Leesajakul, A. Taniguchi, T. Kamo, H. Matsuoka, T. Handa. Langmuir. 2002, 18, 9283-9288.
[97] Oil-loaded monolinoléine-based particles with confined inverse discontinuous cubic structure (Fd3m).
A. Yaghmur, L. De Dampo, S. Salentinig, L. Sagalowicz, M.E. Leser, O. Glatter. Langmuir. 2006, 22, 517-521.
[98] Inverse micellar phases of phospholipids and glycolipids.
J.M. Seddon, J. Robins, T. Gulik-Krzywicki, H. Delacroix. Physical Chemistry and Chemical Physics. 2000, 2, 4485-4493.
[99] Self-assembled geometric liquid-crystalline nanoparticles imaged in three dimensions: Hexosomes are not necessarily flat hexagonal prisms.
B.J. Boyd, S.B. Rizwan, Y-D. Dong, S. Hook, T. Rades. Langmuir. 2007, 23(25), 12461-12464.

[100] Detailed structure of diamond-type lipid cubic nanopartciles.
B. Angelov, A. Angelova, B. Papahadjopoulos-Sternberg, S. Lesieurs, J-F. Sadoc, M. Ollivon, P. Couvreur. Journal of the American Chemical Society. 2006, 128(7), 5813-5817.
[101] Revue – Progress in liquid crystalline dispersions: Cubosomes.
P.T. Spicer. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2005, 10, 274-279.
[102] Revue – Aqueous dispersions of cubic lipid-water phases.
K. Larsson. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2000, 5, 64-69.
[103] Crystallography of dispersed liquid crystalline phases studied by cryo-transmission electron microscopy.
L. Sagalowicz, M. Michel, M. Adrian, P. Frossard, M. Rouvet, H.J. Watzke, A. Yaghmur, L. De Campo, O. Glatter, M.E. Leser. Journal of Microscopy. 2006, 221, 110-121.
[104] Revue – Vesicle transformations resulting from curvature tuning in systems with micellar, lamellar, and bicontinuous cubic phases.
M. Almgren. Journal of Dispersion Science and Technology. 2007, 28, 43-54.
[105] Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by a nonionic amphiphilic polymer.
J. Gustafsson, H. Ljusberg-Wahren, M. Almgren, K. Larsson. Langmuir. 1997, 13, 6964-6971.
[106] Cubic lipid-water phase dispersed into submicron particles.
J. Gustafsson, H. Ljusberg-Wahren, M. Almgren, K. Larsson. Langmuir. 1996, 12(20), 4611-4613.
[107] Structure of Cusomose – A closed lipid bilayer aggregate.
S. Andersson, M. Jacob, S. Lidin. Z Kristallogr. 1995, 210, 315-318.
[108] Cubic phase nanoparticles (Cubosome): Principles for controlling size, structure, and stability.
J. Barauskas, M. Johnsson, F. Joabsson, F. Tiberg. Langmuir. 2005, 21, 2569-2577.
[109] Long-living intermediates during a lamellar to a diamond cubic lipid phase transition: a small-angle X-ray scattering investigation.
B. Angelov, A. Angelova, U. Vainio, V.M. Garamus, S. Lesieur, R. Willumeit, P. Couvreur. Langmuir. 2009, 25(6), 3734-3742.
[110] Solubilization of hydrophobic guest molecules in the monooléine discontinuous Q cubic mésophase and its soft nanoparticles.
R. Efrat, E. Kesselman, A. Aserin, N. Garti, D. Danino. Langmuir. 2009, 25, 1316-1326.
[111] Observing self-assembled lipid nanoparticles building order and complexity through low-energy tranformation processes.
X. Mulet, X. Gong, L.J. Waddington, C.J. Drummond. ACSNano. 2009, 3(9), 278-2797.
[112] Formation and characterization of ordered bicontinuous microemulsions.
A. Kogan, D.E. Shalev, U. Raviv, A. Aserin, N. Garti. Journal of Physical Chemistry B. 2009, 113, 10669-10678.
[113] Solubilization of food bioactives within lyotropic liquid crystalline mesophases.
I. Amar-Yuli, D. Libster, A. Aserin, N. Garti. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2009, 14(1), 21-32.
[114] Swelling and structure. Analysis of the topology and geometry of lamellar and sponge lyotropic mesophases.
S.T. Hyde. Langmuir. 1997, 13(4), 842-851.
[115] Effects of pressure and temperature on the self-assembled fully hydrated nanostructures of monooléine-oil systems.
A. Yaghmur, M. Kriechbaum, H. Amenitsch, M. Steinhart, P. Laggner, M. Rappolt. Langmuir. 2010, 26(2), 1177-1185.

[116] Molecular recognition and controlled release in drug delivery systems based on nanostructured lipid surfactants.
R. Angius, S. Murgia, D. Berti, P. Baglioni, M. Monduzzi. Journal of Physics: Condensed Matter. 2006, 18, 2203-2220.
[117] Direct and indirect thermal transistions form hexosomes to emulsified micro-emulsions in oil-loaded monoglycéride-based particles.
S. Guillot, C. Moitzi, S. Salentinig, L. Sagalowicz, M.E. Leser, O. Glatter. Colloids and Surfaces A. 2006, 291, 78-84.
[118] Soft matter dispersions with ordered inner structures, stabilized by ethoxylated phytosterols.
D. Libster, A. Aserin, D. Yariv, G. Shoham, N. Garti. Colloids and Surfaces B. 2009, 74, 202-215.
[119] Nanostructure of liquid crystalline matrix determines *in vitro* sustained release and *in vivo* oral absorption kinetics for hydrophilic model drugs.
K.W.Y. Lee, T-H. Nguyen, T. Hanley, B.J. Boyd. International Journal of Pharmaceutics. 2009, 365, 190-199.
[120] Addition of hydrophillic and lipophilic compounds of biological relvance to the monoolein/water system. I. Phase behaviour.
F. Caboi, G.S. Amico, P. Pitzalis, M. Monduzzi, T. Nylander, K. Larsson. Chemistry and Physic aof Lipids. 2001, 109(1), 47-62.
[121] Phase reorganization in self-assembled systems through interparticle material transfer.
C. Moitzi, S. Guillot, G. Fritz, S. Salentinig, O. Glatter. Advanced Materials. 2007, 19, 1352-1358.
[122] Revue – Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions.
A. Yaghmur, O. Glatter. Advances in Colloid and Interface Science. 2009, 147-148, 333-342.
[123] Revue – Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions.
A.S. Narang, D. Delmarre, D. Gao. International Journal of Pharmaceutics. 2007, 345, 9-25.
[124] Revue – Delivery systems for liquid food products.
L. Sagalowicz, M.E. Leser. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2010, 15, 61-72.
[125] Liquid crystalline phases in the structuring of food product.
I. Heertje, E.C. Roijers, H.A.C.M, Hendricks. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. 1998, 31, 387-396.
[126] Revue – Structured emulsions.
F. Leal-Calderon, F. Thivilliers, V. Schmitt. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2007, 12, 206-212.
[127] Non-TAG structuring of edible oils and emulsions.
A. Bot, Y.S.J. Veldhuizen, R. den Adel, E.C. Roijers. Food Hydrocolloids. 2009, 23, 1184-1189.
[128] Stimuli responsive liquid crystals provide 'on-demand' drug delivery *in vitro* and *in vivo*.
W-K. Fong, T. Hanley, B.J. Boyd. Journal of Controlled Release. 2009, 135, 218-226.
[129] Revue – Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives.
M.D. Joshi, R.H. Müller. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2009, 71, 161-172.
[130] pH-responsive lyotropic liquid crystals for controlled drug delivery.
R. Negrini, R. Mezzenga. Langmuir. 2011, 27, 5296-5303.
[131] The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion.

M. Golding, T.J. Wooster. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2010, 15, 90-101.
[132] Do food microemulsions and dietary mixed micelles interact.
S. Rozner, D.E. Shalev, A.I. Shames, M.F. Ottaviani, A. Aserin, N. Garti. Colloids and Surface B. 2010, 77, 22-30.
[133] Revue – Parenteral microemulsions: An overview.
A.A. Date, M.S. Nagarsenker. International Journal of Pharmaceutics. 2008, 355, 19-30.
[134] Hexosomes formed from glycerate surfactants – Formulations as a colloidal carrier for irinotecan.
B.J. Boyd, D.V. Whittaker, S-M. Khoo, G. Davey. International Journal of Pharmaceutics. 2006, 318, 154-162.
[135] On structural transitions in a discontinuous micellar cubic phase loaded with sodium diclofenac.
R. Efrat, A. Aserin, N. Garti. Journal of Colloid and Interface Science. 2008, 321, 166-176.
[136] Kinetics of lamellar-to-cubic and intercubic phase transitions of pure and cytochrome c containing monoolein dispersions monitored by time-resolved small-angle X-ray diffraction.
J. Kraineva, R.A. Narayanan, E. Kondrashkina, P. Thiyagarajan, R. Winter. Langmuir. 2005, 21, 3559-3571.
[137] Self-assembled “nanocubicle” as a carrier for peroral insulin delivery.
H. Chung, J. Kim, J.Y. Um, I.C. Kwon, S.Y. Jeong. Diabetologia. 2002, 45(3), 448-451.
[138] A cubosome formulation for intravenous administration of somatostatin.
S. Engstrom, B. Ericsson, T. Landh. Proceeding of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials. 1996, 23, 383.
[139] Drug formulations that form a dispersed cubic phase when mixed with water.
J.S. Kim, H.K. Kim, H. Chung, Y.T. Sohn, I.C. Kwon, S.Y. Jeong. Proceeding of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials. 2000, 27, 1118-1119.
[140] Infuence of cyclosporine A on molecular intercations in lyotropic reverse hexagonal liquid crystals.
P. Ben Ishai, D. Libster, A. Aserin, N. Garti, Y. Feldman. Journal of Physical Chemistry B. 2010, 114(40), 12785-12791.
[141] Characterization of drug release from cubosomes using the pressure ultrafiltration method.
B.J. Boyd. International Journal of Pharmaceutics. 2003, 260, 239-247.
[142] Glycerol monooleate – blood interactions.
E.M. Ericsson, L. Faxälv, A. Weissenrieder, A. Askendal, T.L. Lindhal, P. Tengvall. Colloids and Surfaces B. 2009, 68, 20-26.
[143] Encapsulation of haemoglobin in a bicontinuous cubic phase lipid.
S.B. Leslie, S. Puvvada, B.R. Ratna, A.S. Rudolph. Biochimica et Biophysica Acta. 1996, 1285, 246-254.
[144] Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration.
C.C. Müller-Goymann. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2004, 58(2), 343-356.
[145] Lipid cubic phases in topical drug delivery: visualization of skin distribution using two-photon microscopy.
J. Bender, C. Simonsson, M. Smedh, S. Engström, M.B. Ericson. Journal of Controlled Release. 2008, 129, 163-169.
[146] Enhancement of skin penetration of vitamin K using monooléine-based liquid crystalline systems.

L.B. Lopes, F.F.F. Speretta, M.V.L.B Bentley. European Journal of Pharmaceutical Science. 2007, 32, 209-215.
[147] Revue – Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery.
T.W. Prow, J.E. Grice, L.L. Lin, R. Faye, M. Butler, W. Becker, E.M.T. Wurm, C. Yoong, T.A. Robertson, H.P. Soyer, M.S Roberts. Advanced Drug Delivery Reviews. 2011, 6, 470-491.
[148] H_{II} mesophase and peptide cell-penetrating enhancers for improved transdermal delivery of sodium diclofenac.
M. Cohen-Avrahami, A. Aserin, N. Garti. Colloids and Surfaces B. 2010, 77, 131-138.
[149] Lipid cubic phases for improved topical drug delivery in photodynamic therapy.
J. Bender, M.B. Ericson, N. Merclin, V. Iani, A. Rosén, S. Engström, J. Moan. Journal of Controlled Release. 2005, 106, 350-360.
[150] Nanostructured liquid crystalline particles provide long duration sustained-release effect for a poorly water soluble drug after oral administration.
T-H. Nguyen, T. Hanley, C.J.H Porter, B.J. Boyd. Journal of Controlled Release. 2011, 2, 180-186.
[151] Self-assembled liquid crystalline nanoparticles as a novel ophtalmic delivery system for dexamethasone : improving preocular retention and ocular bioavailability.
L. Gan, S. Han, J. Shen, J. Zhu, C. Zhu, X. Zhang, Y. Gan. International Journal of Pharmaceutics. 2010, 1-2, 179-187.
[152] Revue – Recent advances in technologies for vitamin A protection in foods.
S.M. Loveday, H. Singh. Trends in Food Science and Technology. 2008, 19, 657-668.
[153] Structural effects, mobility, and redox behaviour of Vitamin K1 hosted in the monoolein/water liquid crystalline phases.
F. Caboi, T. Nylander, V. Razumas, Z. Talaikyté, M. Monduzzi, K. Larsson. Langmuir. 1997, 13(20), 5476-5483.
[154] Structural rearrangements and interaction within H_{II} mesophase induced by cosolubilization of Vitamin E and Ascobic acid.
L. Biran-Cherbakovsky, I. Yuli-Amar, A. Aserin, N. Garti. Langmuir. 2009, 25(22), 13106-13113.
[155] Solubilization of vitamin E into H_{II} mesophase in the presence and in the absence of vitamin C.
L. Biran-Cherbakovsky, I. Yuli-Amar, A. Aserin, N. Garti. Langmuir.2010, 26(5), 3648-3653.
[156] Orientation and specific interactions of nucleotides and nucleolipids inside monoolein-based liquid crystals.
S. Murgia, S. Lampis, R. Angius, D. Berti, M. Monduzzi. Journal of Physical Chemistry B. 2009, 113, 9205-9215.
[157] Effect of polyol on the structure of non-ionic surfactant reverse micelles in glycerol monoisostearate/decane systems.
L.K. Shrestha, T. Sato, D. Varade, K. Aramaki. Langmuir. 2010, 26(5), 3115-3120.
[158] Temperature-dependent behaviour of lysozyme within the reverse hexagonal mesophases (H_{II}).
T. Mishraki, D. Libster, A. Aserin, N. Garti. Colloids and Surfaces B. 2010, 75, 391-397.
[159] Reduction in burst release of PLGA microparticles by incorporation into cubic phase-forming systems.
A.R. Ahmed, A. Dashevsky, R. Bodmeier. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2008, 70, 765-769.
[160] Self-assembled multicompartment liquid crystalline lipid carriers for protein, peptide, and nucleic acid drug delivery.

A. Angelova, B. Angelov, R. Mutafchieva, S. Lesieur, P. Couvreur. Accounts of Chemical Research. 2010, 44(2), 147-156.
[161] Self-assembled multicompartment liquid crystalline lipid carriers for protein, peptide and nucleic acid drug delivery.
A. Angelova, B. angelov, R. Mutafchiva, S. Lesieur, P. Couvreur. Accounts of Chemical Research. 2011, 44(2), 147-156.
[162] Revue – Encapsulation of flavours in emulsions for beverages.
P.S. Given Jr. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2009, 14, 43-47.
[163] Delayed volatile compound release properties of self-assembly structures in emulsions.
V-A. Phan, Y-C. Liao, N. Antille, L. Sagalowicz, F. Robert, N. Godinot. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009, 56, 1072-1077.
[164] Flavor encapsulation in yeats: Limonene used as a model system for characterization of the release mechanism.
V. Normand, G. Dardelle, P-E. Bouquerand, L. Nicolas, D.J. Johnston. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005, 53(19), 7532-7543.
[165] Selective retardation of perfume oil evaporation from oil-in-water emulsions stabilized by either surfactant or nanoparticles.
B.P. Binks, P.D.I. Fletcher, B.L. Holt. Langmuir. 2010, 26(23), 18024-18030.
[166] Evaporation from a limonene emulsion.
S.E. Tiberg. Journal of Dispersion Science and Technology. 2007, 28, 11-20.
[167] Phase diagram and emulsions stability of surfactant-fragrance systems.
Z. Zhang, T. Denler, S.E. Friberg. International Journal of Cosmetic Science. 2000, 22, 105-119.
[168] Lysozyme entrapped within reverse hexagonal mesophases: physical properties and structural behaviour.
T. Mishraki, D. Libster, A. Aserin, N. Garti. Colloids and Surface B. 2010, 75, 47-56.
[169] Structured fluids as microreactors for flavour formation by the Maillard reaction.
S. Vauthey, C. Milo, P. Frossard, N. Garti, M.E. Leser, H.J. Watzke. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000, 48,4808-4816.
[170] Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals : drug delivery and crystallization applications.
D. Libster, A. Aserin, N. Garti. Journal of Colloid and Interface Science. **2011**, 2, 375-386.
[171] Revue - In cubo crystallization of membrane proteins.
C.V. Kulkarni. Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes. 2010, 12, 237-272.
[172] Revue – Flavour encapsulation and controlled release – a review.
A. Madene, M. Jacquot, J. Scher, S. Desobry. International Journal of Food Science and Technology. 2006, 41, 1-21.
[173] Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during *in vitro* digestion.
S.J. Hur, E.A. Decker, D.J. McClements. Food Chemistry. 2009, 114, 253-262.
[174] Formation of block copolymer-protected nanoparticles via reactive impingement mixing.
Z. Zhu, J.L. Anacker, S. Ji, T.R. Hoye, C.W. Macosko, R.K. Prud'homme. Langmuir. 2007, 23, 10499-10504.
[175] Emulsification properties of chitosan.
P.C. Schulz, M.S. Rodriguez, L.F. Del Blanco, M. Pistonesi, E. Agullo. Colloid and Polymer Science. 1998, 276, 1159-1165.
[176] Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer.
W. Klaypradit, Y-W. Huang. LWT. 2008, 41(6), 1133-1139.
[177] Internally structured pickering emulsions stabilized by clay mineral particles.

S. Guillot, F. Bergaya, C. De Azevedo, F. Warmont, J-F. Tranchant. Journal of Colloid and Interface Science. 2009, 333, 563-569.
[178] Monoglyceride-based cubosomes stabilized by laponite : separating the effects of stabilizer, pH and temperature.
F. Muller, A. Salonen, O. Glatter. Colloids and Surface A. 2010, 358, 50-56.
[179] Thermally induced gelling of oil-in-water emulsions comprising partially crystallized droplets: the impact of interfacial crystals.
F. Thivilliers, E. Laurichesse, H. Saadaoui, F. Leal-Calderon, V. Schmitt. Langmuir. 2008, 24, 13364-13375.
[180] Thermal and textural properties of organogels developed by Candelilla wax in safflower oil.
J.F. Toro-Vazquez, J.A. Morales-Rueda, E. Dibildox-Alvarado, M. Charo-Alonso, M. Alonzo-Macias, M.M. Gonzalez-Chavez. Journal of the American Oil Chemistry Society. 2007, 84(11), 989-1000.
[181] Thermostimulable Wax@SiO_2 core-shell particles.
M. Destribats, V. Schmitt, R. Backov. Langmuir. 2010, 26(3), 1734-1742.
[182] Effects of temperature on water-in-oil emulsions stabilised solely by wax microparticles.
B.P. Binks, A. Rocher. Journal of Colloid and Interface Science. 2009, 335, 94-104.
[183] Shear-induced instabilities in oil-in-water emulsions comprising partially crystallised droplets.
F. Thivilliers-Arvist, E. Laurichesse, V. Schmitt, F. Leal-Calderon. Langmuir, 2010, 26(22), 16782-16790.
[184] Revue – Emulsions with structured continuous phases.
C. Rodìguez-Abreu, M. Lazzari. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2008, 13, 198-205.
[185] Thèse – Emulsions structures et nanoparticules magnétiques dans un hydrogel: realisation, caractérisation et validation en tant que système de deliverance thermomagnétique.
I. Milosevic-Markovic. Thèse de l'Université d'Orléans. 2009.
[186] Internally self-assembled particles entrapped in thermoreversible hydrogels.
S. Guillot, M. Tomsic, L. Sagalowicz, M.E. Leser, O. Glatter. Journal of Colloid and Interface Science. 2009, 330, 175-179.
[187] Internally self-assembled thermoreversible gelling emulsions: ISAsomes in methylcellulose, k-carrageenan, and mixed hydrogels.
M. Tomsic, S. Guillot, L. Sagalowicz, M.E. Leser, O. Glatter. Langmuir. 2009, 25(16), 9525-9534.
[188] Immobilization of nanostructured lipid particles in polysaccharide films.
C.V. Kulkarni, M. Tomsic, O. Glatter. Langmuir. 2011. 27(15), 9541-9550.
[189] A lipid-based liquid crystalline matrix that provides sustained release and enhanced oral bioavailability for a model poorly water soluble drugs in rats.
B.J. boyd, S-M. Khoo, D.V. Whittaker, G. Davey, C.J.H. Porter. International Journal of Pharmaceutics. 2007, 340, 52-60.
[190] Revue – Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery.
E. Acosta. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 2009, 14, 3-15.
[191] Interaction of cubosomes with plasma components resulting in the destabilization of cubosomes in plasma.
W. Leesajakul, M. Nakano, A. Taniguchi, T. Honda. Colloids and Surfaces B. 2004, 34, 253-258.

[192] Interaction between lamellar (vesicles) and nonlamellar lipid liquid-crystalline nanoparticles as studied by time-resolved small-angle X-ray diffraction.
P. Vandoolaeghe, J. Barauskas, M. Johnsson, F. Tiberg, T. Nylander. Langmuir. 2009, 25(7), 3999-4008.
[193] Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: Formulation, optimization and *in vitro* characterization.
Z. Wei, J. Hao, S. Yuan, Y. Li, W. Juan, X. Sha, X. Fang. International Journal of Pharmaceutics. 2009, 376, 176-185.
[194] Degradation of Paclitaxel and related compounds in aqueous solutions I: Epimerization.
J. Tian, V.J. Stella. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008, 97(3), 1224-1235.
[195] Degradation of Paclitaxel and related compounds in aqueous solutions II: Nonepimerization degradation under neutral to basic pH conditions.
J. Tian, V.J. Stella. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008, 97(8), 3100-3108.
[196] Oral microemulsions of Paclitaxel : *in situ* and pharmacokinetic studies.
A.O. Nornoo, H. Zheng, L.B. Lopes, B. Johnson-Restrepo, K. Kannan, R. Reed. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2009, 71(2), 310-317.
[197] Controlled and targeted tumor chemotherapy by ultrasound-activated nanoemulsions/microbubbles.
N.Y. Rapoport, A.M. Kennedy, J.E. Shea, C.L. Scaife, K-H. Nam. Journal of Controlled Release. 3009, 138, 268-276.
[198] Drug-loaded nano/microbubbles for combining ultrasonography and targeted chemotherapy.
Z. Gao, A.M. Kennedy, D.A. Christensen, N.Y. Rapoport. Ultrasonics. 2008, 48, 260-270.
[199] Study of liquid crystal space groups using controlled tilting with cryogenic transmission electron microscopy.
L. Sagalowicz, S. Acquistapace, H.J. Watzke, M. Michel. Langmuir. 2007, 23, 12003-12009.
[200] Cryogenic transmission electon microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems.
J. Kuntsche, J.C. Horst, H. Bunjes. International Journal of Pharmaceutics. 2011. Sous presse.
[201] Neutron reflectivity studies of the interaction of cubic-phase nanoparticles with phospholipids bilayers of different coverage.
P. Vandoolaeghe, A.R. Rennie, R.A. Campbell, T. Nylander. Langmuir. 2009, 25(7) 4009-4020.
[202] Revue – Small-Angle X-Ray Scattering to characterize nanostructures in inorganic and hybrid materials chemistry.
H. Peterlik, P. Fratzl. Monatshefte für Chemie. 2006, 137, 529-543.
[203] Revue – X-ray scattering of non-crystalline biological systems using synchrotron radiation.
M.H.J. Koch. Chemical Society Reviews. 2006, 35, 123-133.
[204] Conformational study of R-(+)-Limonene in liquid phase using vibrational spectroscopy (IR, Raman and VCD) and DFT calculations.
F.P. Urena, J.R.A. Moreno, J.J.L Gonzales. Tetrahedron: Assymetry. 2009, 20(1), 89-97.
[205] Livre – Infrared Spectroscopy for food quality analysis and control.
D-W. Sun. Edité par Elsevier. 424 pages. 2009.
[206] Nile Red. A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets.
P. Greensan, E.P. Mayer, S.D. Fowler. The Journal of Cell biology. 1985, 100, 965-973.
[207] All-trans retinoic acid induced the differentiation of human glima cells.

Q-X. Liu, N.Wang, X-H. Liao, G-D. Ren, T. Qin, R-F. Yu, C-L. Cheng, G-C. Liu, T-C. Zhang. Clinical Oncology and Cancer Research. 2011, 8(1), 42-46.

Sébastien SERIEYE

Intégration de molécules fonctionnelles dans des auto-assemblages émulsionnés de monoglycérides : Évolution structurale et rôle de l'interface.

Résumé :

Depuis les années 60, les auto-assemblages de monoglycérides font l'objet de nombreuses recherches. En effet, une fois émulsifiés, ces systèmes de taille nanométrique, sont constitués de gouttelettes contenant une phase aqueuse, lipidique et une interface très importante, offrant ainsi la possibilité de solubiliser tous types de molécules. Ces réservoirs potentiels à molécules sont cependant assez fragiles et nécessitent des recherches plus abouties afin de pouvoir les rendre utilisables dans les domaines de l'alimentaire, de la pharmaceutique, de la cosmétique ou de la médecine.

Nous avons montré la possibilité de diversifier l'émulsifiant utilisé pour stabiliser ces Isasomes, permettant de faire varier à volonté les tailles de gouttelettes ainsi que leur charge de surface. Le sucrose stéarate s'est montré une très bonne alternative au F127 classiquement utilisé**.** Les conditions de fabrication et de stockage sont déterminantes dans la compréhension des Isasomes et de l'évolution de leurs structures internes. En effet, dans le cas des mélanges monolinoléine/limonène, ce dernier s'est vu décrire une évaporation dans le temps qui modifie ainsi les structures internes. Ce phénomène a été décrit pour la première fois.

Une fois les influences des conditions opératoires définies, nous avons utilisé ces Isasomes comme réservoirs à molécules d'intérêt. Nous avons alors décrit les différentes influences que ces molécules ont sur les structures internes, en fonction, de leur structure, de leur masse moléculaire et de leur solubilité. Enfin, nous avons utilisé les Isasomes comme vecteurs pour des molécules médicamenteuses. Leur utilisation a permis d'améliorer la disponibilité et l'efficacité de telles molécules.

Mots clés : Isasomes, auto-assembages, émulsion, interface, cires, vectorisation, monoglycérides.

Bioactives integration in emulsified monoglyceride self-assemblies : Structural evolution and interface role.

Summary :

Monoglyceride self-assemblies are promising vectors for bioactives or drugs. Their constitutions allow to solubilize all type of molecules. They need deeper researches to improve their stability and their applications in food, pharmaceutic, cosmetic or medicine.

We succeed to replace the commonly used emulsifier F127 with other surfactants usable in food industry. In this way we show the possibility to control their size, charge and stability. The process parameters are of primary interest to understand their formation and their stability during time. Indeed, we demonstrate for the first time an evaporation of limonene during time, changing the internal structures.

Once these parameters defined, we used these 0self-assemblies for vectorisation. We observe the influence on structures, of the solubilization of bioactives and drugs. Finally, we observe the improvement of Paclitaxel cellular internalization, when included in Isasomes.

Keywords : Isasomes, self-assembly, emulsion, interface, wax, delivery, monoglycéride, liquid crystal.

Centre de Recherche sur la Matière Divisée
1b rue de la Férollerie
45071 Orléans Cedex 2, France