



**HAL**  
open science

# Formation d'émulsions multiples stables, stimulables et biocompatibles; application à l'encapsulation et au relargage contrôlé de principes actifs

Noémi Bodin

► **To cite this version:**

Noémi Bodin. Formation d'émulsions multiples stables, stimulables et biocompatibles; application à l'encapsulation et au relargage contrôlé de principes actifs. Matériaux. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLX060 . tel-01905326

**HAL Id: tel-01905326**

**<https://pastel.hal.science/tel-01905326>**

Submitted on 25 Oct 2018

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

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

# Formation d'émulsions multiples stables, stimulables et biocompatibles; application à l'encapsulation et au relargage contrôlé de principes actifs

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à École Polytechnique

Ecole doctorale n°573 - Approches Interdisciplinaires : Fondements, Applications et  
Innovation (Interfaces)  
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Saint Aubin, le 15 octobre 2018, par

**NOÉMI BODIN**

Composition du Jury :

Florence AGNELY Professeur, Université Paris-Sud (UMR 8612)	Présidente
Claire BERTON-CARABIN Associate professor, Université de Wageningen (Unité de recherche)	Rapporteur
Sébastien LECOMMANDOUX Professeur, Université de Bordeaux - ENSCBP (UMR 5629)	Rapporteur
Flavie SARRAZIN Ingénieur, Solvay-LOF (UMR 5258)	Examinatrice
Patrick GUENOUN Directeur de recherche, CEA Saclay (UMR 3685)	Directeur de thèse
Véronique ROSILIO Professeur, Université Paris-Sud (UMR 8612)	Co-directrice de thèse
Florent MALLOGGI Chargé de recherches, CEA Saclay (UMR 3685)	Invité
Nadège PANTOUSTIER Maître de conférence, ESPCI Paris (Unité de recherche)	Invitée
Patrick PERRIN Professeur, ESPCI Paris (Unité de recherche)	Invité



# Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Claire Berton-Carabin et Sébastien Lecommandoux qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que Florence Agnely et Flavie Sarrazin qui ont examiné mon travail. Merci pour vos remarques constructives et les discussions intéressantes qui ont suivi la soutenance.

Merci à Serge Palacin, Elias Fattal et Christian Frétigny de m'avoir acceptée au sein de leurs laboratoires.

Un grand merci également à mes encadrants : Merci Patrick et Véronique pour nos discussions et vos conseils au quotidien, et pour les nombreuses relectures estivales du manuscrit. Merci Florent pour ton aide sur la partie microfluidique, en particulier au labo. Patrick et Nadège, merci de vous être toujours investis dans mon travail malgré ma présence rare à l'ESPCI. Merci à tous pour votre soutien et votre disponibilité.

Je remercie aussi tout ceux qui ont pu m'aider à un moment ou à un autre lors de ce travail de thèse : Stéphanie Denis qui m'as formée avec gentillesse et rigueur aux techniques de culture cellulaire, Sarah Brégant et Robert Thaï qui se sont beaucoup impliqués dans mes expériences de LCMS, Mohamed Hanafi qui a réalisé les mesures de GPC, David Chapron pour les expériences de tensiométrie et d'isothermes de Langmuir, et Christophe Fajolles pour celles de RMN.

Merci à Michèle Colin, Stéphanie Testamalle et Céline Delobel pour leur aide sur le plan administratif, toujours apportée avec le sourire.

Je voudrais bien sûr remercier l'ensemble du personnel des labos que j'ai fréquenté durant ces 3 ans, l'IGPS, le SIMM, mais surtout le LIONS. J'ai vraiment apprécié la bonne humeur et la bonne ambiance qui règne au sein du labo, ainsi que la volonté de créer de vraies relations amicales entre permanents et non-permanents.

Merci à tous les étudiants que j'ai pu croiser durant ces trois ans : aux stagiaires qui sont venus chaque année mettre un peu d'ambiance, Alexandre, Elsa, Maxime, Alban, Joëlle, Marine, et surtout aux nombreux stagiaires (et alternant !) de cette dernière année : Lucien, Anne-Sophie, Victoria, Malik, Joseph, Maëlle, Stan, Théo, et Firmin. Bonne continuation à tous dans ce que vous avez choisi d'entreprendre !

Merci évidemment aux doctorants avec qui j'ai pu partager ces trois années : Florian, qui nous a vite quitté pour des contrées plus ensoleillées, Rémy et ses énigmes à la pause café, Pierre, toujours présent même malade, qui m'a montré comment utiliser la moitié des appareils du labo, Alexy,

## REMERCIEMENTS

---

mon co-bureau à temps partiel, et Tobias qui m'a permis de réaliser à quel point il ne me reste rien de mes neuf années d'allemand. Pierre et Alexy, plein de courage pour la dernière ligne droite!

Merci également à mes co-bureaux du LCMCE, Alexia, Alicia, Aurélien et Lidie pour avoir animé les longues heures de rédaction passées à mon bureau.

Enfin, un merci tout particulier à Élodie, à sa serviabilité et son sourire inébranlables, à son attention à tous. C'est une vraie chance pour le labo de t'avoir!

Un immense merci à Marine, qui m'a formée sur mon sujet de thèse, qui a été une formidable encadrante de stage puis un soutien pendant la première année de thèse. J'ai vraiment apprécié de travailler avec toi, et merci encore pour toute ton aide pour l'après-thèse!

Merci à tous mes proches, amis et famille, qui ont fait le déplacement, parfois de loin, pour venir m'écouter ce 15 octobre. Cela m'a fait un réel plaisir de tous vous y voir!

Merci à Christine pour les dizaines (les centaines?) d'heures passées au téléphone cette dernière année, à discuter de tout, de rien, mais aussi de la thèse et de l'après-thèse. Merci à David qui a rendu cela possible!

Merci enfin à Jean-Baptiste, qui a subi des discussions sans fin sur les difficultés rencontrées en manips, qui a eu l'énorme courage de relire et de corriger mon manuscrit, qui m'a écouté me plaindre sans se plaindre et qui est au moins aussi heureux que moi que je sois arrivée au bout de ces trois ans...

# Introduction

Les émulsions sont des édifices instables thermodynamiquement, qui nécessitent l'ajout d'un émulsifiant pour obtenir une stabilité cinétique. Ces structures sont très utilisées pour des applications industrielles dans des domaines tels que la cosmétique, l'agroalimentaire ou encore la pharmacologie.

Les émulsions doubles eau-dans-huile-dans-eau, en particulier, sont considérées depuis quelques dizaines d'années comme des systèmes prometteurs pour l'encapsulation et le relargage de principes actifs fragiles. La couche d'huile constitue une barrière censée isoler la molécule encapsulée de son environnement extérieur et permettre ainsi de préserver ses propriétés durant le stockage. Il est aussi possible de coencapsuler au sein de ces édifices deux molécules d'affinités opposées, l'une en phase aqueuse interne et l'autre dans l'huile.

Ces émulsions sont habituellement formées en deux étapes et avec deux émulsifiants : leur obtention est donc complexe et conduit à des édifices souvent peu stables. En outre, la libération des composés encapsulés se fait dans la majorité des cas par un relargage passif, *via* la diffusion des molécules au travers de la phase huile, ou bien par coalescence des gouttelettes internes avec la phase aqueuse externe.

Depuis une quinzaine d'années, plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à la formation de ces émulsions en une seule étape et avec un unique émulsifiant. Plusieurs systèmes ont ainsi été élaborés pour permettre l'obtention d'émulsions doubles de façon très simple. Cependant, peu sont biocompatibles et peuvent effectivement être utilisés pour encapsuler des molécules d'intérêt pour le vivant. En outre, la plupart de ces travaux se concentrent sur la formation des émulsions et on trouve peu d'exemples pour lesquels l'encapsulation d'un composé est effectivement étudiée, et encore moins son relargage *via* l'action d'un *stimulus* externe.

Dans l'optique de coupler à la fois simplicité de formation et biocompatibilité, une collaboration entre les laboratoires SIMM de l'ESPCI Paris et LIONS du CEA a permis la mise au point d'un système basé sur l'utilisation d'un copolymère dibloc amphiphile polydiméthylsiloxane-*b*-poly(méthacrylate de diméthylaminoéthyle) (PDMS-*b*-PDMAEMA), permettant d'obtenir des émulsions doubles en une seule étape. Ce système présente l'avantage d'être sensible au pH, à la température et à la force ionique, permettant d'envisager un relargage contrôlé des espèces encapsulées. Il a été montré de façon qualitative que la libération d'un colorant peut être déclenchée par une diminution du pH, une augmentation de la température, ou bien par un déséquilibre de force ionique entre les phases aqueuses interne et externe. Des expériences préliminaires d'encapsulation de vitamine C ont également été réalisées.

Cette thèse a pour but de poursuivre ces travaux et d'étudier l'encapsulation de molécules au sein de ces systèmes, ainsi que leur libération contrôlée. La coencapsulation de deux composés sera également envisagée. Nous nous concentrerons en particulier sur le *stimulus* du pH pour le relargage des molécules encapsulées, dans le but de développer des systèmes pouvant être administrés par voie orale, avec libération des composés d'intérêt dans l'estomac. Nous aborderons également la formation des émulsions doubles par voie microfluidique, méthode prometteuse pour l'obtention de structures de taille et de composition bien maîtrisées.

# Glossaire

## TYPES D'ÉMULSIONS

H/E	Émulsion huile-dans-eau (directe)
E/H	Émulsion eau-dans-huile (inverse)
E/H/E	Émulsion double eau-dans-huile-dans-eau
H/E/H	Émulsion double huile-dans-eau-dans-huile

## SYNTHÈSE DES COPOLYMÈRES

ATRP	Polymérisation radicalaire par transfert d'atome ( <i>Atom Transfer Radical Polymerization</i> )
DP	Degré de polymérisation
$n_{eq}$	Nombre d'équivalents molaires
DMS	Diméthylsiloxane
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PDMS-OH	Bloc de PDMS commercial hydroxylé en bout de chaîne
PDMS-Br	Macroamorceur de PDMS bromé
DMAEMA	Méthacrylate de diméthylaminoéthyle
PDMAEMA	Poly(méthacrylate de diméthylaminoéthyle)
CuBr	Bromure de cuivre (I)
$CDCl_3$	Chloroforme deutéré
$Et_3N$	Triéthylamine
HMTETA	1,1,4,4,7,7,10,10-hexaméthyltriéthylènetétramine

## ÉTUDE DE CYTOTOXICITÉ

DMSO	Diméthylsulfoxyde
$IC_{50}$	Concentration inhibitrice médiane
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
MTX	Méthotrexate
TX 100	Triton <sup>™</sup> X 100

## COPOLYMÈRES

COPO 60b50	PDMS <sub>60</sub> -b-PDMAEMA <sub>50</sub>
COPO 60b265	PDMS <sub>60</sub> -b-PDMAEMA <sub>265</sub>
COPO 104b89	PDMS <sub>104</sub> -b-PDMAEMA <sub>89</sub>

## TECHNIQUES DE CARACTÉRISATION

Cryo-MET	Cryo-microscopie électronique à transmission
DLS	Diffusion dynamique de la lumière ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
LCMS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ( <i>Liquid Chromatography, Mass Spectrometry</i> )
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> , mesure du pouvoir antioxydant
RMN <sup>1</sup> H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique ( <i>Steric Exclusion Chromatography</i> )
UV	Ultra-violet

## DIVERS

<i>Sels</i>	
HCl	Acide Chlorhydrique
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
<i>Grandeurs physiques</i>	
CMC	Concentration Micellaire Critique
$\delta$	Déplacement chimique
LCST	<i>Lower Critical Solution Temperature</i>
PA	Pouvoir antioxydant

# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>5</b>
<b>Glossaire</b>	<b>7</b>
<b>I État de l'art</b>	<b>11</b>
I L'encapsulation . . . . .	13
I.1 Qu'encapsuler et pourquoi? . . . . .	13
I.2 Méthodes d'encapsulation . . . . .	14
I.3 Modes de libération des espèces actives encapsulées . . . . .	16
I.4 Encapsulation dans des émulsions doubles . . . . .	17
II Les émulsions . . . . .	19
II.1 Émulsions simples . . . . .	20
II.2 Émulsions stimulables et inversion de phase . . . . .	26
II.3 Émulsions multiples . . . . .	26
III Présentation du sujet d'étude . . . . .	37
III.1 Développement d'un système modèle multi-stimulable par Lucie Besnard . . . . .	37
III.2 Vers un système biocompatible... . . . . .	38
III.3 ... et l'encapsulation de principes actifs . . . . .	38
<b>II Synthèse et caractérisation de copolymères amphiphiles biocompatibles</b>	<b>51</b>
I Principes de la polymérisation radicalaire . . . . .	53
I.1 La polymérisation radicalaire contrôlée . . . . .	53
I.2 La polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (ATRP) . . . . .	55
II Protocole de synthèse . . . . .	55
II.1 Synthèse du macroamorceur PDMS-Br . . . . .	57
II.2 Synthèse du copolymère PDMS- <i>b</i> -PDMAEMA . . . . .	58
II.3 Conclusions : Copolymères synthétisés . . . . .	63
III Étude de la cytotoxicité des copolymères synthétisés . . . . .	64
III.1 Étude bibliographique de la cytotoxicité des copolymères PDMS- <i>b</i> -PDMAEMA . . . . .	64
III.2 Etude de cytotoxicité des copolymères PDMS- <i>b</i> -PDMAEMA formulés en émulsions . . . . .	66

<b>III Formation par voie mécanique d'émulsions stabilisées par des copolymères PDMS-<i>b</i>-PDMAEMA - Encapsulation et relargage d'une molécule modèle, le saccharose</b>	<b>75</b>
I Formation de différents types d'émulsions stabilisées par des copolymères PDMS- <i>b</i> -PDMAEMA . . . . .	77
I.1 Protocoles de formation et d'étude des émulsions . . . . .	78
I.2 Diagrammes d'émulsions . . . . .	82
II Déstabilisation des émulsions multiples E/H/E . . . . .	102
II.1 Déstabilisation par prélèvement de la phase aqueuse sous-nageante . . . . .	103
II.2 Déstabilisation par dialyse . . . . .	105
II.3 Conclusions . . . . .	108
III Encapsulation d'une molécule modèle, le saccharose . . . . .	108
III.1 Émulsions chargées en saccharose . . . . .	108
III.2 Encapsulation et relargage de saccharose . . . . .	112
III.3 Conclusions . . . . .	122
<b>IV Encapsulation et relargage de (+)-catéchine dans des émulsions doubles stabilisées par des copolymères PDMS-<i>b</i>-PDMAEMA</b>	<b>127</b>
I Étude bibliographique de la catéchine . . . . .	129
I.1 Propriétés thérapeutiques de la catéchine . . . . .	129
I.2 Stabilité de la catéchine . . . . .	132
II Étude expérimentale de la stabilité de la catéchine . . . . .	134
II.1 Évolution de la couleur des solutions, spectroscopie UV . . . . .	134
II.2 Étude par chromatographie liquide . . . . .	136
II.3 Étude par RMN . . . . .	139
II.4 Étude par chromatographie d'exclusion stérique . . . . .	140
II.5 Conclusion . . . . .	140
III Evolution du pouvoir antioxydant de la catéchine . . . . .	141
III.1 Méthode de mesure du pouvoir antioxydant . . . . .	141
III.2 Mesure du pouvoir antioxydant de la catéchine à différents pH . . . . .	143
IV Formation d'émulsions chargées en catéchine à l'Ultra-Turrax® . . . . .	145
IV.1 Préparation des échantillons . . . . .	145
IV.2 Émulsions formées en présence de catéchine . . . . .	146
IV.3 Lavages par dialyse des émulsions chargées en catéchine, relargage . . . . .	150
IV.4 Évolution du pouvoir antioxydant au sein des gouttelettes internes des émulsions . . . . .	157
V Résultats préliminaires de coencapsulation de catéchine et curcumine au sein des émulsions . . . . .	160
V.1 Mesures de solubilité de la curcumine dans différentes huiles . . . . .	161
V.2 Coencapsulation de catéchine et curcumine . . . . .	162
<b>V Formation d'émulsions E/H/E par voie microfluidique, encapsulation de catéchine</b>	<b>171</b>
I La microfluidique et son utilisation pour la génération de gouttes . . . . .	173
I.1 Principes généraux de la microfluidique . . . . .	173
I.2 Matériaux utilisés pour former les puces microfluidiques . . . . .	174
I.3 Génération de gouttes en microfluidique . . . . .	176

---

II	Mise au point d'une technique permettant la formation de gouttes multiples au sein de la même puce microfluidique . . . . .	183
II.1	Mode opératoire . . . . .	183
II.2	Caractérisation des surfaces protégées par le marqueur . . . . .	185
II.3	Formation de doubles émulsions E/H/E avec des tensioactifs modèles . . . . .	187
II.4	Conclusions . . . . .	188
III	Formation d'émulsions stabilisées par des copolymères PDMS- <i>b</i> -PDMAEMA par voie microfluidique . . . . .	190
III.1	Formation d'émulsions simples . . . . .	190
III.2	Formation d'émulsions doubles en microfluidique . . . . .	196
<b>VI</b>	<b>Discussion</b>	<b>213</b>
	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>221</b>
	<b>ANNEXES :</b>	<b>223</b>
A	Spectre RMN <sup>1</sup> H de PDMS-OH . . . . .	223
B	Étalonnages . . . . .	224
B.1	Droites d'étalonnage obtenues pour la catéchine . . . . .	224
B.2	Droites d'étalonnage de la curcumine dans les différentes huiles . . . . .	225
B.3	Droite d'étalonnage obtenue pour le kit K-SURFG de détection du saccharose	226
B.4	Droite d'étalonnage obtenue pour le mannane (méthode de détection de Plata)	226
C	Interactions catéchine/PDMAEMA . . . . .	226



# Chapitre I

## État de l'art

### Sommaire

---

<b>I</b>	<b>L'encapsulation</b>	<b>13</b>
I.1	Qu'encapsuler et pourquoi?	13
I.2	Méthodes d'encapsulation	14
I.2.a	Émulsions	14
I.2.b	Formation de microparticules à partir de monomères	15
	Polymérisation en émulsion	15
	Polycondensation à l'interface	15
I.2.c	Formation de microparticules à partir de polymères	15
	Précipitation de polymère	15
	Coacervation	16
I.3	Modes de libération des espèces actives encapsulées	16
I.4	Encapsulation dans des émulsions doubles	17
<b>II</b>	<b>Les émulsions</b>	<b>19</b>
II.1	Émulsions simples	20
II.1.a	Différents types de stabilisants	20
II.1.b	Mécanismes de déstabilisation des émulsions	22
II.1.c	Prédiction du type d'émulsion	23
	La règle empirique de Bancroft	23
	L'équilibre Hydrophile-Lipophile ou HLB	23
	Prise en compte de la courbure spontanée	24
II.2	Émulsions stimulables et inversion de phase	26
II.2.a	Inversion de phase	26
II.2.b	Émulsions stimulables	26
II.3	Émulsions multiples	26
II.3.a	Mécanismes de déstabilisation propres aux émulsions multiples	27
	Coalescence	27
	Déséquilibre de pression osmotique	28
	Échange de tensioactifs	28
II.3.b	Formation d'émulsions multiples	28

	Par voie mécanique en deux étapes . . . . .	29
	Par voie mécanique en une étape . . . . .	29
	Par voie microfluidique . . . . .	30
	Par membrane . . . . .	30
II.3.c	État de l'art de la formation des multiples en une étape . . . . .	31
	Stabilisation par des particules . . . . .	31
	Stabilisation par des polymères . . . . .	33
	Stabilisation par des polymères supramoléculaires . . . . .	35
	Encapsulation et relargage contrôlé . . . . .	36
	Conclusion . . . . .	36
<b>III</b>	<b>Présentation du sujet d'étude . . . . .</b>	<b>37</b>
III.1	Développement d'un système modèle multi-stimulable par Lucie Besnard	37
III.2	Vers un système biocompatible... . . . .	38
III.3	... et l'encapsulation de principes actifs . . . . .	38
	Encapsulation de principes actifs . . . . .	39
	Formation des émulsions par voie microfluidique . . . . .	40

---

# I L'encapsulation

L'encapsulation consiste à piéger un composé dans un autre matériau, de façon à modifier ses propriétés<sup>1,2</sup>.

## I.1 Qu'encapsuler et pourquoi?

De nombreuses substances peuvent gagner à être encapsulées, ce pour différentes raisons<sup>1</sup> qui sont souvent concomitantes :

- Protéger un composé fragile et éviter sa dégradation durant le stockage, l'encapsulation constituant alors un moyen de l'isoler de son environnement extérieur (oxygène, humidité, lumière, température, pH...);
- Contrôler la libération d'une molécule et sa localisation, en permettant soit un relargage instantané sous l'action d'un *stimulus*, soit la libération progressive au cours du temps, le tout à l'endroit désiré;
- Masquer les goûts ou les odeurs désagréables de certains composés nécessaires dans la formule mais qui en dégradent les qualités sensorielles;
- Permettre l'administration d'un composé non soluble en phase aqueuse;
- Protéger un composé volatil afin de le maintenir durablement dans une formulation;
- Conditionner les substances sous une forme qui en facilite le transport et le stockage avant utilisation, ainsi que leur intégration dans une formulation.

L'encapsulation est réalisée au sein de micro- ou de nanoparticules qui se divisent en deux groupes<sup>3</sup> : les micro- et les nanosphères, solides, au sein desquelles la substance d'intérêt est dispersée sous forme cristalline ou moléculaire (on parle aussi de matrices, cf FIGURE I.1(a)), et les micro- et nanocapsules, composées d'un ou plusieurs cœurs liquides aqueux ou huileux entourés d'une écorce le plus souvent constituée par un polymère (cf FIGURES I.1(b) et (c)). La molécule est dans ce cas généralement dissoute ou dispersée dans le ou les cœurs liquides, plus rarement dans l'écorce<sup>4,5</sup>.

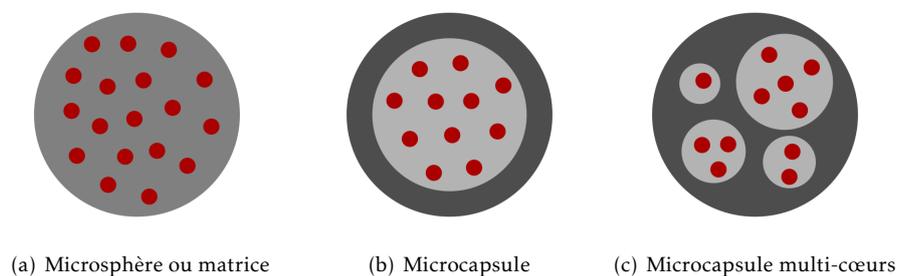


FIGURE I.1 – Représentation schématique des trois différents types de particules utilisées pour l'encapsulation.

Les premiers systèmes encapsulés furent des capsules mises au point par Green au sein de la National Cash Register Company<sup>6</sup>, dans les années 50, pour remplacer l'utilisation du papier

carbone dans la copie de documents. Ces microcapsules étaient chargées d'une encre, libérée sélectivement par rupture des membranes grâce à la contrainte mécanique exercée par le stylo sur le papier. Il était ainsi possible de dupliquer le texte rédigé plus proprement qu'avec du papier carbone.

Dans les années 70, l'industrie pharmaceutique commença à s'intéresser à l'encapsulation, capable d'améliorer significativement l'administration des médicaments<sup>7-11</sup>. C'est en effet un moyen efficace de répondre aux nombreux problèmes posés par leur délivrance, tels que la dégradation des substances actives avant administration ou avant d'atteindre l'organe cible; la mauvaise biodisponibilité, souvent liée à la solubilité insuffisante de la substance; ou encore la maîtrise difficile des doses administrées pour certaines substances particulièrement toxiques. L'un des premiers systèmes à base de capsules développé pour l'industrie pharmaceutique permit la délivrance contrôlée de la pilocarpine, substance utilisée dans le traitement des glaucomes<sup>12</sup>. Au lieu de déposer plusieurs fois par jour des gouttes contenant ce principe actif dans leurs yeux, les patients n'ont besoin que d'une dose de cette formulation en capsule pour être traités trois jours durant.

L'encapsulation trouve aussi beaucoup d'applications dans le domaine de l'agroalimentaire, par exemple pour protéger et libérer de façon durable des arômes et éviter une diminution de la saveur des aliments<sup>13</sup>. Plus récemment, l'intérêt croissant des consommateurs pour les *aliments* a fourni de nouvelles applications possibles à l'encapsulation. Ces aliments aux propriétés nutritionnelles améliorées pour augmenter leurs bénéfices pour la santé nécessitent en effet bien souvent la protection des actifs fragiles, comme les vitamines ou les antioxydants afin de conserver leurs bienfaits<sup>1,7</sup>.

L'encapsulation est également utilisée en cosmétique<sup>14,15</sup>, en chimie<sup>16,17</sup>, pour l'agriculture<sup>18,19</sup> ou encore dans certains matériaux techniques, en particulier auto-réparants<sup>20,21</sup>.

## I.2 Méthodes d'encapsulation

Les techniques permettant l'obtention de microparticules sont nombreuses<sup>1,2,7</sup>. Notre travail portant sur les émulsions, nous avons choisi de nous concentrer ici sur les techniques de formation de microparticules basées sur l'utilisation d'une émulsion. La taille des particules obtenues va principalement dépendre de la taille des gouttes de l'émulsion, les techniques présentées ici permettant de former des particules nano- ou micrométriques.

### I.2.a Émulsions

Les émulsions, dispersion d'un liquide dans un autre, sont de par leur structure des édifices qui permettent de protéger et de transporter des molécules<sup>22,23</sup>. Les émulsions simples à phase eau continue permettent le transport de composés hydrophobes. Pour le transport de molécules hydrophiles, des émulsions inverses peuvent être utilisées, ou bien des émulsions doubles eau-dans-huile-dans-eau (E/H/E)<sup>24,25</sup> qui permettent de conserver une phase continue aqueuse. Ces dernières sont constituées de globules d'huile contenant des petites gouttelettes d'eau, le tout dispersé en phase aqueuse. La couche d'huile joue le rôle d'écorce et protège la phase aqueuse de

ces capsules souvent multi-cœurs. Des émulsions huile-dans-eau-dans-huile (H/E/H) peuvent également être utilisées pour encapsuler des molécules hydrophobes, dans des cas plus restreints où il est envisageable d'avoir une phase continue huileuse.

En pratique, les émulsions simples sont rarement utilisées comme capsules pour le transport et la protection de composés. En revanche, la création d'une émulsion est souvent la première étape de la formation de sphères ou de capsules. Dans ce cas, la substance d'intérêt est dispersée ou solubilisée dans la phase dispersée de l'émulsion. La micro- ou nanoparticule est ensuite formée par polymérisation d'un ou de plusieurs monomères ou bien par précipitation ou gélification d'un polymère contenu en phase dispersée.

### I.2.b Formation de microparticules à partir de monomères

**Polymérisation en émulsion**<sup>26,27</sup> Le monomère ainsi que le principe actif à encapsuler sont dissous dans la phase dispersée. La phase continue contient quant à elle le tensioactif permettant de stabiliser l'émulsion. La polymérisation est déclenchée par un *stimulus* externe comme une augmentation de température ou l'exposition à des rayonnements UV. Au fur et à mesure de leur croissance, les chaînes synthétisées cessent d'être solubles en phase dispersée. Comme elles sont également insolubles en phase continue, elles précipitent au sein des gouttelettes, conduisant à la formation de micro- ou nanosphères.

Cette méthode d'encapsulation est beaucoup utilisée pour les pigments<sup>28-30</sup> mais elle permet également la protection de composés pharmaceutiques comme des anti-inflammatoires<sup>31</sup>.

**Polycondensation à l'interface**<sup>32</sup> Deux monomères, capables de réagir ensemble, sont dissous l'un dans la phase dispersée et l'autre dans la phase continue. La molécule à encapsuler est quant à elle dissoute en phase dispersée. Les deux monomères se condensent ensemble à l'interface eau-huile, conduisant à la formation de capsules dans le cas où le polymère formé est insoluble en phase dispersée, ou bien à des micro- ou nanosphères s'il y est soluble. On trouve dans la littérature des exemples d'antiseptiques<sup>33</sup>, d'agents anti-vieillessements<sup>34</sup> ou de protection solaire<sup>35</sup> encapsulés par cette méthode.

### I.2.c Formation de microparticules à partir de polymères

**Précipitation de polymère** Cette technique est réalisée à partir d'émulsions à phase eau continue. La précipitation du polymère contenu en phase dispersée de l'émulsion conduit à la formation de micro- ou nanoparticules. Plusieurs méthodes sont utilisées pour faire précipiter le polymère<sup>36</sup>. Dans le cas le plus simple, le solvant hydrophobe constituant la phase dispersée est simplement évaporé sous vide<sup>37</sup>. En utilisant un solvant organique présentant une certaine solubilité dans l'eau, il est aussi possible de faire précipiter le polymère par diffusion du solvant en phase aqueuse : pour cela, la phase aqueuse est saturée en solvant (et le solvant en phase aqueuse) par mise au contact des deux phases, qui sont ensuite émulsifiées. Un grand volume de phase aqueuse est dans un second temps ajouté à l'émulsion : le solvant n'est plus à saturation dans l'eau, il va donc diffuser hors des gouttes de l'émulsion, engendrant la précipitation du polymère<sup>38</sup>. Suivant le même principe, un solvant complètement miscible à l'eau (typiquement l'acétone) peut être utilisé pour former la phase dispersée de l'émulsion. Il est rendu insoluble en phase aqueuse par ajout

d'une grande quantité de sels dans celle-ci. De la même façon que précédemment, la précipitation est déclenchée par ajout d'un grand volume d'eau à l'émulsion : l'acétone redevient alors soluble dans l'eau et le polymère présent en phase dispersé précipite autour du principe actif<sup>39</sup>.

Avec cette technique, des microsphères peuvent être obtenues, mais également des capsules. Elles peuvent être à cœur huileux si la phase dispersée est constituée par un mélange huile non volatile ou insoluble en phase aqueuse / solvant organique<sup>38</sup>, ou bien à cœur aqueux si des émulsions doubles sont utilisées<sup>40</sup>.

Des anticancéreux<sup>41</sup>, des antibiotiques<sup>42</sup>, des protéines<sup>43</sup> ou encore de l'ADN<sup>44</sup> ont pu être encapsulés par ces méthodes de précipitation.

La précipitation du polymère peut également être déclenchée par la réticulation de celui-ci par chauffage ou ajout d'un réticulant<sup>45</sup>, ou dans le cas d'un polymère non soluble en phase dispersée à température ambiante, par émulsification à chaud puis diminution de la température conduisant à la gélification du polymère<sup>46</sup>.

**Coacervation**<sup>47,48</sup> Ici, on travaille avec une phase aqueuse dans laquelle est dispersé le principe actif hydrophobe, soit sous forme solide, soit en solution dans des gouttes de phases organique. La phase aqueuse contient un ou deux polyélectrolytes hydrosolubles de charges opposées. Un agent de désolvation (un alcool par exemple) est ajouté en phase aqueuse, ce qui conduit à la séparation de phase du ou des polymères qui viennent s'adsorber sous forme de précipité à l'interface phase continue / phase dispersée. Cette étape est éventuellement suivie d'une étape de réticulation permettant de rigidifier la membrane ainsi formée.

Avec cette méthode, il est possible d'encapsuler par exemple des antioxydants<sup>49</sup>, des arômes<sup>50</sup> ou encore des huiles essentielles<sup>51</sup>.

### I.3 Modes de libération des espèces actives encapsulées

Bien évidemment, pour que l'encapsulation ait un intérêt, il faut que les particules libèrent la molécule à l'endroit et au moment souhaité. Deux types de relargage peuvent être différenciés, qui correspondent à des applications et des mécanismes bien distincts.

Pour certaines applications, l'encapsulation doit permettre un relargage progressif au cours du temps. C'est le cas notamment pour la délivrance de médicaments, comme la pilocarpine dans le cas du traitement du glaucome<sup>12</sup>. Lors de l'administration d'une forme pharmaceutique conventionnelle, la molécule active est délivrée en grande quantité dans les premiers instants, puis sa concentration diminue très rapidement pour atteindre des doses auxquelles la molécule n'a plus d'effet thérapeutique<sup>52</sup>. Il est donc nécessaire de prendre le même médicament à intervalle régulier. En plus de n'agir que pendant une période de temps très limitée, la molécule risque de se trouver momentanément dans le corps en concentration trop élevée, engendrant une certaine toxicité. L'encapsulation peut pallier ce problème en permettant la libération continue d'une dose constante et optimale de la substance active, ce pendant des durées pouvant aller jusqu'à plusieurs mois pour une administration par voie sous-cutanée<sup>53</sup>.

Pour ces applications, le mécanisme de libération doit être progressif. Le plus souvent, le relargage a lieu par diffusion de la molécule active à travers la matrice ou l'écorce qui la protège. Cependant, d'autres mécanismes peuvent être utilisés, comme la décomposition progressive de

la matrice (dans le cas d'une matrice en polymère biodégradable par exemple); ou le gonflement de la matrice ou de l'écorce par le solvant dans lequel la particule est en suspension, phénomène engendrant l'apparition de pores autorisant le passage de la molécule<sup>54</sup>.

Pour d'autres applications, un relargage progressif n'est pas nécessaire ou pas souhaité. C'est le cas par exemple des capsules de Green<sup>6</sup> libérant de l'encre sous la pression du stylo. L'idée est alors d'obtenir la libération instantanée de la totalité du composé encapsulé sous l'action d'un *stimulus* externe<sup>55</sup>, qui peut être une contrainte mécanique<sup>56</sup>, mais aussi une variation du pH<sup>57-59</sup>, de la température<sup>60,61</sup>, une exposition à des rayonnements lumineux<sup>62</sup> ou à un champ magnétique<sup>63,64</sup>. Cette méthode de libération peut être utilisée en pharmacologie lorsque la principale fonction de la capsule est la protection du principe actif lors du stockage, mais aussi dans le cadre de traitement locaux où l'on souhaite délivrer le médicament à l'endroit exact désiré, notamment dans le cadre du traitement d'une tumeur cancéreuse<sup>65</sup>. Par exemple, les équipes de Kong et Grüll<sup>66,67</sup> utilisent des liposomes (vésicules à cœur aqueux formées par des phospholipides) chargés en anticancéreux pouvant être déstabilisés par une augmentation de température pour libérer localement le traitement uniquement aux cellules constituant la tumeur. Un autre exemple est le système développé par Oliviera et al.<sup>68</sup>, pour lequel l'exposition à un champ magnétique induit la perméabilisation de capsules polymériques et la libération localisée des drogues anticancéreuses.

#### I.4 Encapsulation dans des émulsions doubles

Les techniques et les applications de l'encapsulation sont nombreuses et variées. Dans ce travail, nous nous intéresserons en particulier à l'encapsulation de substances dans des émulsions doubles E/H/E. Ces dernières présentent en effet des caractéristiques intéressantes :

- La phase huile joue le rôle de barrière protectrice pour la phase aqueuse interne, l'isolant de son environnement extérieur de façon efficace ;
- Les émulsions multiples sont les seules à permettre la codélivrance de composés hydrophiles (dans les gouttelettes d'eau internes) et hydrophobes (dans la phase huile) dans des quantités similaires. Les capsules sont en effet le plus souvent constituées d'une phase solide renfermant une substance active en solution. Les émulsions doubles sont avec les liposomes les seuls systèmes à écorce liquide, ces derniers ne présentant cependant qu'un volume lipophile très restreint ne permettant pas l'encapsulation d'une grande quantité de molécules<sup>69</sup> ;
- Ces systèmes sont tout indiqués pour le relargage contrôlé déclenché par un *stimulus* externe, grâce à l'utilisation d'émulsifiants sensibles à la température ou au pH par exemple.

On trouve dans la littérature de nombreux exemples de molécules encapsulées dans des émulsions doubles, que ce soit pour les protéger de la dégradation, pour éviter des interactions non souhaitables avec d'autres composés présents dans la formulation ou dans le corps, ou encore pour masquer le goût désagréable de molécules incorporées dans la formulation car bénéfiques pour la santé<sup>70</sup>.

Des minéraux<sup>71,72</sup>, des vitamines<sup>73-77</sup>, des antioxydants<sup>78-81</sup> ou encore des microorganismes<sup>82,83</sup> ont ainsi été encapsulés au sein des gouttelettes internes d'émulsions E/H/E. Cependant, ces émulsions sont le plus souvent formées de façon complexe, en deux étapes d'émulsification, et leur

formulation nécessite généralement l'utilisation de nombreuses molécules (tensioactifs, biopolymères, sels...).

En outre, la libération des composés encapsulés se fait généralement de façon spontanée, soit par diffusion des molécules au travers de la phase huile<sup>71,73,81</sup>, soit par coalescence des gouttelettes d'eau interne avec la phase aqueuse externe<sup>73,84</sup>, sans déclenchement par un *stimulus*. L'inconvénient est la libération relativement rapide des composés : au bout d'un mois, un pourcentage non négligeable de la molécule encapsulée (dépendant des systèmes mais supérieure à 20%) est le plus souvent déjà passé en phase aqueuse externe, ce qui empêche la conservation des émulsions sur des temps longs. La résistance des formulations à un stockage de plusieurs semaines voire mois est pourtant nécessaire à l'élaboration de produits à destination des secteurs pharmaceutiques ou agroalimentaires.

Enfin, très peu d'études ont montré que la conservation des molécules sensibles au sein d'émulsions multiples permettait une réelle protection contre leur dégradation. Généralement, seule l'évolution de la quantité de composé encapsulé en phase aqueuse externe est mesurée. Cela est notamment dû au fait que les émulsions ne peuvent pas être déstabilisées de façon contrôlée par un *stimulus*, il est donc impossible d'avoir accès à l'état de la molécule en phase aqueuse interne à un instant donné. Nous allons détailler malgré tout quelques systèmes pour lesquels la protection de la molécule encapsulée a été quantifiée.

L'équipe de Shima<sup>82</sup>, ainsi que celle de Pimentel-Gonzales<sup>83</sup> ont étudié l'encapsulation de bactéries lactobacilles, probiotique supposé améliorer la flore intestinale, dans des émulsions doubles. Le nombre de bactéries vivantes est déterminé par un comptage lors de l'observation microscopique des gouttes internes de l'émulsion. Ils ont montré que la formulation en émulsion double permet aux bactéries d'être préservées lors de l'ingestion de l'émulsion du contact avec les acides biliaires responsables de la mort cellulaire des bactéries libres. La libération de ces bactéries n'a cependant pas été étudiée.

Jimenez-Alvarado et al.<sup>71</sup> font partie des seuls à s'être intéressés à la capacité des émulsions E/H/E à protéger un composé hydrophile de l'oxydation. Cependant, leurs émulsions sont stabilisées par un coacervat constitué de protéines et de polysaccharides à l'interface eau/huile externe. Ils ne travaillent donc pas purement avec des émulsions doubles puisque l'interface tournée vers l'huile est solide et non liquide. Ils ont encapsulé du bisglycinate ferreux, une molécule administrée en cas de carences en fer, dans leurs émulsions doubles formées en deux étapes, et ont étudié l'oxydation des ions  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  au sein de cette structure. Les concentrations en ions sont mesurées par des techniques de détection UV-visible dans l'émulsion double d'une part, et dans la phase aqueuse externe seule d'autre part. La façon dont la quantité d'ions au sein des gouttes internes peut être estimée demeure peu claire. Ils concluent que l'encapsulation au sein des émulsions permet de protéger le bisglycinate ferreux de l'oxydation, ce d'autant plus que l'épaisseur du coacervat protéines/polysaccharides est grande. Malgré tout, dans le meilleur des cas, une fuite de 22% des ions en phase aqueuse externe est observée au bout de 20 jours, et 30% des ions  $\text{Fe}^{2+}$  ont été oxydés en  $\text{Fe}^{3+}$ .

Gonzalez et al.<sup>85</sup> ont quant à eux étudié la capacité d'émulsions E/H/E à protéger un anti-oxydant hydrophobe, l'acide dipalmitate Kojic, utilisé dans le traitement des affections de la

peau. L'antioxydant est ici encapsulé en phase huile, et non en phase interne des gouttelettes où la protection serait *a priori* la meilleure. Il est d'ailleurs surprenant que les auteurs n'aient pas travaillé avec des émulsions H/E/H. Cependant, ils constatent que le pouvoir antioxydant de l'acide dipalmitate Kojic diminue plus lentement lorsqu'il est encapsulé au sein des émulsions que lorsqu'il est libre. Ce pouvoir antioxydant est évalué en mesurant la quantité de radicaux piégés par l'acide dipalmitate Kojic, soit libre en solution, soit formulé en émulsion. Ce n'est donc pas exactement le pouvoir antioxydant de la molécule qui est mesuré, mais le pouvoir antioxydant apparent de l'émulsion : cela ne donne donc pas directement accès à des informations sur la dégradation de la molécule.

Malgré le potentiel très important de ce type de structures, les utilisations concrètes des émulsions multiples dans le milieu industriel sont rares. Il y a nécessité de développer des méthodes pour former de façon simple ces émulsions doubles capables d'encapsuler un composé et de ne le relarguer que sous l'action d'un *stimulus*.

Dans la suite nous nous intéresserons plus en détail aux émulsions, et en particulier aux méthodes de formation et de stabilisation des émulsions doubles.

## II Les émulsions

Une émulsion est une dispersion d'un liquide dans un autre, ces deux liquides étant non miscibles, typiquement l'eau et l'huile. La phase constituant les gouttelettes est appelée phase *dispersée* tandis que la phase dispersante est appelée phase *continue*. Une troisième espèce, appelée émulsifiant, est ajoutée pour permettre la formation d'une dispersion stable de ces deux liquides de mouillabilité opposée. Elle permet notamment de diminuer la tension interfaciale entre les deux liquides. Les émulsions sont des édifices très utilisés dans les formulations des produits du quotidien, cosmétiques<sup>86-88</sup>, agroalimentaires<sup>89-91</sup> ou pharmaceutiques<sup>24,92,93</sup>.

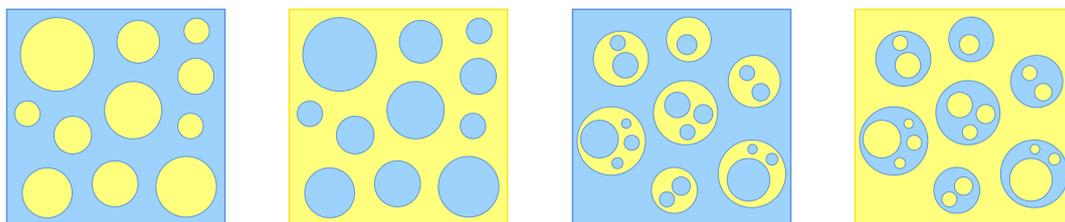
Il faut bien faire la distinction entre les *macroémulsions* et les *nanoémulsions* d'une part, et les *microémulsions* d'autre part.

Les microémulsions<sup>94,95</sup> sont des systèmes à l'équilibre thermodynamique formés entre deux phases non miscibles et en présence d'un émulsifiant. Le mélange entre les deux phases s'effectue à l'échelle nanométrique de façon spontanée, sans apport d'énergie. Le plus souvent, les microémulsions se présentent sous la forme de micelles d'émulsifiants gonflées par un liquide en suspension dans l'autre liquide, ou bien sous forme de phases bicontinues. La quantité de liquide dispersé est très faible devant la quantité de liquide dispersant (sauf dans le cas des phases bicontinues).

A l'inverse, les macroémulsions et nanoémulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables, formés lorsque de l'énergie est apportée à un système eau/huile/émulsifiant. La distinction entre ces deux types d'émulsions s'effectue principalement sur la taille des gouttes, les gouttes d'une macroémulsion étant de l'ordre du micromètre quand les nanoémulsions sont constituées de gouttes de 20 à 200 nm. Les méthodes de formation sont également différentes. Dans ces structures, les deux liquides peuvent être présents en quantité comparables. L'émulsifiant permet de donner à l'édifice instable une stabilité cinétique qui peut atteindre plusieurs années, mais l'état d'équilibre reste la séparation de phase complète.

Dans toute la suite, nous nous intéresserons uniquement aux macroémulsions que nous appelons simplement émulsions.

Il existe deux grandes catégories d'émulsions : les émulsions *simples* et les émulsions *multiples*. Dans le premier cas, l'émulsion est simplement constituée de gouttes d'un liquide dans un autre. On distingue alors deux types : les émulsions directes, gouttes d'huile dans de l'eau (H/E) (cf FIGURE I.2(a)), et les émulsions inverses, gouttes d'eau dans de l'huile (E/H) (cf FIGURE I.2(b)). Dans le second cas, l'émulsion est plus complexe : la phase dispersée est elle-même une émulsion, les deux types d'interfaces (tournée vers l'eau et tournée vers l'huile) coexistent au sein de la même structure. C'est une "émulsion dans une émulsion". Dans cette catégorie on trouve les émulsions *double* eau dans huile dans eau (E/H/E) (cf FIGURE I.2(c)) ou huile dans eau dans huile (H/E/H) (cf FIGURE I.2(d)), mais aussi des émulsions d'ordre plus élevé.



(a) Emulsion directe (E/H) (b) Émulsion inverse (H/E) (c) Émulsion double E/H/E (d) Émulsion double H/E/H

FIGURE I.2 – Différents types d'émulsions - la phase huile est représentée en jaune, la phase aqueuse en bleu, ce qui sera le cas sur toutes les figures à venir.

## II.1 Émulsions simples

### II.1.a Différents types de stabilisants

Comme évoqué plus haut, les émulsions ne sont pas des édifices stables. L'état d'équilibre d'un système eau-huile est en effet la démixtion complète, configuration qui permet de minimiser la surface de contact entre les deux liquides. Une émulsion eau/huile est un système métastable dont la stabilité au cours du temps dépend des émulsifiants utilisés.

Il existe quatre grands types d'émulsifiants :

- Les **tensioactifs** (*surfactants* en anglais), qui sont des petites molécules avec une "tête" polaire hydrophile et une "queue" hydrophobe<sup>96</sup>. Il existe des tensioactifs chargés positivement, négativement, neutres ou encore amphotères. L'utilisation des tensioactifs dans des produits à destination de l'homme, en particulier dans le domaine cosmétique, pose souvent problème du fait de leur toxicité et en particulier de leur tendance à irriter la peau en interagissant avec les graisses présentes à sa surface<sup>97</sup>. Les tensioactifs cationiques sont réputés les plus irritants. L'utilisation des tensioactifs neutres, les moins à même d'interagir avec les membranes, est privilégiée. Ces molécules ne s'adsorbent pas de façon durable aux interfaces, il suffit en effet d'une énergie de l'ordre de  $kT$  pour les désorber. Il y a donc un équilibre permanent entre les tensioactifs adsorbés à l'interface et les tensioactifs présents en volume.
  
- Les **polymères**, formés à partir d'un unique type de monomère (homopolymères) ou de plusieurs<sup>98</sup>. Ils peuvent présenter des architectures très différentes (à blocs, statistiques, alternés, greffés, en étoile, neutres, chargés...) <sup>99</sup>. L'adsorption des polymères aux interfaces est plus forte, l'énergie de désorption variant entre 10 et 100  $kT$  par chaîne suivant le polymère considéré. La stabilité des émulsions formées avec ce type d'émulsifiants est également accrue du fait de la répulsion stérique entre les gouttes, engendrée par la présence des chaînes polymérique en surface<sup>100</sup>. Les polymères permettent en outre une bonne maîtrise des propriétés rhéologiques de l'émulsion<sup>101</sup>. Enfin, leur masse molaire nettement plus élevée que les tensioactifs les rend moins toxiques car moins susceptibles de passer les barrières cellulaires.
  
- Les **protéines**, dont le comportement est similaire à celui des polymères concernant le mécanisme de stabilisation. En revanche, les conformations à l'interface diffèrent entre ces deux types de stabilisants : les chaînes sont généralement étendues de part et d'autre de l'interface dans le cas des polymères<sup>102</sup>, quand les protéines se placent plutôt à l'interface sous forme globulaire<sup>103-105</sup>. Les protéines sont à l'origine de la stabilisation naturelle de nombreuses émulsions du quotidien telles que le lait ou le beurre. Ce sont également les protéines de l'œuf qui permettent la stabilisation de la mayonnaise.
  
- Les **particules**, qui conduisent à des émulsions particulièrement stables en s'adsorbant aux interfaces avec une énergie pouvant aller jusqu'à 1000  $kT$ <sup>106</sup>, c'est-à-dire de façon irréversible. De telles émulsions sont appelées émulsions de Pickering. Des particules inorganiques ou organiques peuvent être utilisées, sous forme de particules dures<sup>107,108</sup>, mais aussi molles telles que les microgels<sup>109</sup>. L'utilisation de particules pour stabiliser des émulsions permet, outre une grande stabilité, d'obtenir une dispersion de taille de gouttes resserrée grâce au phénomène de *coalescence limitée*. Lorsque deux gouttes coalescent, le nombre de particules en surface reste constant mais la surface diminue : la densité de particules à l'interface augmente donc. Une fois que la surface d'une goutte a atteint un recouvrement maximal par les particules (la valeur de ce recouvrement dépendant du système), et comme celles-ci sont adsorbées de façon irréversible à l'interface, la goutte ne peut plus coalescer avec une autre. La coalescence des petites gouttes est donc favorisée par rapport aux grandes, et la

population se resserre petit à petit vers les grandes tailles.

### II.1.b Mécanismes de déstabilisation des émulsions

Lors du vieillissement d'une émulsion simple, celle-ci peut évoluer de différentes façons<sup>110</sup>. Certains phénomènes sont réversibles, d'autres ne le sont pas.

Deux mécanismes conduisent à terme à la séparation de phase totale de l'émulsion : le mûrissement d'Ostwald et la coalescence. Le **mûrissement d'Ostwald** (cf FIGURE I.3(a)) est le transfert de liquide des plus petites gouttes vers les plus grandes à travers la phase continue. Il est rendu possible par la solubilité, même très faible, de la phase dispersée dans la phase continue. Il est régi par la différence de pression de Laplace existant entre les gouttes : plus la courbure est grande, plus la pression est importante, les gouttes les plus grosses sont donc moins coûteuses en énergie. Un système déstabilisé par ce mécanisme voit la dispersion de taille de ses gouttes se resserrer, et le taux de croissance de la taille des gouttes tend à se stabiliser<sup>111</sup>. La **coalescence** (cf FIGURE I.3(b)) consiste en la fusion de deux gouttes par rupture du film interfacial, pour conduire à une goutte de volume plus important. Dans ce cas, les gouttes deviennent de plus en plus polydisperses et le taux de croissance de la taille des gouttes diverge, pour mener rapidement à la démixtion complète des deux phases<sup>111</sup>.

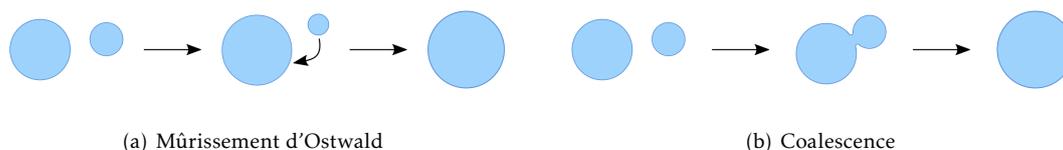


FIGURE I.3 – Mécanismes de déstabilisation d'une émulsion simple conduisant à sa démixtion.

Les autres phénomènes sont réversibles et ne conduisent pas à la destruction de l'émulsion. En revanche, ils engendrent le rapprochement des gouttelettes, ce qui favorise la coalescence. Le **crémage** (cf FIGURE I.4(a), observé généralement pour les émulsions directes) et la **sédimentation** (cf FIGURE I.4(b), observée généralement pour les émulsions inverses) sont liés à la différence de densité entre les liquides constituant les phases dispersées et continues : les gouttes remontent à la surface si elles sont plus légères et tombent au fond du pilulier si elles sont plus lourdes. La **floculation** (cf FIGURE I.4(c)) consiste en l'association des gouttelettes entre elles lorsque les forces d'attraction (déplétion, forces de Van der Waals, pontage de deux gouttes par un émulsifiant) sont plus importantes que les forces de répulsion (électrostatiques, stériques) entre les gouttes.

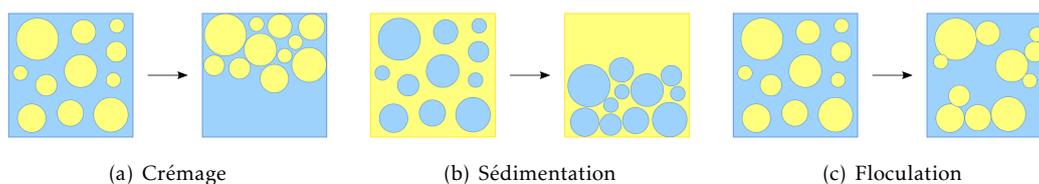


FIGURE I.4 – Mécanismes réversibles de déstabilisation d'une émulsion simple.

### II.1.c Prédiction du type d'émulsion

En formulation, il est très utile de pouvoir prédire le type d'émulsion qui va être formé préférentiellement pour un système eau/huile/émulsifiant donné.

Au cours du temps, plusieurs critères de prédiction ont été mis en place, empiriques ou plus physiques. Ces critères, détaillés dans la suite, ne tiennent pas compte de la proportion eau/huile du système considéré, qui peut pourtant avoir une importance sur le type d'émulsion stabilisé, comme nous le verrons dans la partie suivante.

**La règle empirique de Bancroft** Au début du siècle précédent, Bancroft fut le premier à observer un lien entre le type d'émulsion obtenue et la nature du tensioactif, et à formuler une règle empirique pour la formation des émulsions. Ainsi, il énonce que la phase continue sera celle dans laquelle l'émulsifiant sera préférentiellement soluble<sup>112</sup>.

Cette règle très simple a toujours été vérifiée pour des émulsions stabilisées par des tensioactifs en concentration supérieure à la Concentration Micellaire Critique (CMC), concentration à partir de laquelle le tensioactif s'organise de façon spontanée en micelles en solution<sup>113</sup>.

En ce qui concerne les polymères et les particules, la situation est plus complexe. Les particules suivent généralement la règle de Finkle<sup>114</sup>, qui énonce que la phase continue sera la phase préférentiellement mouillée par les particules. Cette règle se rapproche de la règle de Bancroft dans le sens où la phase continue est la phase pour laquelle les stabilisants ont le plus d'affinité, cependant cette phase n'est pas forcément celle dans laquelle les particules sont majoritairement dispersées. Plusieurs exceptions à cette règle ont malgré tout été démontrées dans la littérature<sup>115,116</sup>.

Les polymères, suivant leurs architectures, peuvent quant à eux adopter des conformations très variées aux interfaces. Le cas le plus simple est celui d'un copolymère dibloc pour lequel chaque bloc adopterait une conformation de brosse dans sa phase, de façon assez similaire aux tensioactifs. Cependant, l'adsorption des monomères à l'interface ne peut pas toujours être négligée, et les stabilisants utilisés n'ont pas toujours une structure de diblocs (polymères statistiques, greffés, en étoile...). Dans certains cas, la complexité du système conduit au non-respect de la règle de Bancroft<sup>117</sup>.

**L'équilibre Hydrophile-Lipophile ou HLB** Un peu plus tard, en 1949, Griffin développa la notion d'équilibre hydrophile-lipophile (*Hydrophilic-Lipophilic Balance* ou HLB) pour préciser et quantifier la règle empirique de Bancroft<sup>118</sup>. Il propose d'associer à chaque tensioactif un coefficient entre 0 et 20 sur une échelle dite HLB. Cette valeur est d'autant plus élevée que le tensioactif est hydrophile. Les tensioactifs à haut HLB stabiliseront donc préférentiellement des émulsions à phase eau continue, tandis que des bas HLB stabiliseront des émulsions à phase huile continue.

Il établit entre autre la méthode de calcul pour la famille des alkyles éthoxylés (classiquement notés  $C_iE_j$ , C représentant la chaîne carbonée à  $i$  carbones, et E la tête éthoxylée comprenant  $j$  atomes d'oxygène), une famille de tensioactifs non-ionique souvent étudiée comme modèle<sup>119</sup>. Le HLB de ces molécules s'exprime en fonction des fractions massiques  $W$  comme suit :

$$HLB = 20 \frac{W_{E_j}}{W_{C_i} + W_{E_j}}$$

Davies généralise le calcul du HLB pour tous les tensioactifs en associant un coefficient HLB à chaque groupement chimique, d'autant plus élevé que celui-ci est hydrophile<sup>120</sup>. La valeur du coefficient d'un tensioactif se calcule alors en faisant la somme des valeurs attribuées aux différents groupes :

$$HLB = 7 + \sum HLB \text{ hydrophile} + \sum HLB \text{ lipophile}$$

Cette règle empirique est très utile pour prédire le type d'une émulsion et donne généralement de bons résultats. En revanche, elle ne prend en compte que la structure chimique de la molécule tensioactive et sa plus ou moins grande affinité pour la phase aqueuse, laissant de côté d'autres paramètres non négligeables tels que la nature et le volume d'huile, la température, la force ionique ou le pH, qui interviennent eux aussi dans la formation préférée d'un type d'émulsion.

**Prise en compte de la courbure spontanée** L'introduction du paramètre de courbure spontanée, noté  $C_0$ , permet de prédire la formation d'un type d'émulsion de façon plus physique et moins empirique. La courbure spontanée correspond à la courbure de l'interface eau-huile qui est le plus en adéquation avec la géométrie du stabilisant considéré dans les conditions physico-chimiques qui l'entourent, ainsi qu'avec les interactions existant entre voisins.

Cette valeur est liée au paramètre d'empilement introduit par Israelachvili (*packing parameter*, noté PP), qui s'exprime en fonction de  $\ell_c$ , la longueur de la chaîne hydrophobe étirée;  $a_0$ , l'aire occupée par la tête polaire sur le film interfacial; et  $v$ , le volume total de la molécule<sup>121</sup> :

$$PP = \frac{v}{a_0 \ell_c}$$

Toutes ces grandeurs dépendent de l'environnement de la molécule et sont donc plus représentatives de la réalité que le calcul du HLB dont la valeur ne dépend que de la structure chimique.

Israelachvili relie la valeur du PP à la forme du tensioactif et à sa façon de s'assembler spontanément lorsqu'il est dilué dans un solvant. Ces données sont présentées dans le TABLEAU I.1. Par convention, une courbure négative est tournée vers l'eau, tandis qu'une courbure positive est tournée vers l'huile.

Très tôt, en 1917, Harkins et Langmuir émirent l'hypothèse selon laquelle le type d'émulsion formé serait directement lié à la courbure spontanée du tensioactif<sup>122,123</sup>. Ainsi, un tensioactif présentant un paramètre d'empilement inférieur à  $\frac{1}{2}$ , avec une tête polaire très volumineuse et une petite queue hydrophobe, stabiliserait préférentiellement une interface de courbure similaire, donc une interface tournée vers l'huile, pour éviter une frustration de courbure. Cependant, une molécule de tensioactif étant entre 1 000 et 100 000 fois plus petite que la goutte qu'elle stabilise, l'interface apparaît plane à l'échelle de la molécule tensioactive. La courbure spontanée ne peut donc pas être directement reliée au type de gouttes préférentiellement stabilisé.

Nettement plus tard, en 1996, Kabalnov et Wennerström proposèrent donc une interprétation plus juste de l'influence de la courbure spontanée, en considérant cette fois-ci les films interfaciaux séparant les gouttes plutôt que les gouttes elles-mêmes<sup>124</sup>. Lors de la coalescence entre deux gouttes, un fin canal de liquide s'ouvre entre elles, encadré par un film de phase continue, comme représenté sur le dessin central de la FIGURE I.5. Si la courbure engendrée par la formation de ce

Forme du tensioactif				
PP	$< \frac{1}{3}$	$\frac{1}{3} < PP < \frac{1}{2}$	$\frac{1}{2} < PP < 1$	$> 1$
$C_0$	$\gg 0$	$> 0$	$\approx 0$	$< 0$
Morphologie de l'assemblage	Micelles sphériques	Micelles cylindriques	Vésicules ou bicouches	Micelles inverses

TABLEAU I.1 – Représentation de la géométrie des tensioactifs en solution selon la valeur du paramètre d'empilement, lien avec la morphologie des auto-assemblages formés.

film est favorable, c'est-à-dire correspond à la courbure préférée par le tensioactif, alors le film est stabilisé et le canal s'élargit, conduisant à la coalescence des deux gouttes (cf FIGURE I.5, à droite). Si au contraire la courbure spontanée du tensioactif est opposée à celle du film, une frustration de courbure apparaît : la propagation du film est défavorable et le canal se referme (cf FIGURE I.5, à gauche). Cette fois-ci, les gouttes ne coalescent pas. Ce raisonnement est similaire à celui de Harkins et Langmuir mais les échelles de taille mises en jeu lors de la formation du film sont cette fois beaucoup plus comparables à la taille des molécules.

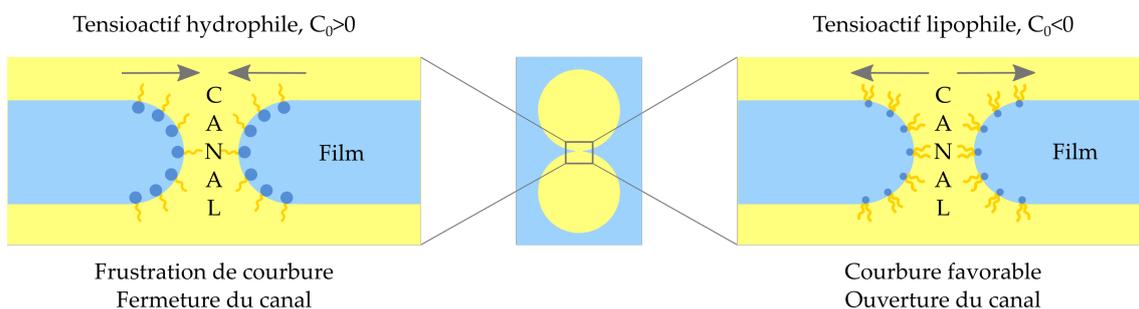


FIGURE I.5 – Schéma illustrant le comportement du tensioactif à l'interface lors de l'ouverture d'un canal de liquide entre deux gouttes de phase dispersée (ici dans le cas d'un tensioactif hydrophile).

Cette étude rationalise les comportements observés par Bancroft<sup>112</sup>, mais ne remet pas en cause l'assertion selon laquelle la phase continue est la phase pour laquelle le stabilisant aura la meilleure affinité.

## II.2 Émulsions stimulables et inversion de phase

### II.2.a Inversion de phase

Une inversion de phase se produit lorsque la phase continue d'une émulsion devient sa phase dispersée et *vice-versa*. Deux types d'inversion de phase peuvent être distingués<sup>125</sup>. L'inversion dite *catastrophique* tire son nom de la théorie des catastrophes<sup>126</sup> et se produit lors d'une modification de la composition de l'émulsion (quantité d'eau, d'huile ou bien encore d'émulsifiant). Cette transition de phase est irréversible : il est impossible de retrouver l'état dans lequel était le système préalablement à l'inversion. L'inversion dite *transitionnelle* a lieu lorsqu'un paramètre physico-chimique tel que la température<sup>127</sup>, le pH<sup>107</sup>, la force ionique<sup>128</sup> ou encore la lumière<sup>129</sup> est modifié. Une telle transition peut être parfaitement réversible lorsqu'elle est induite par un paramètre qui ne modifie pas la composition du système, comme la lumière ou la température. Elle n'est pas véritablement réversible lorsque l'on fait varier une concentration (en ions par exemple) car le retour à l'exact état initial est impossible.

Les inversions de phase, qu'elles soient transitionnelles ou catastrophiques, se divisent en deux catégories : les inversions *standards*, pour lesquelles un échantillon différent est étudié pour chaque condition considérée, et les inversions *dynamiques* pour lesquelles la transition est observée *in situ* au sein d'un même échantillon lorsque les paramètres sont variés<sup>130</sup>.

### II.2.b Émulsions stimulables

Les émulsions stimulables sont des émulsions que l'on peut casser ou dont on peut modifier le type en agissant sur un *stimulus* externe. La stimulabilité présente un intérêt notamment dans le cas d'émulsions multiples au sein desquelles un principe actif est encapsulé : la modification du type d'émulsion peut ainsi engendrer de façon contrôlée la libération de la molécule. Nous verrons des exemples plus précis dans la suite de ce chapitre.

## II.3 Émulsions multiples

Les émulsions multiples sont constituées d'une émulsion dans une émulsion. Comme vu au début de ce chapitre, on peut distinguer les émulsions doubles constituées de trois phases (E/H/E ou H/E/H) des émulsions d'ordre plus élevé. Pour plus de clarté, nous utiliserons dans la suite le vocabulaire suivant : les *gouttelettes internes* désigneront les plus petites gouttes, encapsulées au sein des *globules*, les gouttes de phase intermédiaire, et la *phase externe* désignera la phase continue.

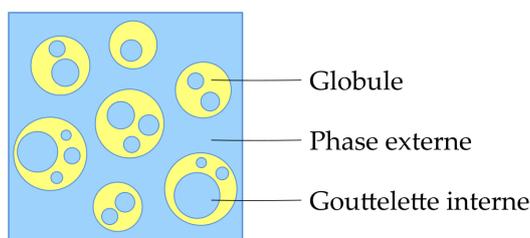


FIGURE I.6 – Vocabulaire employé pour désigner les différents éléments d'une émulsion double.

On définit en outre le *taux d'encapsulation* comme le rapport entre le volume de phase interne

et la somme des volumes des phases internes et externes. Par exemple, pour une émulsion E/H/E, le taux d'encapsulation correspond à la proportion d'eau constituant les gouttelettes internes.

Les émulsions multiples ont été découvertes par hasard par Seifriz en 1925<sup>131</sup> lors de son étude de l'inversion de phase catastrophique d'une émulsion de pétrole stabilisée par de la caséine, une protéine naturelle présente notamment dans le lait. Elles n'ont cependant fait l'objet de réelles études qu'à partir des années 60, Herbert ayant été le premier à utiliser leur pouvoir d'encapsulation pour l'ovalbumine<sup>132</sup>.

### II.3.a Mécanismes de déstabilisation propres aux émulsions multiples

Les mécanismes de déstabilisation des émulsions simples présentés page 20 existent également pour les émulsions multiples. Cependant ces structures plus complexes sont en outre soumises à des mécanismes de déstabilisation qui leur sont propres. Nous les présenterons ici pour des émulsions doubles mais ces mécanismes sont généralisables aux émulsions d'ordres plus élevés.

**Coalescence** Pour une émulsion double, il existe trois types de coalescence<sup>133</sup> :

- la coalescence entre gouttelettes internes (cf FIGURE I.7(a));
- la coalescence entre globules (cf FIGURE I.7(b));
- la coalescence entre les gouttelettes internes et la phase externe (cf FIGURE I.7(c)).

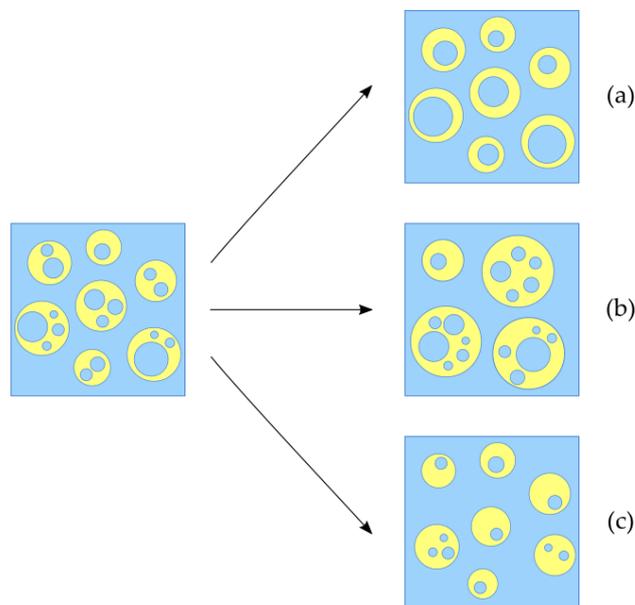


FIGURE I.7 – Mécanismes de coalescence spécifiques aux émulsions multiples. (a) Coalescence des gouttelettes internes entre elles, (b) Coalescence des globules, (c) Coalescence gouttelettes internes/phase externe.

La coalescence entre globules peut conduire à terme à une démixtion de l'émulsion, comme nous l'avons vu précédemment. La coalescence entre phases aqueuses internes et externes conduit à la perte de la structure multiple pour aller vers une émulsion simple, directe ou bien inverse.

Ce phénomène peut se décomposer en deux étapes : en premier lieu, les gouttelettes internes s'adsorbent à l'interface globules/phase externe, puis un canal s'ouvre entre les deux phases, conduisant à la coalescence. La coalescence entre gouttelettes internes ne conduit quant à elle ni à un déphasage de l'émulsion, ni à la perte de la structure multiple, cependant le grossissement des gouttelettes risque de favoriser leur coalescence avec la phase aqueuse externe.

**Déséquilibre de pression osmotique** Ce mécanisme de déstabilisation est propre aux émulsions multiples. Il est dû à la différence de composition qui peut exister entre les phases aqueuses interne et externe<sup>133</sup>. Si la phase interne est plus concentrée en une molécule ou un ion que la phase externe, alors les gouttelettes internes vont petit à petit être gonflées par la phase externe de façon à diluer cette molécule ou cet ion, comme illustré à la FIGURE I.8(a). A l'inverse, si la phase externe est la plus concentrée, les gouttelettes internes vont avoir tendance à se vider dans la phase externe, comme présenté à la FIGURE I.8(b). Ceci se produit dans le cas où la molécule est insoluble dans les globules, si non il peut arriver que ce soit la molécule qui diffuse au travers de la phase intermédiaire pour équilibrer les concentrations internes et externes<sup>134</sup>.

*A priori*, ce phénomène ne conduit pas à la perte de la structure multiple, sauf lorsqu'il est poussé à l'extrême : les gouttelettes sont alors soit complètement vidées en phase externe, soit tellement gonflées que la coalescence avec la phase externe est très favorisée. On tend dans ces deux cas vers une émulsion simple.

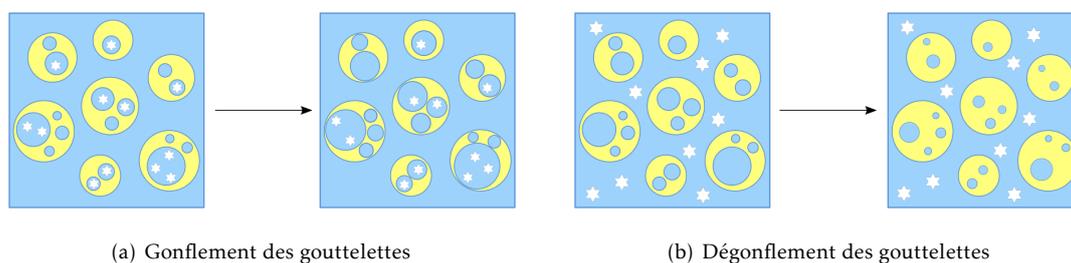


FIGURE I.8 – Mécanismes de déstabilisation des émulsions multiples engendrés par un déséquilibre de pression osmotique. Les étoiles blanches représentent les molécules présentes initialement dans la phase (a) interne ou (b) externe.

Ce transport de matière *via* la phase intermédiaire s'effectue grâce à une certaine solubilité de la phase interne en phase intermédiaire, ou bien grâce aux micelles de stabilisants gonflées par le liquide constituant les phases externes et internes<sup>135</sup>.

**Échange de tensioactifs** Dans le cas le plus courant où les émulsions sont stabilisées par deux types de tensioactifs de courbures spontanées opposées, il peut se produire un échange de tensioactifs entre les deux interfaces<sup>136,137</sup>. Ceci conduit à terme à la démixtion complète de l'émulsion du fait de l'inversion de courbure imposée par les tensioactifs ayant migré d'une interface à l'autre.

### II.3.b Formation d'émulsions multiples

Il existe plusieurs manières très différentes de former des émulsions multiples.

**Formation d'émulsions multiples par voie mécanique en deux étapes** Généralement, les émulsions doubles sont formées par voie mécanique (cisaillement des deux liquides entre eux pour former des gouttes) en deux étapes<sup>135,138</sup>. Par exemple, pour une émulsion E/H/E, une émulsion inverse stabilisée par un tensioactif lipophile est formée en premier lieu (cf FIGURE I.9(a)). Cette émulsion primaire est ensuite réémulsifiée avec une phase aqueuse contenant un tensioactif hydrophile pour former une émulsion double (cf FIGURE I.9(b)).

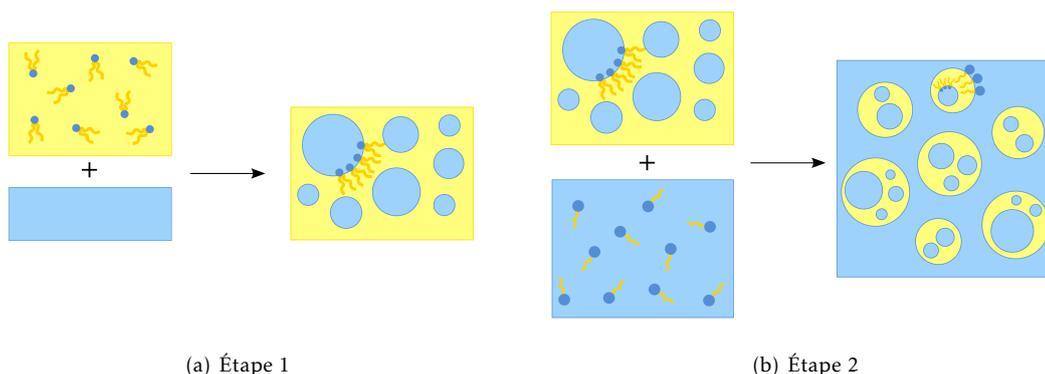


FIGURE I.9 – Schéma des deux étapes successives pour la formation d'émulsions doubles. (a) Étape 1 : Formation d'une émulsion inverse en présence d'un tensioactif hydrophobe, (b) Étape 2 : Réémulsification avec une phase aqueuse contenant un tensioactif hydrophile.

L'avantage de cette technique est qu'elle permet une bonne maîtrise de l'encapsulation : les phases aqueuses internes et externes sont différentes, il est donc possible de dissoudre un principe actif dans la phase aqueuse interne uniquement<sup>78,84,139</sup>. Le taux d'encapsulation est également connu, il correspond au volume d'eau introduit lors de la formation de l'émulsion inverse primaire. Cependant, cette technique présente l'inconvénient d'être assez difficile à réaliser car la seconde étape d'émulsification est délicate, l'émulsion primaire risquant d'être détruite. De plus, la possible migration des tensioactifs d'une interface à l'autre nuit à la stabilité des édifices formés. La taille des gouttes n'est pas du tout maîtrisée. Enfin, la stabilité difficile à atteindre pour ce genre d'édifices nécessite souvent l'utilisation d'une quantité importante de tensioactifs. Il est alors difficile de stabiliser ces structures complexes avec des tensioactifs autorisés en cosmétique, agroalimentaire ou pharmaceutiques, qui en sont les trois principaux domaines d'applications<sup>140</sup>.

**Formation d'émulsions multiples par voie mécanique en une étape** Pour pallier les difficultés rencontrées lors de la formation d'émulsions multiples en deux étapes se sont développés récemment des systèmes permettant l'obtention d'émulsions doubles en une unique étape<sup>140</sup>. Cela permet de s'affranchir des risques de déstabilisation lors de la deuxième étape d'émulsification. Les émulsifiants utilisés sont souvent des polymères ou des particules, ce qui conduit également à une meilleure stabilité des deux types d'interfaces. Ces émulsifiants plus volumineux vont en effet très peu, voire pas, s'échanger entre les interfaces tournées vers l'eau et celles tournées vers l'huile. La répulsion stérique entre les gouttes permise par ce type de stabilisants accroît encore la stabilité des édifices<sup>100</sup>.

Les mécanismes de formation de ces émulsions en une étape sont encore mal compris, notamment le choix de la phase continue de l'émulsion double. Très récemment, l'équipe de Zhang<sup>141</sup>

a tenté de rationaliser la formation d'émulsions multiples en une étape à partir d'un système stabilisé par plusieurs tensioactifs et/ou copolymères. Ils concluent qu'il est primordial que les tensioactifs soient capables de stabiliser une interface E/H, ce qui est lié à la structure chimique du tensioactif hydrophobe et à sa solubilité dans l'huile. La solubilité du tensioactif hydrophile en phase huile semble en revanche peu importante. Dans le cas de copolymères amphiphiles, ceux-ci ne doivent pas être trop hydrophiles. Enfin, la formation d'émulsions doubles est favorisée par une huile peu polaire. Ces critères ont cependant été vérifiés uniquement pour des systèmes particuliers et les conclusions ne s'appliquent pas forcément dans tous les cas.

Cette méthode en une étape présente elle aussi quelques inconvénients, notamment le fait que les phases internes et externes soient identiques. Cela conduit à une mesure difficile du taux d'encapsulation, mais également à la présence de principe actif dans la phase externe si l'on souhaite protéger une molécule au sein des émulsions. Cependant ce dernier point n'est pas nécessairement problématique, dès lors que les éventuels produits de dégradation de la molécule ne sont pas dangereux ou mauvais.

Des exemples de formation d'émulsions multiples par cette technique seront détaillés dans le prochain paragraphe.

**Formation d'émulsions multiples par voie microfluidique** Nous avons au cours de ce travail étudié la formation d'émulsion E/H/E par voie microfluidique. Plus de détails à propos de cette technique seront donnés dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

La microfluidique utilise des canaux micrométriques pour former une à une les gouttes constitutives de l'émulsion. On commence par produire des gouttelettes de phase interne dans la phase intermédiaire, et dans un second temps sont formés les globules de phase intermédiaire encapsulant des gouttelettes<sup>142-144</sup>. La microfluidique présente l'intérêt de former des gouttes de taille et de composition parfaitement maîtrisées. Les gouttes sont monodisperses, et là encore les phases internes et externes sont distinctes, ce qui permet l'encapsulation sélective d'un principe actif en phase aqueuse interne, ainsi que la connaissance précise du taux d'encapsulation. Cette technique permet de former aussi bien des émulsions doubles des deux types que des émulsions d'ordre plus élevé, au moins jusqu'à 6<sup>145</sup>. Elle offre aussi la possibilité d'encapsuler deux (ou plusieurs) phases internes différentes au sein des gouttes<sup>146</sup>.

En revanche, c'est une technique assez complexe à mettre en place, qui nécessite des équipements particuliers. Elle est également coûteuse en temps car nécessite la création des microcanaux dans un premier temps, puis la formation des gouttes à des débits de l'ordre de la dizaine de microlitres par minute.

**Formation d'émulsions multiples par voie membranaire** Cette méthode de formation des émulsions multiples consiste à faire passer une émulsion simple au travers des pores d'une membrane. Les globules ainsi formés sont détachés des pores et libérés dans la phase externe<sup>147</sup> (cf FIGURE I.10). Cette technique présente l'avantage d'être rapide, tout en conduisant à des globules relativement monodisperses. Cela en fait une technique de choix pour la production industrielle d'émulsions.

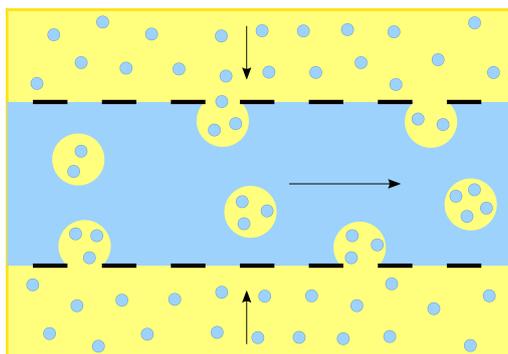


FIGURE I.10 – Formation d'émulsions doubles par voie membranaire.

### II.3.c État de l'art de la formation des émulsions multiples en une étape

Comme vu au paragraphe précédent, la formation d'émulsions multiples en deux étapes est complexe et conduit à des émulsions difficiles à stabiliser. L'émulsification en une étape permet de répondre à ces problématiques. Pour les systèmes stabilisés par des tensioactifs uniquement, il est possible d'obtenir des émulsions multiples dans une zone très restreinte autour de l'inversion de phase catastrophique des émulsions. C'est d'ailleurs ainsi que furent observées pour la première fois des émulsions multiples<sup>131</sup>. Les émulsions ainsi obtenues sont généralement très peu stables, seulement quelques heures pour les émulsions observées par Seifriz. Li et al. ont cependant réussi récemment à produire des émulsions multiples stables par inversion catastrophique, stabilisées par l'acide 12-acryloxy-9-octadécénoïque (AOA), neutralisé par ajout d'ammoniac<sup>148</sup>. Ce phénomène est expliqué par les auteurs par la capacité de l'AOA à stabiliser les deux types d'émulsions simples. Cependant, les stabilisants polymères ou à base de particules sont généralement préférés pour l'obtention d'émulsions multiples stables sur plusieurs mois<sup>138</sup>.

**Émulsions multiples en une étape stabilisées par des particules** Les premiers systèmes ayant permis la formation en une étape d'émulsions multiples furent stabilisés par des particules et développés par Binks et son équipe en 2003<sup>149</sup>. Leur système basé sur l'utilisation de nanoparticules de silice partiellement hydrophobisées par le greffage de silanes à longue chaîne carbonée permet l'obtention d'émulsions E/H/E par inversion de phase catastrophique<sup>108,149,150</sup>.

Un peu plus tard, la même équipe étudie les émulsions stabilisées par des latex de polystyrène (PS) entourés par des copolymères diblocs poly(méthacrylate de méthyle)-poly(méthacrylate de diméthylaminoéthyle) (PMMA-*b*-PDMAEMA)<sup>127</sup>. Le bloc PMMA permet l'adsorption des chaînes de polymères à la surface des particules de PS, tandis que le PDMAEMA confère aux particules ainsi formées une sensibilité à l'environnement extérieur. L'évolution du type d'émulsion formé en fonction de la température, variant entre 25 et 70°C, est étudiée. Deux types d'expériences sont menées : dans le premier cas, une émulsion H/E préparée à température ambiante est chauffée progressivement. Aucune inversion de phase n'est constatée, mais la coalescence des gouttes est observée à partir de 60°C. Dans le second cas, les deux phases (eau et hexadécane) et les particules déposées à l'interface sont mises en contact et chauffées avant émulsification, une émulsion différente étant réalisée pour chaque température. Une inversion de phase est observée vers 55°C : les émulsions formées aux températures inférieures sont directes, et aux températures supérieures

inverses. Dans la zone de transition, des émulsions multiples E/H/E stables sont observées. La différence de comportement mise en évidence dans ces deux expériences est expliquée par les auteurs par une meilleure répartition des particules entre les deux phases lorsqu'elles sont mises au contact préalablement à l'émulsification. Quand la température augmente, les liaisons hydrogènes créées par le PDMAEMA avec l'eau sont rompues, et le polymère devient plus hydrophobe, ce qui favorise la formation d'émulsions à phase huile continue. L'inversion de phase observée est ici standard et non dynamique puisqu'elle n'est pas observée *in situ* en chauffant une émulsion.

Le groupe de Liu stabilise des émulsions doubles grâce à des nanoparticules de silice fonctionnalisées par des polymères en étoile à base de polyéthylène glycol (PEG), PS et poly((3-triisopropoxyloxy)silyl)propylméthacrylate) (PIPSMA)<sup>151</sup>. La stabilité de ces émulsions n'est pas étudiée ici car les polymères stabilisant les interfaces sont réticulés après formation des émulsions pour conduire à la formation de capsules. Dans ce système, le PIPSMA joue le rôle de point d'ancrage des polymères à la surface des particules de silice. Le PEG est hydrophile, et le PS hydrophobe. Différents types d'émulsions sont formées, dépendantes de la phase dans laquelle les particules sont initialement dispersées. Si elles sont ajoutées à la phase huile, alors les PS sont étendus et les PEG sous forme collapsée, et des émulsions inverses sont stabilisées. À l'inverse, en phase aqueuse, les PS sont sous forme collapsée et les PEG étendus et des émulsions directes sont formées. Si les particules sont dispersées dans les deux phases, des émulsions multiples H/E/H sont obtenues. Il est intéressant de noter que la règle de Finkle reliant la mouillabilité des particules au type d'émulsion formé<sup>114</sup> est ici difficile à appliquer.

Zhu et son équipe utilisent des micelles de copolymères statistiques autoassemblées puis séchées pour obtenir des particules<sup>152</sup>. Ce système, basé sur l'utilisation du copolymère poly(dodecylacrylate-*stat*-acide acrylique) pour la formation des particules, permet d'obtenir des émulsions avec des phases organiques variées, très peu visqueuses comme l'acétate d'éthyle ou beaucoup plus comme l'huile de paraffine. Lorsque la proportion d'huile est modifiée, une inversion de phase catastrophique est obtenue avec formation d'émulsions multiples. De façon intéressante, les deux types d'émulsions doubles, E/H/E et H/E/H, peuvent être obtenues, selon la phase organique utilisée. Ces particules sont également sensibles au pH de par les groupes acides carboxyliques portés par le copolymère. Une inversion de phase transitionnelle standard est observée par variation du pH : des émulsions E/H/E sont stabilisées aux bas pH et des émulsions inverses aux pH élevés. Une émulsion double formée à pH 5,5 est stable sur plus de 4 mois.

Tu et al. travaillent avec des particules Janus présentant une moitié riche en PS, hydrophobe, et une moitié riche en poly(acide acrylique), hydrophile<sup>153</sup>. Ce système est susceptible de conduire à une inversion de phase catastrophique : en diminuant la fraction de la phase huile, ici du toluène, on passe d'émulsions inverses à des émulsions multiples E/H/E. La morphologie des émulsions peut également être modifiée par le pH : en effet, l'acide acrylique est chargé à haut pH, et donc plus hydrophile. À basse fraction volumique en toluène, la formation d'émulsions directes est ainsi favorisée à haut pH, tandis que des émulsions E/H/E sont formées à bas pH. Il est possible de passer de façon continue d'une émulsion multiple à une émulsion directe par simple ajout de NaOH en phase aqueuse externe : on est alors capable de libérer de façon contrôlée un éventuel principe actif encapsulé dans les gouttes d'eau internes. Les auteurs réalisent d'ailleurs des tests

d'encapsulation d'un colorant modèle, la calcéine, dont le relargage contrôlé a pu être observé par augmentation du pH.

Enfin, Chen et al.<sup>154</sup> ont développé un stabilisant à la frontière entre polymère et particule, basé sur l'utilisation d'un cœur de polymère réticulé sur lequel sont fixés des bras de PDMAEMA (CCS ou *Core Cross-linked Star*). Le cœur est compact et dur, comme une particule solide, tandis que les bras sont mobiles et flexibles, de la même façon qu'une chaîne de polymère linéaire. Le PDMAEMA est un polymère sensible au pH, chargé à bas pH et neutre à pH élevé. Les CCS sont initialement solubilisés en phase aqueuse à tous pH, et stabilisent des émulsions eau - toluène directes à bas pH, des émulsions inverses à haut pH, et aux pH intermédiaires des émulsions E/H/E puis H/E/H. L'inversion de phase transitionnelle est ici reliée à la solubilité du stabilisant : à bas pH, il est soluble en phase aqueuse tandis qu'à haut pH il est présent en phase huile. La formation de multiples est ici expliquée par l'équilibre créé aux pH intermédiaires entre la présence majoritaire de CCS dans la phase continue et minoritaire dans la phase constituant les globules, permettant la stabilisation des deux types d'interfaces.

**Émulsions multiples en une étape stabilisées par des polymères** Il existe plusieurs systèmes utilisant à la fois un ou plusieurs polymères et un ou plusieurs tensioactifs pour stabiliser des émulsions E/H/E en une seule étape. Par exemple, Hoppel et al.<sup>155</sup> forment des émulsions doubles stabilisées conjointement par du Tween<sup>®</sup> et du Span<sup>®</sup> 80, ainsi que par du stéarate de saccharose. La stabilité à long terme est accrue grâce à l'ajout d'un mélange commercial de deux polymères, les gommes xanthane et d'acacia, permettant de viscosifier les phases aqueuses et de défavoriser la coalescence. Le 5-fluorouracile, un anticancéreux, est encapsulé dans les émulsions et sa diffusion au travers de la peau après déstabilisation des émulsions multiples sous contrainte mécanique a pu être observée. Suivant la même idée, l'équipe de Patel<sup>156</sup> forme des émulsions eau-huile de tournesol en présence d'un tensioactif courant, le polyglycérol polyricinoléate (PGPR), et d'un mélange carraghénane - gomme de caroube. Ces deux polymères naturels n'ont pas de pouvoir tensioactif en tant que tels, mais sont capables de former un gel faible en phase aqueuse lorsqu'ils y sont tous deux présents, favorisant ainsi la stabilisation d'émulsions doubles.

Hanson et al.<sup>157</sup> furent les premiers, en 2008, à proposer un système capable de former des émulsions multiples basé sur l'utilisation d'un stabilisant polymère unique, sans y adjoindre de tensioactifs. Ils utilisent pour cela un copolypeptide constitué d'un bloc de polylysine, hydrophile, et d'un bloc de polyleucine, hydrophobe. Des émulsions multiples sont obtenues entre l'eau dans laquelle est dissous le polymère et une huile siliconnée, via un système d'émulsification à haute pression. Les gouttes obtenues sont de l'ordre de la centaine de nanomètres, taille visée par les auteurs pour permettre l'utilisation des émulsions ainsi formées par voie intraveineuse. Les émulsions doubles sont stables sur plus de 9 mois, possiblement grâce aux liaisons hydrogènes interchaînes qui peuvent se former en phase huile, rendant ainsi l'interface H/E très robuste. Des colorants hydrophiles et lipophiles peuvent être encapsulés pendant 3 mois dans ces émulsions, durée au delà de laquelle ils commencent à diffuser à l'extérieur.

Le travail sur ce système a été poursuivi en 2014 par l'équipe de Zhang<sup>158</sup> qui étudie l'effet du sel sur la formation d'émulsions multiples entre l'eau et des chaînes triglycérides de taille moyenne (*Medium Chain Triglycerides*, MCT) stabilisées par les mêmes copolymères. Ils obtiennent

des émulsions multiples E/H/E en présence de chlorure de sodium pour des fractions d'huile entre 40 et 60 %. Ils observent que le nombre de gouttelettes par globule varie avec la valence de l'anion utilisé : plus la valence est élevée, plus les gouttelettes au sein d'un globule d'huile sont petites et nombreuses. La valence du cation, en revanche, n'a aucune influence, probablement car le bloc polylysine est chargé positivement et interagit donc uniquement avec les anions.

L'équipe de Ngai a travaillé sur des copolymères poly(éthylène glycol)-polystyrène (PEG-PS), qui sont capables lorsque dissous en phase huile de stabiliser des émulsions multiples E/H/E entre l'eau et le toluène, pour des fractions volumiques de toluène comprises entre 20 et 70 %<sup>159</sup>. La formation de ces émulsions se produit lors d'une inversion de phase catastrophique. La bonne stabilité, sur plus de six mois, de ces émulsions, est expliquée comme suit par les auteurs : le bloc PEG ayant une bonne affinité pour la phase aqueuse tandis que le PS est soluble exclusivement en phase huile, le copolymère se place spontanément à l'interface. La non solubilité du bloc PS dans l'eau favorise l'extension maximale du bloc PEG en phase aqueuse afin de protéger au mieux le bloc hydrophobe. Cette extension engendre un fort encombrement stérique aux interfaces et empêche ainsi la coalescence des gouttes. De plus, contrairement aux émulsions doubles classiquement stabilisées par une combinaison de différents tensioactifs, le copolymère complètement soluble en phase huile ne va pas y former de micelles inverses qui pourraient solubiliser les émulsifiants, et donc conduire à la rupture des films d'huile, c'est-à-dire à la coalescence des gouttelettes internes avec la phase externe.

Par la suite, les auteurs ont étudié l'influence de la taille des différents blocs du copolymère et ont montré que ce paramètre était crucial pour le type d'émulsions formé<sup>160</sup>. Ainsi, un polymère muni d'un long bloc hydrophobe ne sera capable de stabiliser que des émulsions inverses, car il sera préférentiellement soluble en phase huile. Un polymère avec un ratio  $\frac{\text{nombre d'unités hydrophiles}}{\text{nombre d'unités hydrophobes}}$  d'environ 1 stabilise des émulsions multiples E/H/E pour des ratios d'huile entre 20 et 70% du fait de son étendue similaire dans les deux phases, tandis qu'il se forme des émulsions directes pour des ratios d'huile inférieurs à 20% et inverses pour des ratios supérieurs à 70%. Étonnamment, pour un copolymère avec un bloc hydrophobe très court, la séquence suivie en fonction de la quantité d'huile est E/H/E, H/E et enfin E/H. La formation d'émulsions inverses pour des fractions volumiques d'huile élevées est habituelle. En revanche, il est surprenant que des émulsions multiples soit formées pour des ratios d'eau de l'ordre de 90%. Ngai et son équipe expliquent ce phénomène par le fait que la quantité de polymère en phase aqueuse pour des ratios d'huile très faibles est elle aussi très faible, et en dessous de la CMC. Quand le ratio d'huile augmente, la concentration en polymère en phase aqueuse augmente également et la CMC est atteinte. Des micelles sont alors formées en phase aqueuse, ce qui conduirait à la formation d'émulsions directes.

Bae et al. en proposent l'utilisation d'un système eau / chloroforme / polystyrène-*b*-poly(N-isopropylacrylamide) (PS-*b*-PNIPAM)<sup>161</sup>. Ils constatent qu'une goutte de solvant dans laquelle est dissous le copolymère tend à se troubler lorsqu'elle est déposée dans l'eau. Cette turbidité est liée à l'apparition spontanée de petites gouttelettes d'eau au sein de la goutte de chloroforme. L'interprétation donnée par Bae et son équipe est la suivante : des ions issus de la synthèse du copolymère subsistent en phase huile. Ces impuretés ioniques génèrent une pression osmotique suffisamment forte pour contrebalancer la pression de Laplace et favoriser la formation de gouttelettes d'eau pour venir diluer ces impuretés. Forts de cette constatation, les auteurs ont utilisé ce phénomène

spontané pour former des émulsions multiples de façon maîtrisée. Ils observent que la quantité d'impuretés présente en phase huile a un rôle sur la taille des gouttelettes d'eau formées : plus il y a d'impuretés, plus les gouttelettes sont grosses. Ils démontrent également que l'encapsulation de dextrane (polymère de sucre) marqué par un fluorophore, préalablement dissous en phase huile, est possible.

Enfin, Besnard et Protat<sup>117,162,163</sup> ont travaillé sur des copolymères à base de styrène hydrophobe et de méthacrylate de diméthylaminoéthyle hydrophile, parvenant à stabiliser des émulsions E/H, H/E, E/H/E ou H/E/H selon le pH et la force ionique de la phase aqueuse. Une inversion de phase transitionnelle dynamique a pu être observée en variant le pH ou bien la température. Protat et al.<sup>128,163</sup> ont poursuivi le travail en adaptant ce système pour le rendre biocompatible, en utilisant des copolymères diblocs PDMS-*b*-PDMAEMA et des huiles utilisées en cosmétique ou pharmaceutique. L'encapsulation et le relargage d'un colorant hydrophile par variation de la température, du pH ou encore de la force ionique, ont pu être observés. Ces deux systèmes seront détaillés dans la partie III de ce chapitre.

**Émulsions multiples en une étape stabilisées par des polymères supramoléculaires** L'équipe de Wang a très récemment proposé une alternative à l'utilisation de copolymères amphiphiles, permettant une plus grande maîtrise et souplesse des types d'émulsions formées. L'idée est d'utiliser un homopolymère capable de créer des liaisons supramoléculaires, qui peuvent être de différents types (liaisons hydrogènes, électrostatiques, liaisons de coordination...) <sup>164</sup>, avec un autre polymère ou avec une petite molécule.

Ils présentent par exemple un système à base de blocs polyéthylèneimine (PEI) et poly(acide lactique) (PLA) <sup>165</sup>. Ces deux blocs sont sensibles au pH. Le PLA, quand son extrémité est chargée (pour des pH > 5), constitue un émulsifiant hydrophobe capable de stabiliser des émulsions inverses. Le PEI, quand il est neutre, à pH > 9, constitue quant à lui un émulsifiant hydrophile capable de stabiliser des émulsions directes. A bas pH, ce couple de polymère ne stabilise donc aucune émulsion, puis des émulsions inverses sont stabilisées par le PLA aux pH intermédiaires, et enfin à haut pH des émulsions doubles E/H/E sont stabilisées par le couple d'homopolymères. Ce système présente l'intérêt de suivre un enchaînement inhabituel dans le type d'émulsions formées en fonction du pH.

Huang et son équipe <sup>166</sup> utilisent quant à eux un dibloc polystyrène-poly(4-vinylpyrrolidone) (PS-P4VP), hydrophobe, couplé à une petite molécule sélénée. Seul, le polymère est incapable de stabiliser des émulsions car il n'a pas d'affinités pour l'eau. La liaison N-Se qui se crée entre la petite molécule et le bloc P4VP conduit à la formation d'azotes chargés positivement, ce qui a pour conséquence de rendre la structure amphiphile et permet la formation d'émulsions multiples E/H/E.

Enfin, Wang et al. <sup>167</sup> ont remarqué que l'utilisation du PEG seul comme stabilisant était à même de produire des émulsions entre l'eau et le dichlorométhane. Celui-ci est dissous à la fois en phase huile et en phase aqueuse, dans des concentrations assez élevées allant jusqu'à 198 mg/mL. La concentration du PEG en phase aqueuse semble être le paramètre dirigeant le type d'émulsions formées. Il est ainsi possible de stabiliser des émulsions doubles E/H/E pour des concentrations en PEG intermédiaires. Les auteurs rationalisent la formation de ces émulsions en supposant que le PEG forme des complexes avec la phase aqueuse par création de liaisons hydrogènes entre les

oxygènes du PEG et les hydrogènes de l'eau, ce qui lui permet d'interagir à la fois avec la phase huile et la phase aqueuse. Ils poursuivent le travail en étudiant l'influence de la présence de diiode en phase aqueuse : le PEG forme là encore des complexes avec I<sub>2</sub> par liaisons hydrogènes, mais cette fois la formation des deux types d'émulsions doubles, à phase eau et à phase huile continues, est observée.

L'avantage d'utiliser des stabilisants basés sur la création de liaisons faibles est que celles-ci peuvent être faciles à rompre pour réaliser un relargage contrôlé d'une espèce encapsulée. Cependant aucun des systèmes évoqués ici ne présente de résultats de libération contrôlée. La durée de stabilité de ces édifices supramoléculaires n'est de plus pas évoquée précisément dans ces articles, on peut donc supposer qu'elle n'est pas excellente.

**Encapsulation et relargage contrôlé de principes actifs au sein d'émulsions doubles formées en une étape** Dans les systèmes présentés dans cette partie, très peu sont sensibles à un *stimulus* externe permettant d'envisager une inversion de phase transitionnelle dynamique, et ainsi la possible libération d'un principe actif encapsulé en phase aqueuse interne. Les systèmes de Pickering développés par les équipes de Zhu<sup>152</sup> et Tu<sup>107</sup> sont à notre connaissance les seuls à présenter une sensibilité au pH permettant de passer d'une émulsion inverse à multiple par diminution du pH pour le système de Zhu, et d'une émulsion double à une émulsion directe par augmentation du pH pour le système de Tu. Le système de Chen<sup>154</sup> basé sur l'utilisation de CCS (*Core Crossed-linked Stars*) de PDMAEMA offre lui aussi une sensibilité au pH permettant le relargage. Le système supramoléculaire de Wang<sup>165</sup> permet également l'accès à différents types d'émulsions en fonction du pH, mais la stabilité des multiples obtenues dans ce cas est peu discutée. Enfin, pour les systèmes stabilisés par des polymères, les copolymères développés par Besnard et Protat sont les seuls à être stimulables et à stabiliser des émulsions doubles de façon durable.

Très peu de systèmes sont effectivement étudiés pour l'encapsulation d'un composé, bien que beaucoup mettent en avant leur potentiel pour ce type d'applications. Pour les émulsions de Pickering, Tu et al.<sup>107</sup> sont les seuls à étudier l'encapsulation d'un fluorophore, et sa libération contrôlée sous l'action d'un *stimulus* externe, ici le pH. Les particules à base de styrène et l'utilisation du toluène comme huile en font cependant un système inenvisageable pour développer des applications pour l'homme. Pour les stabilisants polymères, Bae et ses collaborateurs<sup>161</sup> mentionnent l'encapsulation d'un fluorophore au sein d'un système à base de chloroforme mais sans moyen de le libérer, de même que Hanson et al.<sup>157</sup> dont le système a l'avantage d'être biocompatible. Protat et al.<sup>128,163</sup> présentent un système multistimulable et biocompatible, permettant un relargage contrôlé, mais l'encapsulation de molécules actives est peu étudiée et n'a pas conduit à des résultats concluants. Hoppel et son équipe<sup>155</sup> sont les seuls à s'intéresser à l'encapsulation d'une molécule active, un anti-cancéreux. Cette molécule est relarguée par effet mécanique lors de l'application de l'émulsions sur la peau. Bien que ce système soit prometteur, il est limité à des applications restreintes. En outre, la formulation de l'émulsion est assez complexe (bien qu'en une seule étape) car elle nécessite l'utilisation de nombreux stabilisants.

**Conclusion** Bien que plusieurs systèmes prometteurs aient été développés au cours des quinze dernières années pour permettre la formation d'émulsions doubles de façon très simple, en une seule étape, leur utilisation pour l'encapsulation de composés reste encore très restreinte. Peu de systèmes sont à la fois stimulables, permettant d'envisager un relargage contrôlé de l'espèce encapsulée.

sulée, et biocompatibles, condition indispensable au développement de ces émulsions pour des applications à l'homme. Seul le système de Protat et son équipe<sup>128,163</sup> réunit ces deux conditions, mais l'encapsulation de composés d'intérêt n'a été que peu étudiée.

### III Présentation du sujet d'étude

Comme nous l'avons vu, les émulsions doubles sont d'excellentes candidates pour l'encapsulation de principes actifs. Une molécule hydrophile en solution dans les gouttelettes d'eau internes est en effet protégée de façon efficace de son environnement extérieur par la couche d'huile qui l'entoure. De plus, un des avantages des émulsions multiples est la possibilité d'encapsuler conjointement des molécules hydrophiles au sein des gouttelettes d'eau internes, et hydrophobes dans la phase huile. Cette codélivrance est particulièrement intéressante pour la libération simultanée de molécules ayant un effet synergique. C'est aussi une voie d'encapsulation qui offre de nombreuses possibilités de libération par un *stimulus* externe, comme nous l'avons vu en deuxième partie de cette introduction. Ainsi, des émulsions doubles peuvent être déstabilisées par action de la température, du pH, ou encore de la force ionique. Cependant, il existe encore peu de systèmes qui permettent de former de façon simple ce type de structure tout en offrant biocompatibilité et stimulabilité.

#### III.1 Développement d'un système modèle multi-stimulable par Lucie Besnard

Lucie Besnard a développé au sein des laboratoires LIONS (Laboratoire Interdisciplinaire d'Organisation Nanométrique et Supramoléculaire) du CEA et SIMM (Science et Ingénierie de la Matière Molle) de l'ESPCI Paris un système modèle particulièrement intéressant pour la formation d'émulsions multiples<sup>117,162,168</sup>. Le stabilisant utilisé est un copolymère dibloc amphiphile, présentant un bloc hydrophobe de polystyrène (PS) et un bloc hydrophile statistique alternant des unités hydrophobes de PS et hydrophiles de poly(méthacrylate de diméthylaminoéthyle) (PDMAEMA), noté PS-*b*-(PS-*stat*-PDMAEMA). Il permet de former en une seule étape différents types d'émulsions entre l'eau et le toluène, dont des multiples.

Le PDMAEMA est un polymère multi-stimulable sensible à trois paramètres physico-chimiques :

- le pH, *via* les groupements amines secondaires portés par la chaîne, qui sont chargés positivement à bas pH et neutres à haut pH, le  $pK_A$  se situant autour de 7,5<sup>169</sup> (cf FIGURE I.11(a));
- la force ionique, qui a une influence aux bas pH quand le polymère est sous forme chargée. La présence de sel conduit à l'écrantage des charges portées par la chaîne et à une diminution de l'hydrophilie;
- la température, ce polymère présentant une LCST (*Lower Critical Solution Temperature*) pour des pH au dessus de son  $pK_A$ , c'est-à-dire une température de transition au delà de laquelle il cesse d'être soluble en phase aqueuse. Celle-ci correspond à la température au delà de laquelle les liaisons hydrogènes formées entre le polymère et l'eau sont détruites, du fait de l'agitation thermique trop importante (cf FIGURE I.11(b)). Cette transition se produit entre 35 et 65°C pour l'homopolymère, la température exacte dépendant notamment de la masse molaire de la chaîne<sup>170,171</sup>.

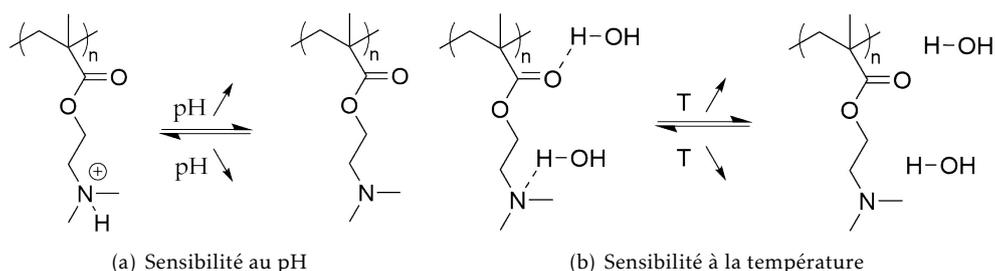


FIGURE I.11 – Stimulabilité du PDMAEMA.

Lucie Besnard et Marine Protat ont étudié l'influence du pH, de la concentration en sel et du type de sel en phase aqueuse sur le type d'émulsions formé. Elles ont montré que des émulsions directes, inverses mais surtout multiples E/H/E et H/E/H pouvaient être stabilisées par les copolymères PS-*b*-(PS-*stat*-PDMAEMA).

En plus d'influer sur le type d'émulsions formé, les trois *stimuli* évoqués plus haut peuvent conduire à une inversion de phase transitionnelle des émulsions. La transition de phase a notamment été observée pour le pH et la température.

Malgré les propriétés prometteuses de ce système, l'utilisation d'une huile et d'un polymère hydrophobe toxiques empêchent d'envisager toute application biologique.

### III.2 Vers un système biocompatible...

Un système alternatif a été proposé par Marine Protat, se basant sur l'utilisation d'un copolymère polydiméthylsiloxane-*b*-poly(méthacrylate de diméthylaminoéthyle) (PDMS-*b*-PDMAEMA)<sup>128,163</sup>. Ce copolymère présente un bloc hydrophile de PDMAEMA, qui lui permet de conserver ses propriétés de multi-stimulabilité. En revanche le PS a été remplacé par du PDMS, polymère biocompatible. Ce polymère est capable de stabiliser en une seule étape d'émulsification une phase aqueuse et une huile biocompatible pour obtenir, selon les conditions de pH et de force ionique choisies, des émulsions directes, multiples E/H/E ou inverses. Les émulsions multiples peuvent également être déstabilisées en jouant sur le pH, la force ionique ou la température. L'encapsulation et le relargage d'un colorant hydrophile sous l'action de chacun de ces *stimuli* ont pu être observés. En particulier, des émulsions E/H/E formées autour d'un pH neutre peuvent être déstabilisées en émulsions directes par une diminution du pH. Ce système est à notre connaissance le seul système biocompatible permettant de former en une seule étape et avec un seul émulsifiant des émulsions multiples E/H/E dont la nature peut être modifiée par des *stimuli* externes.

### III.3 ... et l'encapsulation de principes actifs

Le travail présenté ici repose sur la capacité des émulsions E/H/E formées à partir du copolymère PDMS-*b*-PDMAEMA à être déstabilisées en émulsions directes lorsque le pH est abaissé. Cette modification du type de l'émulsion conduit à la libération contrôlée d'un éventuel principe actif encapsulé au sein des gouttelettes d'eau internes.

Cette propriété est particulièrement intéressante pour l'élaboration d'un système administré par voie orale, pour des applications en pharmacie ou agroalimentaire. En effet, on peut imaginer encapsuler une substance active dans une émulsion E/H/E. Pendant toute la durée du stockage, la

molécule active est protégée de son environnement externe par la phase huile. Lors de l'ingestion, l'émulsion sera confrontée à une baisse du pH lors de son arrivée dans l'estomac, dont le pH est compris entre 1 et 2<sup>172</sup>. La molécule encapsulée sera alors libérée et pourra être absorbée au début de l'intestin. Ce système permet également d'envisager une coencapsulation de substances hydrophile et hydrophobe. Dans ce cas, la digestion de la phase huile dans l'intestin conduit à la libération de la molécule hydrophobe.

Les objectifs de ce travail sont doubles.

**Encapsulation de principes actifs** Le premier objectif est l'étude de l'encapsulation et du re-largage d'un principe actif hydrophile, ainsi que sa coencapsulation avec une molécule active hydrophobe. Marine Protat avait entamé ce travail avec l'encapsulation de vitamine C au sein de la phase aqueuse interne des émulsions<sup>163</sup>. Cependant, cette molécule capable de libérer des protons ( $pK_A=4,2$ <sup>173</sup>) perturbe le pH habituel de formation des émulsions, rendant celles-ci instables. Pour ce travail, nous souhaitons donc travailler avec une molécule ne risquant pas d'avoir une incidence sur le pH de la phase aqueuse. Cette substance doit avoir un effet thérapeutique intéressant, présenter un intérêt à être encapsulée et ne pas avoir d'effet tensioactif susceptible de modifier la conformation du polymère à l'interface. Elle doit également être facile à détecter pour simplifier les différentes études à effectuer. Dans l'idéal, elle doit avoir un intérêt à être coencapsulée avec une autre molécule hydrophobe présentant des caractéristiques similaires.

Notre choix s'est porté pour cette étude sur la catéchine, qui présente un intérêt à être coencapsulée avec la molécule hydrophobe de curcumine. Ces deux molécules répondent aux critères physico-chimiques listés plus hauts. Elles sont toutes deux facilement détectables en spectroscopie UV-visible : épaulement à 230 nm et maximum local d'absorption à 280 nm dans le cas de la catéchine, et maximum d'absorption à 418 nm dans le cas de la curcumine. Les droites d'étalonnage associées sont présentée en Annexes B.1.a pour la catéchine et B.2 pour la curcumine. La catéchine peut également être détectée par fluorescence en excitant la molécule à 280 nm et en relevant l'intensité de fluorescence à 314 nm. Malheureusement cette méthode n'est utilisable que pour des solutions de catéchine fraîche (<24 h), le vieillissement des solutions et la dégradation de la catéchine conduisant à une diminution de l'intensité du pic. Bien que les mécanismes d'action ne soient pas parfaitement compris, la catéchine et la curcumine présentent l'une comme l'autre de nombreuses propriétés thérapeutiques (anticancéreuses, anti-microbiennes, anti-oxydantes ou encore anti-inflammatoires)<sup>174-176</sup>. Elles sont également très sensibles à l'oxydation. Des études ont montré des effets synergiques de ces molécules contre les maladies infectieuses<sup>177</sup> ou le cancer<sup>178</sup>. Les propriétés anti-inflammatoires de la catéchine et de la curcumine pourraient en faire un traitement efficace contre la maladie de Crohn, pathologie incurable auto-immune d'inflammation de l'intestin. Les traitements utilisés jusqu'alors sont peu efficaces ou au contraire contraignants et engendrent une accoutumance ou des effets secondaires.

La coencapsulation de ces deux molécules au sein d'une émulsion double a déjà été étudiée par l'équipe d'Aditya<sup>179,180</sup>. Leurs émulsions E/H/E, formées en deux étapes, permettent la libération conjointe des deux molécules au niveau de l'intestin sous l'action du liquide gastrique par un mécanisme qui n'est pas détaillé. Ces émulsions ne sont stables que durant deux semaines, et de nombreux excipients sont nécessaires pour conserver les molécules encapsulées à l'intérieur de la structure. De plus, les émulsions sont formées à 60°C, température à laquelle la catéchine risque

d'être au moins en partie dégradée<sup>181</sup>. Développer un système permettant l'encapsulation efficace de ces deux molécules, sur de longues périodes, et par un procédé simple en une étape, constitue donc un défi intéressant à relever.

L'encapsulation de la molécule de catéchine seule sera étudiée dans un premier temps, puis nous nous intéresserons à la coencapsulation.

**Formation des émulsions par voie microfluidique** Le deuxième objectif de ce travail est la formation d'émulsions stabilisées par des copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA par voie microfluidique. Bien que beaucoup plus complexe à mettre en place que l'émulsification mécanique en une étape permise par notre système, cette technique présente malgré tout des avantages non négligeables :

- la maîtrise de la taille des gouttes ;
- la monodispersité, conduisant à une meilleure stabilité des édifices, propriété également recherchée par les industriels qui préfèrent travailler avec des systèmes bien calibrés ;
- la possibilité d'avoir des phases aqueuses internes et externes de compositions différentes, et ainsi d'encapsuler de façon sélective la substance active dans les gouttelettes d'eau internes ;
- la possibilité de connaître précisément le taux d'encapsulation de l'émulsion.

La suite de ce manuscrit est divisée en quatre grandes parties. La synthèse et la caractérisation d'une famille de copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA sera présentée au **Chapitre II**, ainsi que des mesures de cytotoxicité réalisées sur notre système. Le **Chapitre III** consistera en l'étude des émulsions stabilisées par les différents copolymères synthétisés, en fonction du pH et de la force ionique de la phase aqueuse. L'encapsulation et le relargage d'une molécule modèle, le saccharose, sera également présentée. Dans le **Chapitre IV**, nous nous intéresserons à l'encapsulation et au relargage de la catéchine, et à des résultats préliminaires de coencapsulation avec la curcumine. Enfin, le **Chapitre V** présentera les résultats obtenus pour la formation d'émulsions stabilisées par des copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA par voie microfluidique.

## Bibliographie

- [1] Augustin, M. A. ; Hemar, Y. Nano- and Micro-Structured Assemblies for Encapsulation of Food Ingredients. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 902–912.
- [2] Dubey, R. ; Shami, T. C. ; Rao, K. B. Microencapsulation Technology and Applications. *Defense Science Journal* **2009**, *59*, 82–95.
- [3] Vauthier, C. ; Bouchemal, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* **2009**, *26*, 1025–1058.
- [4] Cuomo, F. ; Cofelice, M. ; Venditti, F. ; Ceglie, A. ; Miguel, M. ; Lindman, B. ; Lopez, F. In-Vitro Digestion of Curcumin Loaded Chitosan-Coated Liposomes. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **2018**, *168*, 29–34.
- [5] Souguir, H. ; Salaün, F. ; Douillet, P. ; Vroman, I. ; Chatterjee, S. Nanoencapsulation of Curcumin in Polyurethane and Polyurea Shells by an Emulsion Diffusion Method. *Chemical Engineering Journal* **2013**, *221*, 133–145.
- [6] Green, B. K. Oil-Containing Microscopic Capsules and Method of Making Them - Brevet N°US2800458A. 1957; Brevet n°US2800458A.
- [7] Gibbs, B. ; Mulligan, C. ; Kermasha, S. ; Alli, I. Encapsulation in the Food Industry : A Review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **1999**, *50*, 213–224.
- [8] Kumari, A. ; Yadav, S. K. ; Yadav, S. C. Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **2010**, *75*, 1–18.
- [9] Couvreur, P. ; Barratt, G. ; Fattal, E. ; Vauthier, C. Nanocapsule Technology : A Review. *Critical Reviews & Trade ; in Therapeutic Drug Carrier Systems* **2002**, *19*, 99–134.
- [10] Eloy, J. O. ; Claro de Souza, M. ; Petrilli, R. ; Barcellos, J. P. A. ; Lee, R. J. ; Marchetti, J. M. Liposomes as Carriers of Hydrophilic Small Molecule Drugs : Strategies to Enhance Encapsulation and Delivery. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **2014**, *123*, 345–363.
- [11] Ye, C. ; Chi, H. A Review of Recent Progress in Drug and Protein Encapsulation : Approaches, Applications and Challenges. *Materials Science and Engineering : C* **2018**, *83*, 233–246.
- [12] Pollack, I. P. ; Quigley, H. A. ; Harbin, T. S. The Ocusert Pilocarpine System : Advantages and Disadvantages. *Southern Medical Journal* **1976**, *69*, 1296–1298.
- [13] Madene, A. ; Jacquot, M. ; Scher, J. ; Desobry, S. Flavour Encapsulation and Controlled Release – a Review. *International Journal of Food Science & Technology* **2005**, *41*, 1–21.
- [14] Ammala, A. Biodegradable Polymers as Encapsulation Materials for Cosmetics and Personal Care Markets. *International Journal of Cosmetic Science* **2012**, *35*, 113–124.
- [15] Hougeir, F. G. ; Kircik, L. A Review of Delivery Systems in Cosmetics. *Dermatologic Therapy* **2012**, *25*, 234–237.
- [16] Ley, S. V. ; Ramarao, C. ; Gordon, R. S. ; Holmes, A. B. ; Morrison, A. J. ; McConvey, I. F. ; Shirley, I. M. ; Smith, S. C. ; Smith, M. D. Polyurea-Encapsulated Palladium(II) Acetate : A Robust and Recyclable Catalyst for Use in Conventional and Supercritical Media. *Chemical Communications* **2002**, *0*, 1134–1135.
- [17] Ley, S. V. ; Ramarao, C. ; Lee, A.-L. ; Østergaard, N. ; Smith, S. C. ; Shirley, I. M. Microencapsulation of Osmium Tetroxide in Polyurea. *Organic Letters* **2003**, *5*, 185–187.
- [18] Scher, H. B. ; Rodson, M. ; Lee, K.-S. Microencapsulation of Pesticides by Interfacial Polymerization Utilizing Isocyanate or Aminoplast Chemistry. *Pesticide Science* **1980**, *54*, 394–400.
- [19] Sopena, F. ; Maqueda, C. ; Morillo, E. Controlled Release Formulations of Herbicides Based on Micro-Encapsulation. *Ciencia e investigación agraria* **2009**, *36*, 27–42.
- [20] Brown, E. N. ; White, S. R. ; Sottos, N. R. Microcapsule Induced Toughening in a Self-Healing Polymer Composite. *Journal of Materials Science* **2004**, *39*, 1703–1710.

- [21] Toohey, K. S.; Sottos, N. R.; Lewis, J. A.; Moore, J. S.; White, S. R. Self-Healing Materials with Microvascular Networks. *Nature Materials* **2007**, *6*, 581–585.
- [22] Given, P. S. Encapsulation of Flavors in Emulsions for Beverages. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2009**, *14*, 43–47.
- [23] Kakran, M.; Antipina, M. N. Emulsion-Based Techniques for Encapsulation in Biomedicine, Food and Personal Care. *Current Opinion in Pharmacology* **2014**, *18*, 47–55.
- [24] Chong, D.; Liu, X.; Ma, H.; Huang, G.; Han, Y. L.; Cui, X.; Yan, J.; Xu, F. Advances in Fabricating Double-Emulsion Droplets and Their Biomedical Applications. *Microfluidics and Nanofluidics* **2015**, *19*, 1071–1090.
- [25] Jiménez-Colmenero, F. Potential Applications of Multiple Emulsions in the Development of Healthy and Functional Foods. *Food Research International* **2013**, *52*, 64–74.
- [26] Berg, J.; Sundberg, D.; Kronberg, B. Microencapsulation of Emulsified Oil Droplets by In-Situ Vinyl Polymerization. *Journal of Microencapsulation* **1989**, *6*, 327–337.
- [27] Tiarks, F.; Landfester, K.; Antonietti, M. Preparation of Polymeric Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization. *Langmuir* **2001**, *17*, 908–918.
- [28] Fu, S.; Xu, C.; Du, C.; Tian, A.; Zhang, M. Encapsulation of C.I. Pigment Blue 15 :3 Using a Polymerizable Dispersant via Emulsion Polymerization. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, *384*, 68–74.
- [29] Viala, P.; Bourgeat-Lamy, E.; Guyot, A.; Legrand, P.; Lefebvre, D. Pigment Encapsulation by Emulsion Polymerisation, Redispersible in Water. *Macromolecular Symposia* **2002**, *187*, 651–662.
- [30] Nguyen, D.; Zondanos, H. S.; Farrugia, J. M.; Serelis, A. K.; Such, C. H.; Hawzett, B. S. Pigment Encapsulation by Emulsion Polymerization Using Macro-RAFT Copolymers. *Langmuir* **2008**, *24*, 2140–2150.
- [31] Rajot, I.; Bône, S.; Graillat, C.; Hamaide, T. Nonionic Nanoparticles by Miniemulsion Polymerization of Vinyl Acetate with Oligocaprolactone Macromonomer or Miglyol as Hydrophobe. Application to the Encapsulation of Indomethacin. *Macromolecules* **2003**, *36*, 7484–7490.
- [32] Jacquemond, M.; Jeckelmann, N.; Ouali, L.; Haefliger, O. P. Perfume-Containing Polyurea Microcapsules with Undetectable Levels of Free Isocyanates. *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, *114*, 3074–3080.
- [33] Pensé, A. M.; Vauthier, C.; Puisieux, F.; Benoit, J. P. Microencapsulation of Benzalkonium Chloride. *International Journal of Pharmaceutics* **1992**, *81*, 111–117.
- [34] Bouchemal, K.; Briançon, S.; Chaumont, P.; Fessi, H.; Zydowicz, N. Microencapsulation of Dehydroepiandrosterone (DHEA) with Poly(Ortho Ester) Polymers by Interfacial Polycondensation. *Journal of Microencapsulation* **2003**, *20*, 637–651.
- [35] Hanno, I.; Anselmi, C.; Bouchemal, K. Polyamide Nanocapsules and Nano-Emulsions Containing Parsol® MCX and Parsol® 1789 : In Vitro Release, Ex Vivo Skin Penetration and Photo-Stability Studies. *Pharmaceutical Research* **2012**, *29*, 559–573.
- [36] Galindo-Rodriguez, S.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharmaceutical Research* **2004**, *21*, 1428–1439.
- [37] Freitas, S.; Merkle, H. P.; Gander, B. Microencapsulation by Solvent Extraction/Evaporation : Reviewing the State of the Art of Microsphere Preparation Process Technology. *Journal of Controlled Release* **2005**, *102*, 313–332.
- [38] Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Doelker, E.; Fessi, H. Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a New Process Based on Emulsification-Diffusion Technique. *Pharmaceutical Research* **1998**, *15*, 1056–1062.

- [39] Allémann, E.; Gurny, R.; Doelker, E. Preparation of Aqueous Polymeric Nanodispersions by a Reversible Salting-out Process : Influence of Process Parameters on Particle Size. *International Journal of Pharmaceutics* **1992**, *87*, 247–253.
- [40] Zambaux, M. F.; Bonneaux, F.; Gref, R.; Maincent, P.; Dellacherie, E.; Alonso, M. J.; Labrude, P.; Vigneron, C. Influence of Experimental Parameters on the Characteristics of Poly(Lactic Acid) Nanoparticles Prepared by a Double Emulsion Method. *Journal of Controlled Release* **1998**, *50*, 31–40.
- [41] Yoo, H. S.; Oh, J. E.; Lee, K. H.; Park, T. G. Biodegradable Nanoparticles Containing Doxorubicin-PLGA Conjugate for Sustained Release. *Pharmaceutical Research* **1999**, *16*, 1114–1118.
- [42] Li, X.; Chang, S.; Du, G.; Li, Y.; Gong, J.; Yang, M.; Wei, Z. Encapsulation of Azithromycin into Polymeric Microspheres by Reduced Pressure-Solvent Evaporation Method. *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, *433*, 79–88.
- [43] Perez, C.; Sanchez, A.; Putnam, D.; Ting, D.; Langer, R.; Alonso, M. J. Poly(Lactic Acid)-Poly(Ethylene Glycol) Nanoparticles as New Carriers for the Delivery of Plasmid DNA. *Journal of Controlled Release* **2001**, *75*, 211–224.
- [44] Ciombor, D. M.; Jaklenec, A.; Liu, A. Z.; Thanos, C.; Rahman, N.; Weston, P.; Aaron, R.; Mathiowitz, E. Encapsulation of BSA Using a Modified W/O/O Emulsion Solvent Removal Method. *Journal of Microencapsulation* **2006**, *23*, 183–194.
- [45] Arshady, R. Microspheres and Microcapsules : A Survey of Manufacturing Techniques. Part 1 : Suspension Cross-Linking. *Polymer Engineering & Science* **1989**, *29*, 1746–1758.
- [46] Wang, N.; Wu, X. S. Preparation and Characterization of Agarose Hydrogel Nanoparticles for Protein and Peptide Drug Delivery. *Pharmaceutical Development and Technology* **1997**, *2*, 135–142.
- [47] Arshady, R. Microspheres and Microcapsules, a Survey of Manufacturing Techniques Part II : Coacervation. *Polymer Engineering & Science* **1990**, *30*, 905–914.
- [48] Burgess, D. J.; Carless, J. E. Manufacture of Gelatin/Gelatin Coacervate Microcapsules. *International Journal of Pharmaceutics* **1985**, *27*, 61–70.
- [49] Maldonado, L.; Sadeghi, R.; Kokini, J. Nanoparticulation of Bovine Serum Albumin and Poly-d-Lysine through Complex Coacervation and Encapsulation of Curcumin. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **2017**, *159*, 759–769.
- [50] Leclercq, S.; Harlander, K. R.; Reineccius, G. A. Formation and Characterization of Microcapsules by Complex Coacervation with Liquid or Solid Aroma Cores. *Flavour and Fragrance Journal* **2009**, *24*, 17–24.
- [51] Rojas-Moreno, S.; Osorio-Revilla, G.; Gallardo-Velázquez, T.; Cárdenas-Bailón, F.; Meza-Márquez, G. Effect of the Cross-Linking Agent and Drying Method on Encapsulation Efficiency of Orange Essential Oil by Complex Coacervation Using Whey Protein Isolate with Different Polysaccharides. *Journal of Microencapsulation* **2018**, *35*, 165–180.
- [52] Holowka, E. P.; Bhatia, S. K. *Drug Delivery*; Springer, New York, NY, 2014; pp 7–62.
- [53] Gaudriault, G. Biodegradable Drug Delivery Compositions - Brevet N°WO2012090070A2. 2012; Brevet n°WO2012090070A2.
- [54] Langer, R. New Methods of Drug Delivery. *Science* **1990**, *249*, 1527–1533.
- [55] Esser-Kahn, A. P.; Odom, S. A.; Sottos, N. R.; White, S. R.; Moore, J. S. Triggered Release from Polymer Capsules. *Macromolecules* **2011**, *44*, 5539–5553.
- [56] Hu, J.; Chen, H.-Q.; Zhang, Z. Mechanical Properties of Melamine Formaldehyde Microcapsules for Self-Healing Materials. *Materials Chemistry and Physics* **2009**, *118*, 63–70.
- [57] Broaders, K. E.; Pastine, S. J.; Grandhe, S.; Fréchet, J. M. J. Acid-Degradable Solid-Walled Microcapsules for pH-Responsive Burst-Release Drug Delivery. *Chemical Communications* **2010**, *47*, 665–667.
- [58] Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J. pH-Responsive Copolymer Assemblies for Controlled Release of Doxorubicin. *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16*, 361–368.

- [59] Khaja, S. D.; Lee, S.; Murthy, N. Acid-Degradable Protein Delivery Vehicles Based on Metathesis Chemistry. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1391–1395.
- [60] Pastine, S. J.; Okawa, D.; Zettl, A.; Fréchet, J. M. J. Chemicals On Demand with Phototriggerable Microcapsules. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 13586–13587.
- [61] Greene, L.; Phan, L. X.; Schmitt, E. E.; Mohr, J. M. *Polymeric Delivery Systems*; ACS Symposium Series 520; American Chemical Society, 1993; Vol. 520; pp 244–256.
- [62] Bédard, M. F.; De Geest, B. G.; Skirtach, A. G.; Möhwald, H.; Sukhorukov, G. B. Polymeric Microcapsules with Light Responsive Properties for Encapsulation and Release. *Advances in Colloid and Interface Science* **2010**, *158*, 2–14.
- [63] Lu, Z.; Prouty, M. D.; Guo, Z.; Golub, V. O.; Kumar, C. S. S. R.; Lvov, Y. M. Magnetic Switch of Permeability for Polyelectrolyte Microcapsules Embedded with Co@Au Nanoparticles. *Langmuir* **2005**, *21*, 2042–2050.
- [64] Hu, S.-H.; Tsai, C.-H.; Liao, C.-F.; Liu, D.-M.; Chen, S.-Y. Controlled Rupture of Magnetic Polyelectrolyte Microcapsules for Drug Delivery. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2008**, *24*, 11811–11818.
- [65] Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug Delivery. *Nature Materials* **2013**, *12*, 991–1003.
- [66] Kong, G.; Anyarambhatla, G.; Petros, W. P.; Braun, R. D.; Colvin, O. M.; Needham, D.; Dewhirst, M. W. Efficacy of Liposomes and Hyperthermia in a Human Tumor Xenograft Model : Importance of Triggered Drug Release. *Cancer Research* **2000**, *60*, 6950–6957.
- [67] Grüll, H.; Langereis, S. Hyperthermia-Triggered Drug Delivery from Temperature-Sensitive Liposomes Using MRI-Guided High Intensity Focused Ultrasound. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161*, 317–327.
- [68] Oliveira, H.; Pérez-Andrés, E.; Thevenot, J.; Sandre, O.; Berra, E.; Lecommandoux, S. Magnetic Field Triggered Drug Release from Polymersomes for Cancer Therapeutics. *Journal of Controlled Release* **2013**, *169*, 165–170.
- [69] Chaves, M. A.; Oseliero Filho, P. L.; Jange, C. G.; Sinigaglia-Coimbra, R.; Oliveira, C. L. P.; Pinho, S. C. Structural Characterization of Multilamellar Liposomes Coencapsulating Curcumin and Vitamin D3. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **2018**, *549*, 112–121.
- [70] Jiménez-Colmenero, F. Potential Applications of Multiple Emulsions in the Development of Healthy and Functional Foods. *Food Research International* **2013**, *52*, 64–74.
- [71] Jiménez-Alvarado, R.; Beristain, C. I.; Medina-Torres, L.; Román-Guerrero, A.; Vernon-Carter, E. J. Ferrous Bisglycinate Content and Release in W1/O/W2 Multiple Emulsions Stabilized by Protein–polysaccharide Complexes. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 2425–2433.
- [72] Márquez, A. L.; Wagner, J. R. Rheology of Double (w/O/W) Emulsions Prepared with Soybean Milk and Fortified with Calcium. *Journal of Texture Studies* **2010**, *41*, 651–671.
- [73] Lutz, R.; Aserin, A.; Wicker, L.; Garti, N. Release of Electrolytes from W/O/W Double Emulsions Stabilized by a Soluble Complex of Modified Pectin and Whey Protein Isolate. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **2009**, *74*, 178–185.
- [74] Yoshida, K.; Sekine, T.; Matsuzaki, F.; Yanaki, T.; Yamaguchi, M. Stability of Vitamin A in Oil-in-Water-in-Oil-Type Multiple Emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1999**, *76*, 1–6.
- [75] Fechner, A.; Knoth, A.; Scherze, I.; Muschiolik, G. Stability and Release Properties of Double-Emulsions Stabilised by Caseinate–dextran Conjugates. *Food Hydrocolloids* **2007**, *21*, 943–952.
- [76] Benichou, A.; Aserin, A.; Garti, N. W/O/W Double Emulsions Stabilized with WPI–polysaccharide Complexes. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **2007**, *294*, 20–32.
- [77] Bou, R.; Cofrades, S.; Jiménez-Colmenero, F. Physicochemical Properties and Riboflavin Encapsulation in Double Emulsions with Different Lipid Sources. *LWT - Food Science and Technology* **2014**, *59*, 621–628.

- [78] Frank, K.; Walz, E.; Gräf, V.; Greiner, R.; Köhler, K.; Schuchmann, H. P. Stability of Anthocyanin-Rich W/O/W-Emulsions Designed for Intestinal Release in Gastrointestinal Environment. *Journal of Food Science* **2012**, *77*, N50–N57.
- [79] de Almeida Paula, D.; Mota Ramos, A.; Basílio de Oliveira, E.; Maurício Furtado Martins, E.; Augusto Ribeiro de Barros, F.; Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal, M.; de Almeida Costa, N.; Tatagiba da Rocha, C. Increased Thermal Stability of Anthocyanins at pH 4.0 by Guar Gum in Aqueous Dispersions and in Double Emulsions W/O/W. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *117*, 665–672.
- [80] Akhtar, M.; Murray, B. S.; Afeisume, E. I.; Khew, S. H. Encapsulation of Flavonoid in Multiple Emulsion Using Spinning Disc Reactor Technology. *Food Hydrocolloids* **2014**, *34*, 62–67.
- [81] Casagrande, R.; Georgetti, S. R.; Verri, W. A.; Borin, M. F.; Lopez, R. F. V.; Fonseca, M. J. V. In Vitro Evaluation of Quercetin Cutaneous Absorption from Topical Formulations and Its Functional Stability by Antioxidant Activity. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *328*, 183–190.
- [82] Shima, M.; Matsuo, T.; Yamashita, M.; Adachi, S. Protection of Lactobacillus Acidophilus from Bile Salts in a Model Intestinal Juice by Incorporation into the Inner-Water Phase of a W/O/W Emulsion. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 281–285.
- [83] Pimentel-González, D. J.; Campos-Montiel, R. G.; Lobato-Calleros, C.; Pedroza-Islas, R.; Vernon-Carter, E. J. Encapsulation of Lactobacillus Rhamnosus in Double Emulsions Formulated with Sweet Whey as Emulsifier and Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Food Research International* **2009**, *42*, 292–297.
- [84] Kaimainen, M.; Marze, S.; Järvenpää, E.; Anton, M.; Huopalahti, R. Encapsulation of Betalain into w/o/w Double Emulsion and Release during in Vitro Intestinal Lipid Digestion. *LWT - Food Science and Technology* **2015**, *60*, 899–904.
- [85] Gonçalves, M. L.; Marcussi, D. G.; Calixto, G. M. F.; Corrêa, M. A.; Chorilli, M. Structural Characterization and In Vitro Antioxidant Activity of Kojic Dipalmitate Loaded W/O/W Multiple Emulsions Intended for Skin Disorders. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/304591/>, 2015.
- [86] Elliott, T. J. More Durable Make-up Based on Pigmented Water-in-Solvent Emulsions. *International Journal of Cosmetic Science* **1979**, *1*, 17–25.
- [87] Djuris, J.; Vasiljevic, D.; Jokic, S.; Ibric, S. Application of D-optimal experimental design method to optimize the formulation of O/W cosmetic emulsions. *International Journal of Cosmetic Science* **2013**, *36*, 79–87.
- [88] Moussour, M.; Lavarde, M.; Pensé-Lhéritier, A.-M.; Bouton, F. Sensory Analysis of Cosmetic Powders : Personal Care Ingredients and Emulsions. *International Journal of Cosmetic Science* **2016**, *39*, 83–89.
- [89] Muschiolik, G. Multiple Emulsions for Food Use. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2007**, *12*, 213–220.
- [90] Chung, C.; McClements, D. J. Structure–function Relationships in Food Emulsions : Improving Food Quality and Sensory Perception. *Food Structure* **2014**, *1*, 106–126.
- [91] Ozturk, B.; McClements, D. J. Progress in Natural Emulsifiers for Utilization in Food Emulsions. *Current Opinion in Food Science* **2016**, *7*, 1–6.
- [92] Rossi, J.; Leroux, J.-C. *Role of Lipid Excipients in Modifying Oral and Parenteral Drug Delivery*; Wiley-Blackwell, 2006; pp 88–123.
- [93] Tamilvanan, S. *Pharmaceutical Manufacturing Handbook*; Wiley-Blackwell, 2007; pp 1327–1366.
- [94] Mitchell, J.; Ninham, B. Micelles, Vesicles and Microemulsions. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2 : Molecular and Chemical Physics* **1981**, *77*, 601–629.
- [95] Solans, C.; Kunieda, H. *Industrial Applications of Microemulsions*; CRC Press, 1996.
- [96] Rosen, M. J.; Kunjappu, D. J. T. *Surfactants and Interfacial Phenomena*; John Wiley & Sons, 2012.

- [97] Lémery, E.; Briançon, S.; Chevalier, Y.; Bordes, C.; Oddos, T.; Gohier, A.; Bolzinger, M.-A. Skin Toxicity of Surfactants : Structure/Toxicity Relationships. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **2015**, *469*, 166–179.
- [98] Garti, N.; Aserin, A. Double Emulsions Stabilized by Macromolecular Surfactants. *Advances in Colloid and Interface Science* **1996**, *65*, 37–69.
- [99] Rubinstein, M.; Colby, R. H. *Polymer Physics*; Oxford University Press : Oxford, New York, 2003.
- [100] Perrin, P.; Lafuma, F. Low Hydrophobically Modified Poly(Acrylic Acid) Stabilizing Macroemulsions : Relationship between Copolymer Structure and Emulsions Properties. *Journal of Colloid and Interface Science* **1998**, *197*, 317–326.
- [101] Perrin, P.; Devaux, N.; Sergot, P.; Lequeux, F. Shear-Induced Formation of Ordered Monodisperse Emulsions Stabilized by an Associating Amphiphilic Polyelectrolyte. *Langmuir* **2001**, *17*, 2656–2663.
- [102] Protat, M.; Bodin-Thomazo, N.; Malloggi, F.; Daillant, J.; Campbell, R. A.; Fragneto, G.; Watkins, E. B.; Perrin, P.; Pantoustier, N.; Guenoun, P. Neutron Reflectivity Measurements at the Oil/Water Interface for the Study of Stimuli-Responsive Emulsions\*. *The European Physical Journal E* **2018**, *41*, 85.
- [103] ter Beek, L. C.; Ketelaars, M.; McCain, D. C.; Smulders, P. E.; Walstra, P.; Hemminga, M. A. Nuclear Magnetic Resonance Study of the Conformation and Dynamics of Beta-Casein at the Oil/Water Interface in Emulsions. *Biophysical Journal* **1996**, *70*, 2396–2402.
- [104] Tcholakova, S.; Denkov, N. D.; Ivanov, I. B.; Campbell, B. Coalescence Stability of Emulsions Containing Globular Milk Proteins. *Advances in Colloid and Interface Science* **2006**, *123-126*, 259–293.
- [105] Kim, H.-J.; Decker, E. A.; McClements, D. J. Influence of Free Protein on Flocculation Stability of  $\beta$ -Lactoglobulin Stabilized Oil-in-Water Emulsions at Neutral pH and Ambient Temperature. *Langmuir* **2004**, *20*, 10394–10398.
- [106] Chevalier, Y.; Bolzinger, M.-A. Emulsions Stabilized with Solid Nanoparticles : Pickering Emulsions. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **2013**, *439*, 23–34.
- [107] Tu, F.; Lee, D. One-Step Encapsulation and Triggered Release Based on Janus Particle-Stabilized Multiple Emulsions. *Chemical Communications* **2014**, *50*, 15549–15552.
- [108] Binks, B. P.; Whitby, C. P. Silica Particle-Stabilized Emulsions of Silicone Oil and Water : Aspects of Emulsification. *Langmuir* **2004**, *20*, 1130–1137.
- [109] Destribats, M.; Rouvet, M.; Gehin-Delval, C.; Schmitt, C.; P. Binks, B. Emulsions Stabilised by Whey Protein Microgel Particles : Towards Food-Grade Pickering Emulsions. *Soft Matter* **2014**, *10*, 6941–6954.
- [110] Tadros, T. F. *Emulsion Formation and Stability*; Wiley-Blackwell, 2013; pp 1–75.
- [111] Leal-Calderon, F.; Bibette, J.; Schmitt, V. *Emulsion Science : Basic Principles*; Emulsion Science : Basic Principles; 2007.
- [112] Bancroft, W. D. The Theory of Emulsification, V. *The Journal of Physical Chemistry* **1912**, *17*, 501–519.
- [113] Binks, B. P. Emulsion Type below and above the CMC in AOT Microemulsion Systems. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **1993**, *71*, 167–172.
- [114] Finkle, P.; Draper, H. D.; Hildebrand, J. H. The Theory of Emulsification. *Journal of the American Chemical Society* **1923**, *45*, 2780–2788.
- [115] Golemanov, K.; Tcholakova, S.; Kralchevsky, P. A.; Ananthapadmanabhan, K. P.; Lips, A. Latex-Particle-Stabilized Emulsions of Anti-Bancroft Type. *Langmuir* **2006**, *22*, 4968–4977.
- [116] Destribats, M.; Lapeyre, V.; Sellier, E.; Leal-Calderon, F.; Schmitt, V.; Ravaine, V. Water-in-Oil Emulsions Stabilized by Water-Dispersible Poly(N-Isopropylacrylamide) Microgels : Understanding Anti-Finkle Behavior. *Langmuir* **2011**, *27*, 14096–14107.
- [117] Besnard, L.; Protat, M.; Malloggi, F.; Daillant, J.; Cousin, F.; Pantoustier, N.; Guenoun, P.; Perrin, P. Breaking of the Bancroft Rule for Multiple Emulsions Stabilized by a Single Stimulable Polymer. *Soft Matter* **2014**, *10*, 7073–7087.

- [118] Griffin, W. C. Classification of Surface-Active Agents by "HLB". *Journal of Cosmetic Science* **1949**, *1*, 327–335.
- [119] Griffin, W. C. Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants. *Journal of Cosmetic Science* **1954**, *5*, 249–256.
- [120] Davies, J. T. A Quantitative Kinetic Theory of Emulsion Type, I. Physical Chemistry of the Emulsifying Agent. Proc. 2nd Int. Congr. Surface Activity. 1957; pp 426–438.
- [121] Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* **1976**, *72*, 1525–1568.
- [122] Harkins, W. D.; Davies, E. C. H.; Clark, G. L. The Orientation of Molecules in the Surface of Liquids, the Energy Relations at Surfaces, Solubility, Adsorption, Emulsification, Molecular Association and the Effect of Acid and Bases on Interfacial Tension 1 (Surface Energy VI). *Journal of the American Chemical Society* **1917**, *39*, 541–596.
- [123] Langmuir, I. The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids II. Liquids 1. *Journal of the American Chemical Society* **1917**, *39*, 1848–1906.
- [124] Kabalnov, A.; Wennerström, H. Macroemulsion Stability : The Oriented Wedge Theory Revisited. *Langmuir* **1996**, *12*, 276–292.
- [125] Salager, J. L.; Miñana-Pérez, M.; Pérez-Sánchez, M.; Ramfrez-Gouveia, M.; Rojas, C. I. Surfactant-Oil-Water Systems near the Affinity Inversion - Part III : The Two Kinds of Emulsion Inversion. *Journal of Dispersion Science and Technology* **1983**, *4*, 313–329.
- [126] Salager, J.-L.; Márquez, L.; Peña, A. A.; Rondón, M.; Silva, F.; Tyrode, E. Current Phenomenological Know-How and Modeling of Emulsion Inversion. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2000**, *39*, 2665–2676.
- [127] Binks, B. P.; Murakami, R.; Armes, S. P.; Fujii, S. Temperature-Induced Inversion of Nanoparticle-Stabilized Emulsions. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 4795–4798.
- [128] Protat, M.; Bodin, N.; Gobeaux, F.; Malloggi, F.; Daillant, J.; Pantoustier, N.; Guenoun, P.; Perrin, P. Biocompatible Stimuli-Responsive W/O/W Multiple Emulsions Prepared by One-Step Mixing with a Single Diblock Copolymer Emulsifier. *Langmuir* **2016**, *32*, 10912–10919.
- [129] Khoukh, S.; Perrin, P.; de Berc, F. B.; Tribet, C. Reversible Light-Triggered Control of Emulsion Type and Stability. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 2009–2012.
- [130] Zambrano, N.; Tyrode, E.; Mira, I.; Márquez, L.; Rodríguez, M.-P.; Salager, J.-L. Emulsion Catastrophic Inversion from Abnormal to Normal Morphology. 1. Effect of the Water-to-Oil Ratio Rate of Change on the Dynamic Inversion Frontier. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2003**, *42*, 50–56.
- [131] Seifriz, W. Studies in Emulsions. III-V. *The Journal of Physical Chemistry* **1925**, *29*, 738–749.
- [132] Herbert, W. J. MULTIPLE EMULSIONS : A New Form of Mineral-Oil Antigen Adjuvant. *The Lancet* **1965**, *286*, 771.
- [133] Dickinson, E. Double Emulsions Stabilized by Food Biopolymers. *Food Biophysics* **2011**, *6*, 1–11.
- [134] Bonnet, M.; Cansell, M.; Berkaoui, A.; Ropers, M. H.; Anton, M.; Leal-Calderon, F. Release Rate Profiles of Magnesium from Multiple W/O/W Emulsions. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 92–101.
- [135] Florence, A. T.; Whitehill, D. The Formulation and Stability of Multiple Emulsions. *International Journal of Pharmaceutics* **1982**, *11*, 277–308.
- [136] Ficheux, M.-F.; Bonakdar, L.; Leal-Calderon, F.; Bibette, J. Some Stability Criteria for Double Emulsions. *Langmuir* **1998**, *14*, 2702–2706.
- [137] Bibette, J.; Calderon, F. L.; Poulin, P. Emulsions : Basic Principles. *Reports on Progress in Physics* **1999**, *62*, 969.

- [138] Garti, N. Double Emulsions — Scope, Limitations and New Achievements. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **1997**, 123-124, 233–246.
- [139] Lindenstruth, K.; Müller, B. W. W/O/W Multiple Emulsions with Diclofenac Sodium. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 58, 621–627.
- [140] Clegg, P. S.; Tavacoli, J. W.; Wilde, P. J. One-Step Production of Multiple Emulsions : Microfluidic, Polymer-Stabilized and Particle-Stabilized Approaches. *Soft Matter* **2016**, 12, 998–1008.
- [141] Zhang, W.; Zhai, X.; Ou, W.; Song, L.; Zhang, Q. Influencing Factors of Multiple Emulsions Formed by One-Step Emulsification. *Colloid and Polymer Science* **2018**, 296, 259–269.
- [142] Zhao, C.-X. Multiphase Flow Microfluidics for the Production of Single or Multiple Emulsions for Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65, 1420–1446.
- [143] Wang, W.; Zhang, M.-J.; Chu, L.-Y. Microfluidic Approach for Encapsulation via Double Emulsions. *Current Opinion in Pharmacology* **2014**, 18, 35–41.
- [144] Vladisavljević, G. T. Recent Advances in the Production of Controllable Multiple Emulsions Using Microfabricated Devices. *Particuology* **2016**, 24, 1–17.
- [145] Abate A. R.; Weitz D. A., High-Order Multiple Emulsions Formed in Poly(Dimethylsiloxane) Microfluidics. *Small* **2009**, 5, 2030–2032.
- [146] Nisisako, T.; Okushima, S.; Torii, T. Controlled Formulation of Monodisperse Double Emulsions in a Multiple-Phase Microfluidic System. *Soft Matter* **2005**, 1, 23–27.
- [147] van der Graaf, S.; Schroën, C. G. P. H.; Boom, R. M. Preparation of Double Emulsions by Membrane Emulsification—a Review. *Journal of Membrane Science* **2005**, 251, 7–15.
- [148] Li, Z.; Liu, H.; Zeng, L.; Liu, H.; Yang, S.; Wang, Y. Preparation of High Internal Water-Phase Double Emulsions Stabilized by a Single Anionic Surfactant for Fabricating Interconnecting Porous Polymer Microspheres. *Langmuir* **2014**, 30, 12154–12163.
- [149] Binks, B. P.; Rodrigues, J. A. Types of Phase Inversion of Silica Particle Stabilized Emulsions Containing Triglyceride Oil. *Langmuir* **2003**, 19, 4905–4912.
- [150] Binks, B. P.; Fletcher, P. D. I.; Thompson, M. A.; Elliott, R. P. Influence of Propylene Glycol on Aqueous Silica Dispersions and Particle-Stabilized Emulsions. *Langmuir* **2013**, 29, 5723–5733.
- [151] Liu, M.; Chen, X.; Yang, Z.; Xu, Z.; Hong, L.; Ngai, T. Tunable Pickering Emulsions with Environmentally Responsive Hairy Silica Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2016**, 8, 32250–32258.
- [152] Zhu, Y.; Sun, J.; Yi, C.; Wei, W.; Liu, X. One-Step Formation of Multiple Pickering Emulsions Stabilized by Self-Assembled Poly(Dodecyl Acrylate-Co-Acrylic Acid) Nanoparticles. *Soft Matter* **2016**, 12, 7577–7584.
- [153] Tu, F.; Lee, D. One-Step Encapsulation and Triggered Release Based on Janus Particle-Stabilized Multiple Emulsions. *Chemical Communications* **2014**, 50, 15549–15552.
- [154] Chen, Q.; Deng, X.; An, Z. pH-Induced Inversion of Water-in-Oil Emulsions to Oil-in-Water High Internal Phase Emulsions (HIPEs) Using Core Cross-Linked Star (CCS) Polymer as Interfacial Stabilizer. *Macromolecular Rapid Communications* **2014**, 35, 1148–1152.
- [155] Hoppel, M.; Mahrhauser, D.; Stallinger, C.; Wagner, F.; Wirth, M.; Valenta, C. Natural Polymer-Stabilized Multiple Water-in-Oil-in-Water Emulsions : A Novel Dermal Drug Delivery System for 5-Fluorouracil. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2013**, 66, 658–667.
- [156] Patel, A. R.; Dumlu, P.; Vermeir, L.; Lewille, B.; Lesaffer, A.; Dewettinck, K. Rheological Characterization of Gel-in-Oil-in-Gel Type Structured Emulsions. *Food Hydrocolloids* **2015**, 46, 84–92.
- [157] Hanson, J. A.; Chang, C. B.; Graves, S. M.; Li, Z.; Mason, T. G.; Deming, T. J. Nanoscale Double Emulsions Stabilized by Single-Component Block Copolypeptides. *Nature* **2008**, 455, 85–88.

- [158] Zhang, Y.; Gou, J.; Sun, F.; Geng, S.; Hu, X.; Zhang, K.; Lin, X.; Xiao, W.; Tang, X. Impact of Electrolytes on Double Emulsion Systems (W/O/W) Stabilized by an Amphiphilic Block Copolymer. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **2014**, *122*, 368–374.
- [159] Hong, L.; Sun, G.; Cai, J.; Ngai, T. One-Step Formation of W/O/W Multiple Emulsions Stabilized by Single Amphiphilic Block Copolymers. *Langmuir* **2012**, *28*, 2332–2336.
- [160] Sun, G.; Liu, M.; Zhou, X.; Hong, L.; Ngai, T. Influence of Asymmetric Ratio of Amphiphilic Diblock Copolymers on One-Step Formation and Stability of Multiple Emulsions. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **2014**, *454*, 16–22.
- [161] Bae, J.; Russell, T. P.; Hayward, R. C. Osmotically Driven Formation of Double Emulsions Stabilized by Amphiphilic Block Copolymers. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 8240–8245.
- [162] Besnard, L.; Marchal, F.; Paredes, J. F.; Daillant, J.; Pantoustier, N.; Perrin, P.; Guenoun, P. Multiple Emulsions Controlled by Stimuli-Responsive Polymers. *Advanced Materials* **2013**, *25*, 2844–2848.
- [163] Protat, M. Formation d'émulsions multiples stimulables en une seule étape d'émulsification : effet du sel et évolution vers des architectures biocompatibles. Ph.D. thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, 2016.
- [164] Wang, Z.; Liao, S.; Wang, Y. Supramolecular Polymer Emulsifiers for One-Step Complex Emulsions. *Chinese Journal of Polymer Science* **2018**, *36*, 288–296.
- [165] Wang, D.; Liao, S.; Zhang, S.; Wang, Y. A Reversed Photosynthesis-like Process for Light-Triggered CO<sub>2</sub> Capture, Release, and Conversion. *ChemSusChem* **2017**, *10*, 2573–2577.
- [166] Huang, X.; Fang, R.; Wang, D.; Wang, J.; Xu, H.; Wang, Y.; Zhang, X. Tuning Polymeric Amphiphilicity via Se–N Interactions : Towards One-Step Double Emulsion for Highly Selective Enzyme Mimics. *Small* **2015**, *11*, 1537–1541.
- [167] Wang, Z.; Song, J.; Zhang, S.; Xu, X.-Q.; Wang, Y. Formulating Polyethylene Glycol as Supramolecular Emulsifiers for One-Step Double Emulsions. *Langmuir* **2017**, *33*, 9160–9169.
- [168] Besnard, L. Mécanismes d'inversion Dans Les Émulsions Stimulables et Réversibles. Ph.D. thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 2013.
- [169] van de Wetering, P.; Moret, E. E.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E.; van Steenberg, M. J.; Hennink, W. E. Structure-Activity Relationships of Water-Soluble Cationic Methacrylate/Methacrylamide Polymers for Nonviral Gene Delivery. *Bioconjugate Chemistry* **1999**, *10*, 589–597.
- [170] Bütün, V.; Armes, S. P.; Billingham, N. C. Synthesis and Aqueous Solution Properties of Near-Monodisperse Tertiary Amine Methacrylate Homopolymers and Diblock Copolymers. *Polymer* **2001**, *42*, 5993–6008.
- [171] Plamper, F. A.; Ruppel, M.; Schmalz, A.; Borisov, O.; Ballauff, M.; Müller, A. H. E. Tuning the Thermoresponsive Properties of Weak Polyelectrolytes : Aqueous Solutions of Star-Shaped and Linear Poly(N,N-Dimethylaminoethyl Methacrylate). *Macromolecules* **2007**, *40*, 8361–8366.
- [172] Hong, W.; Jiao, W.; Hu, J.; Zhang, J.; Liu, C.; Fu, X.; Shen, D.; Xia, B.; Chang, Z. Periplasmic Protein HdeA Exhibits Chaperone-like Activity Exclusively within Stomach pH Range by Transforming into Disordered Conformation. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 27029–27034.
- [173] Ross, M. A. Determination of Ascorbic Acid and Uric Acid in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography B : Biomedical Sciences and Applications* **1994**, *657*, 197–200.
- [174] Mukhtar, H.; Ahmad, N. Tea Polyphenols : Prevention of Cancer and Optimizing Health. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2000**, *71*, 1698S–1702S.
- [175] Khan, N.; Mukhtar, H. Tea Polyphenols for Health Promotion. *Life Sciences* **2007**, *81*, 519–533.
- [176] Hatcher, H.; Planalp, R.; Cho, J.; Torti, F. M.; Torti, S. V. Curcumin : From Ancient Medicine to Current Clinical Trials. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2008**, *65*, 1631–1652.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- [177] Betts, J. W.; Wareham, D. W. In Vitro Activity of Curcumin in Combination with Epigallocatechin Gallate (EGCG) versus Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*. *BMC Microbiology* **2014**, *14*, 172.
- [178] Manikandan, R.; Beulaja, M.; Arulvasu, C.; Sellamuthu, S.; Dinesh, D.; Prabhu, D.; Babu, G.; Vaseeharan, B.; Prabhu, N. M. Synergistic Anticancer Activity of Curcumin and Catechin : An in Vitro Study Using Human Cancer Cell Lines. *Microscopy Research and Technique* **2012**, *75*, 112–116.
- [179] Aditya, N. P.; Aditya, S.; Yang, H.; Kim, H. W.; Park, S. O.; Ko, S. Co-Delivery of Hydrophobic Curcumin and Hydrophilic Catechin by a Water-in-Oil-in-Water Double Emulsion. *Food Chemistry* **2015**, *173*, 7–13.
- [180] Aditya, N. P.; Aditya, S.; Yang, H.-J.; Kim, H. W.; Park, S. O.; Lee, J.; Ko, S. Curcumin and Catechin Co-Loaded Water-in-Oil-in-Water Emulsion and Its Beverage Application. *Journal of Functional Foods* **2015**, *15*, 35–43.
- [181] Li, N.; Taylor, L. S.; Ferruzzi, M. G.; Mauer, L. J. Kinetic Study of Catechin Stability : Effects of pH, Concentration, and Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 12531–12539.

## Chapitre II

# Synthèse et caractérisation de copolymères amphiphiles biocompatibles

### Sommaire

---

<b>I</b>	<b>Principes de la polymérisation radicalaire</b>	<b>53</b>
I.1	La polymérisation radicalaire contrôlée	53
I.2	La polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (ATRP)	55
<b>II</b>	<b>Protocole de synthèse</b>	<b>55</b>
II.1	Synthèse du macroamorceur PDMS-Br	57
II.1.a	Réactifs	57
II.1.b	Protocole expérimental	57
II.2	Synthèse du copolymère PDMS- <i>b</i> -PDMAEMA	58
II.2.a	Réactifs	58
II.2.b	Protocole expérimental	58
II.2.c	Caractérisation	61
II.3	Conclusions : Polymères synthétisés	63
<b>III</b>	<b>Étude de la cytotoxicité des copolymères synthétisés</b>	<b>64</b>
III.1	Étude bibliographique de la cytotoxicité des copolymères PDMS- <i>b</i> -PDMAEMA	64
III.1.a	Utilisations et toxicité du PDMAEMA	64
III.1.b	Utilisations et toxicité du PDMS	65
III.1.c	Etude de toxicité des polymères diblocs PDMS- <i>b</i> -PDMAEMA	66
III.1.d	Conclusion et remarques	66
III.2	Etude de cytotoxicité des copolymères PDMS- <i>b</i> -PDMAEMA formulés en émulsions	66
III.2.a	Protocole des tests de cytotoxicité	67
	Décongélation des cellules	67
	Repiquage	67
	Tests de cytotoxicité	68

III.2.b	Échantillons étudiés . . . . .	69
III.2.c	Résultats des tests de cytotoxicité . . . . .	70
	Émulsions E/H/E . . . . .	70
	Émulsions E/H/E déstabilisées en émulsions H/E . . . . .	70
III.2.d	Conclusion . . . . .	71

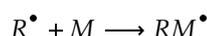
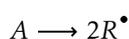
---

## I Principes de la polymérisation radicalaire

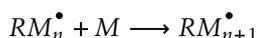
La polymérisation radicalaire est une technique de choix pour la synthèse de polymères au niveau industriel. Elle fait partie des procédés dits "en chaîne", c'est-à-dire que les monomères s'additionnent un à un sur les chaînes en croissance, qui sont porteuses de radicaux libres<sup>1</sup>. Elle peut être utilisée pour polymériser une large gamme de monomères, ceux-ci devant présenter une insaturation (typiquement une double liaison carbone-carbone)<sup>2</sup>. Elle est également peu coûteuse et facile à mettre en œuvre, et se prête à l'utilisation de différents procédés permettant une mise en forme directe du polymère, tels que la polymérisation en suspension ou en émulsion.

On distingue trois étapes dans le mécanisme d'une polymérisation radicalaire<sup>2</sup> :

- l'**amorçage**, au cours duquel l'*amorçeur*  $A$  va se décomposer en une ou plusieurs molécules porteuses d'un radical libre  $R$ , puis réagir avec le premier monomère  $M$  ;

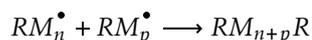


- la **propagation**, qui correspond à l'ajout successif de monomères sur les chaînes via une réaction entre le radical libre de la chaîne en croissance et l'insaturation portée par le monomère ;

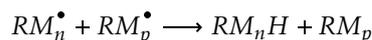


- la **terminaison**, qui met fin à la croissance des chaînes par désactivation des centres actifs lors de réactions de combinaison ou de dismutation.

*Combinaison :*



*Dismutation :*



Généralement, pour une polymérisation radicalaire classique, l'amorçage est lent et la propagation très rapide<sup>3</sup>. Les chaînes croissent rapidement et de façon inégale, ce qui conduit à une dispersité élevée dans la taille des chaînes, de plus de 1,5<sup>4</sup>. Pour obtenir des chaînes de longueur contrôlée et une distribution de taille étroite, il a donc été nécessaire de développer des méthodes de polymérisation radicalaire dite *contrôlée*, permettant de maîtriser la croissance des chaînes. Ces techniques feront l'objet du paragraphe suivant.

### I.1 La polymérisation radicalaire contrôlée

Contrairement à la polymérisation radicalaire classique, l'étape d'amorçage d'une polymérisation radicalaire contrôlée est très rapide et initie la totalité des chaînes. Puis, les chaînes en croissance sont à l'équilibre entre une forme *active* (radical libre) et une forme *dormante* majoritaire, dans laquelle le radical est temporairement désactivé par un *médiateur radicalaire*<sup>5</sup>. Cet équilibre permet de limiter la vitesse de propagation et d'obtenir un bon contrôle de la taille des chaînes. En outre, la concentration de chaînes actives étant limitée dans le milieu, les réactions de terminaison conduisant aux espèces *mortes* sont restreintes.

Les réactions mises en jeu sont illustrées sur la FIGURE II.1<sup>5</sup>. L'étape d'amorçage n'y est pas présentée.

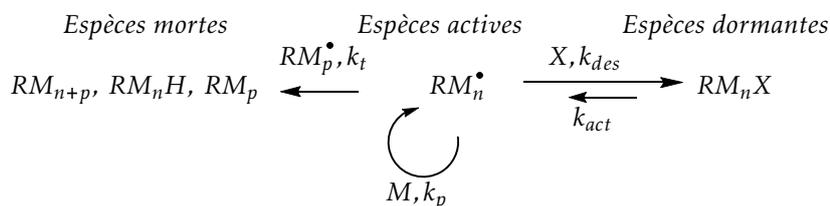


FIGURE II.1 – Mécanisme de la polymérisation radicalaire contrôlée.  $X$ ,  $RM_n^\bullet$ , et  $M$  désignent respectivement le médiateur radicalaire, la chaîne active, et le monomère.  $k_p$ ,  $k_t$ ,  $k_{act}$ ,  $k_{des}$  représentent quant à elles les constantes de vitesse des réactions de propagation, terminaison, activation et désactivation des chaînes en croissance.

Pour que la polymérisation soit contrôlée, il faut que<sup>3,6</sup> :

- La vitesse de dissociation de l'amorceur soit grande devant la vitesse de propagation (amorçage "instantané"), de façon à pouvoir initier de façon simultanée toutes les chaînes;
- L'équilibre entre les chaînes actives et les chaînes dormantes soit très déplacé vers la formation de chaînes dormantes ( $k_{des} \gg k_{act}$ );
- La vitesse d'activation des chaînes dormantes soit plus élevée que la vitesse de propagation ( $k_{act} \gg k_p$ ), pour que chaque chaîne ait la même probabilité d'ajouter un monomère, de façon à contrôler le nombre de monomères ajoutés.

Si ces conditions sont respectées, la taille des chaînes est proportionnelle à la concentration en monomère et inversement proportionnelle à la concentration en amorceur. Le rapport du nombre de moles de monomères et d'amorceur fixe le degré de polymérisation des chaînes et donc la masse molaire du polymère obtenu. Les réactions de terminaison étant limitées du fait de la faible concentration en radicaux libres dans le milieu à un instant donné, la polymérisation radicalaire contrôlée permet l'obtention de polymères avec une dispersité faible, généralement inférieure à 1,3 et pouvant même atteindre des valeurs très proches de 1. Matyjaszewski et al. obtiennent par exemple des dispersités de 1,05 pour leurs polymères en étoiles<sup>7</sup>.

Il existe trois types de polymérisations radicalaires contrôlées, qui diffèrent par les espèces mises en jeu dans la réaction d'activation/désactivation<sup>?</sup> :

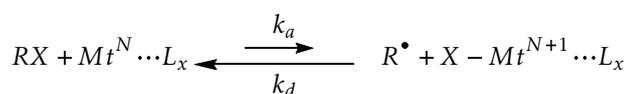
- Le transfert par addition-fragmentation réversible (RAFT), pour lequel le médiateur radicalaire est un groupe dithiocarboxylate;
- La polymérisation à médiation nitroxyde (NMP), où un radical nitroxyde stable ( $RN-O^\bullet$ ) est utilisé comme médiateur radicalaire;
- La polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP), pour laquelle le médiateur radicalaire est un halogénure d'alkyle, et où des mécanismes d'oxydo-réduction et de complexation d'un métal de transition permettent de contrôler la réaction.

Pour synthétiser nos polymères diblocs, nous avons utilisé la polymérisation par transfert d'atome dont les mécanismes seront détaillés dans le prochain paragraphe.

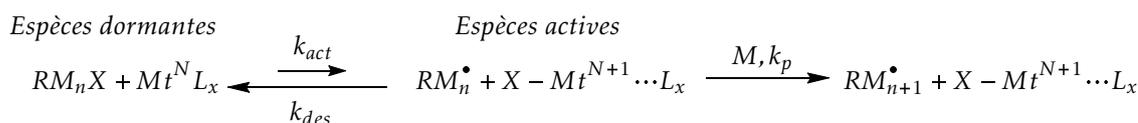
## I.2 La polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (ATRP)

Classiquement, un système d'ATRP est composé d'un monomère  $M$ , d'un amorceur halogénure d'alkyle  $R-X$  (bromure ou chlorure) et d'un métal de transition complexé par un ligand qui joue le rôle de catalyseur ( $Mt^N \cdots L_x$ , où  $Mt$  représente un métal de transition au degré d'oxydation  $N$ , et  $L$  un ligand). Le métal le plus couramment utilisé est le cuivre<sup>8</sup>. Ce métal catalyseur intervient à la fois à l'étape d'amorçage pour rompre la liaison carbone-halogène de l'halogénure d'alkyle, et à l'étape de propagation pour permettre la transition de l'espèce active à l'espèce dormante et vice-versa. L'espèce dormante est constituée par une chaîne en croissance liée à l'atome d'halogène, le passage de l'espèce dormante à l'espèce active se faisant par échange de cet atome, et réduction du métal de transition. Le mécanisme de polymérisation est présenté dans la FIGURE II.2<sup>5</sup>.

**Amorçage :**



**Propagation :**



**Terminaison :**

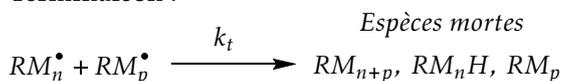


FIGURE II.2 – Schéma réactionnel de la polymérisation par ATRP.  $RX$  représente l'halogénure d'alkyle,  $X$  étant l'atome d'halogène.  $Mt$  est un métal de transition de degré d'oxydation  $N$  ou  $N + 1$ , lié à  $x$  ligands  $L$ , et  $M$  est le monomère.  $k_a$ ,  $k_d$ ,  $k_{act}$ ,  $k_{des}$ ,  $k_p$ ,  $k_t$  représentent respectivement les constantes de vitesse d'activation et de désactivation de l'amorceur, d'activation et de désactivation de la chaîne en croissance, de propagation et de terminaison.

Nous utiliserons l'ATRP pour synthétiser des copolymères à blocs de type polydiméthylsiloxane-*b*-poly(méthacrylate de diméthylaminoéthyle) (PDMS-*b*-PDMAEMA) de dispersité faible, en utilisant comme halogénure d'alkyle un macroamorceur polydiméthylsiloxane (PDMS) bromé, comme catalyseur le bromure de cuivre (I), et comme monomère le méthacrylate de diméthylaminoéthyle (DMAEMA). Le ligand est le 1,1,4,7,10,10-hexaméthyltriéthylenetetramine (HMTETA).

## II Protocole de synthèse

Notre objectif est de synthétiser grâce à l'ATRP une série de copolymères diblocs amphiphiles PDMS-*b*-PDMAEMA, capables de stabiliser des émulsions. Nous ferons varier :

- Le rapport  $\frac{\text{nombre d'unités hydrophiles}}{\text{nombre d'unités hydrophobes}}$  du polymère (noté plus simplement dans la suite rapport  $\frac{\text{hydrophile}}{\text{hydrophobe}}$ ), en fixant la taille du bloc PDMS et en ajustant le degré de polymérisation (DP) du bloc PDMAEMA ;
- La longueur globale du polymère à rapport  $\frac{\text{hydrophile}}{\text{hydrophobe}}$  fixé.

La synthèse des copolymères est réalisée en deux étapes présentées FIGURE II.3, à partir d'un bloc de PDMS commercial portant une fonction hydroxyle en bout de chaîne (PDMS-OH). En premier lieu, ce bloc est fonctionnalisé *via* une estérification (FIGURE II.3(a)) pour obtenir un atome de brome terminal (PDMS-Br). Ce premier bloc ainsi modifié sert de macroamorceur pour la polymérisation du bloc PDMAEMA (FIGURE II.3(b)).

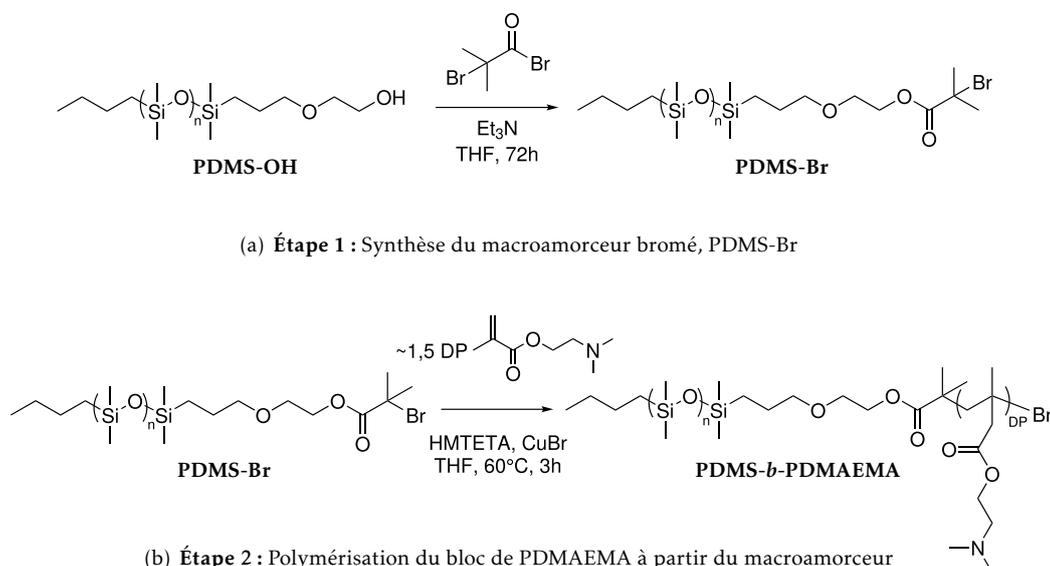


FIGURE II.3 – Mécanisme réactionnel des deux étapes de synthèse des copolymères amphiphiles à bloc PDMS-*b*-PDMAEMA.

Nous travaillerons avec deux PDMS hydroxylés commerciaux différents, dont les longueurs seront vérifiées par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN<sup>1</sup>H). La longueur du second bloc est ajustée en faisant varier le nombre d'équivalents de DMAEMA introduit pour un équivalent de macroamorceur. *A priori*, le nombre d'équivalents à introduire est égal au degré de polymérisation souhaité pour le PDMAEMA. Cependant, en fin de réaction, l'ajout des monomères sur la chaîne en croissance se fait de façon moins bien contrôlée. Pour éviter cela, la réaction est stoppée avant qu'elle n'arrive à son terme. Nous introduirons donc un nombre d'équivalents plus important déterminé empiriquement, égal au degré de polymérisation visé multiplié par 1,5.

Les produits obtenus dans la suite (macroamorceurs et copolymères) sont tous analysés par RMN<sup>1</sup>H, à 1% en masse dans le chloroforme deutéré (CDCl<sub>3</sub>) et à température ambiante, sur un appareil Bruker 400 MHz. Ces mesures permettront d'une part de vérifier que les produits attendus ont bien été obtenus, et d'autre part de déterminer la composition et la masse molaire des copolymères formés.

Leur dispersité est déterminée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC), grâce à un appareil Viscotek GPC max VE 2001 équipé d'un triple détecteur TDA 302. Les échantillons

sont préparés dans le THF, à 2% en triéthylamine, et les mesures effectuées à 35°C (dans un souci d'assurer une meilleure reproductibilité quelle que soit la température ambiante). La masse molaire des chaînes ne peut pas être mesurée par cette méthode, du fait de l'incrément d'indice de réfraction du PDMS ( $\frac{dn}{dc}$ ) quasi-nul.

## II.1 Synthèse du macroamorceur PDMS-Br

### II.1.a Réactifs

Les réactifs utilisés pour la synthèse du macroamorceur PDMS-Br sont présentés dans le TABLEAU II.1. La réaction est réalisée dans le tétrahydrofurane (THF) anhydre. Tous les réactifs sont utilisés sans purification préalable. La masse molaire exacte du PDMS-OH commercial est déterminée par RMN<sup>1</sup>H à 1% en masse dans le CDCl<sub>3</sub>.

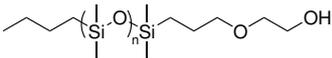
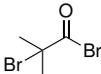
Réactif	Nom	Formule	$n_{eq}$
Alcool	PDMS-OH		1
Bromure d'acyle	Bromure de bromoisobutyryle		2,75
	Triéthylamine (Et <sub>3</sub> N)		4

TABLEAU II.1 – Réactifs utilisés pour la synthèse du macroamorceur PDMS-Br.  $n_{eq}$  représente le nombre d'équivalents molaires introduits.

Le bromure d'acyle est introduit en excès pour assurer la quantitativité de la réaction.

### II.1.b Protocole expérimental

Le protocole de synthèse a été développé par Luo et al.<sup>9</sup>, puis adapté par Protat et al.<sup>10</sup>. Dans un ballon bicol sont introduits une olive aimantée, 20 g de PDMS-OH (2,5 mmol) et 1,43 mL de triéthylamine (10 mmol). 15 mL de THF anhydre sont ajoutés, puis, sous forte agitation, 848  $\mu$ L (6,90 mmol) de bromure de bromoisobutyryle. Un précipité blanc, constitué des sels de bromure de triéthylammonium, apparaît immédiatement. On laisse réagir durant 72 h à température ambiante, puis le ballon est chauffé dans un bain d'huile à 60°C pendant une heure pour assurer la transformation complète des fonctions hydroxyles.

Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur Büchner pour se débarrasser du précipité, puis le THF éliminé à l'évaporateur rotatif pour obtenir une huile brune. Cette huile est diluée dans 400 mL de dichlorométhane, et la phase organique ainsi obtenue est lavée trois fois par 300 mL de solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, puis trois fois par 300 mL d'eau distillée. La phase organique est enfin séchée sur sulfate de magnésium anhydre avant évaporation du dichlorométhane et séchage sous cloche à vide de l'huile récupérée pendant 24h.

L'efficacité de la fonctionnalisation est contrôlée par RMN<sup>1</sup>H (1% en masse dans le CDCl<sub>3</sub>). Des extraits de spectres sont présentés FIGURE II.4. On vérifie notamment le décalage du triplet de 3,65 ppm (protons *c* sur la FIGURE II.4(a)) à 4,2 ppm après fonctionnalisation (protons *d* sur la FIGURE II.4(b)). Les protons *b* (cf FIGURE II.4) sont également plus déblindés. On voit que la fonctionnalisation n'est pas totale puisqu'il reste des signaux peu intenses à 3,45 et 3,65 ppm. Le triplet de faible intensité à 3,75 ppm apparaissant sur les deux extraits de spectre correspond probablement à une impureté.

L'analyse RMN permet également de connaître la taille exacte du composé commercial PDMS-OH permettant la synthèse du macroamorceur, en comparant l'intensité relative du signal à 0 ppm (protons portés par les carbones liés aux silicium) et celle des triplets entre 3 et 4 ppm qui intègrent chacun pour 2 protons, soit 6 protons au total. Nous avons travaillé avec deux longueurs différentes, 60 et 104 unités diméthylsiloxanes (DMS) (à ± 5 unités près). Le spectre RMN<sup>1</sup>H complet du PDMS-OH est présenté en Annexe A, ainsi que le calcul du nombre d'unités DMS de la chaîne.

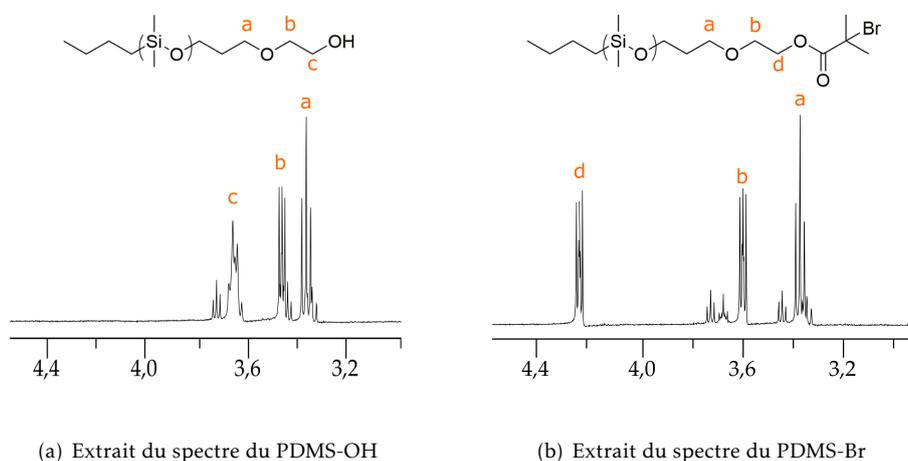


FIGURE II.4 – Signaux RMN<sup>1</sup>H caractéristiques des blocs PDMS utilisés (ici pour le bloc de 60 unités DMS). Les spectres sont mesurés dans le CDCl<sub>3</sub>.

Une fois que le macroamorceur est synthétisé et caractérisé, nous l'utilisons pour amorcer la polymérisation du DMAEMA et ainsi construire le second bloc du copolymère.

## II.2 Synthèse du copolymère PDMS-*b*-PDMAEMA

### II.2.a Réactifs

Les réactifs de la synthèse sont présentés sur la TABLEAU II.2. La synthèse est réalisée dans du THF. Le DMAEMA et le THF sont préalablement purifiés sur colonne d'alumine activée basique afin de retirer les inhibiteurs et retardeurs de polymérisation et les stabilisants présents dans les produits commerciaux. Les autres réactifs sont directement utilisés sans purification supplémentaire.

### II.2.b Protocole expérimental

La synthèse est réalisée entièrement sous azote. On travaille avec deux rampes, une pour le vide et l'autre pour l'azote, comme représenté dans la FIGURE II.5.

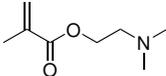
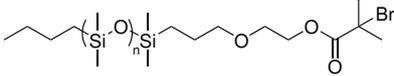
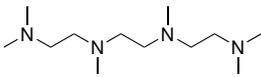
Réactif	Nom	Formule	$n_{eq}$
Monomère	DMAEMA		1,5xDP
Amorceur	Macroamorceur PDMS-Br		1
Catalyseur	Bromure de Cuivre (I)	CuBr	1
Ligand	1,1,4,7,10,10-Hexaméthyltriéthylènetétramine (HMTETA)		2

TABLEAU II.2 – Réactifs utilisés pour la synthèse du copolymère PDMS-*b*-PDMAEMA.  $n_{eq}$  représente le nombre d'équivalents molaires introduits et DP le degré de polymérisation souhaité pour le bloc PDMAEMA.

Le bromure de cuivre ainsi qu'une olive aimantée sont introduits dans un ballon bicol de 50 mL (**Ballon 1** sur la FIGURE II.5). Le petit col est fermé par un septum, et un robinet trois voies est adapté sur le grand col. Le bromure de cuivre est alors soumis à trois cycles "vide/azote" successifs de dix minutes chacun pour éliminer l'oxygène du milieu réactionnel.

Dans un deuxième ballon bicol (**Ballon 2** sur la FIGURE II.5) sont introduits les autres réactifs :

- Le macroamorceur PDMS-Br
- Le monomère DMAEMA
- Le ligand HMTETA
- Le solvant THF

Le **ballon 2** est également fermé par un septum (petit col) et un robinet 3 voies (grand col), et son contenu est dégazé par barbotage à l'azote durant 5 min (cf FIGURE II.6(a)). Le contenu du **ballon 2** est ensuite transféré dans le **ballon 1** par canulation sous flux d'azote (cf FIGURE II.6(b)), et le ballon 1 est placé pendant 3 h dans un bain d'huile à 60 °C.

A l'issue des 3 h, la réaction est stoppée. Le milieu réactionnel est dilué dans un grand volume de THF, puis filtré sur colonne d'alumine activée basique pour éliminer le cuivre. Une majorité du THF du filtrat récupéré est évaporée à l'évaporateur rotatif pour ne garder qu'un volume d'une trentaine de millilitres.

Le liquide est alors mis à dialyser (membrane de cut-off 6000-8000) dans un grand volume d'eau à pH 9-10. La taille des pores de la membrane est choisie de façon à laisser passer les chaînes de macroamorceur n'ayant pas réagi, mais à contenir le polymère. L'eau de dialyse est légèrement basifiée pour obtenir le polymère sous sa forme neutre. Elle est changée de façon régulière plusieurs fois par jour et, après une semaine, le contenu de la membrane est lyophilisé pour récupérer le polymère.

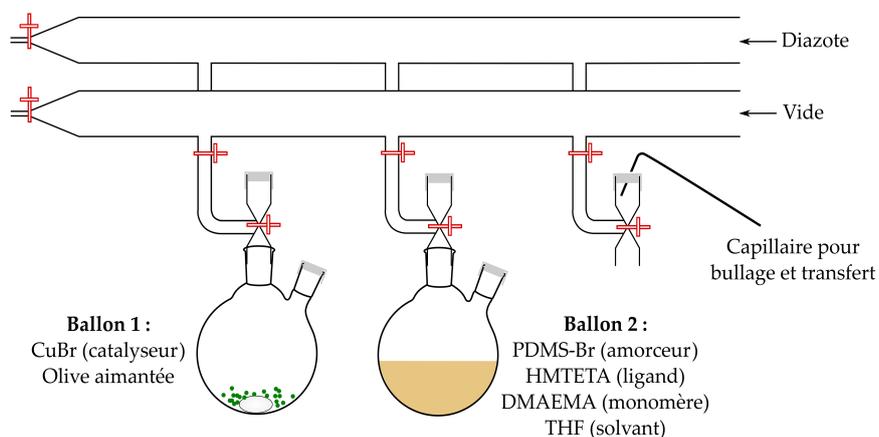


FIGURE II.5 – Schéma du montage expérimental pour la synthèse du PDMS-*b*-PDMAEMA.

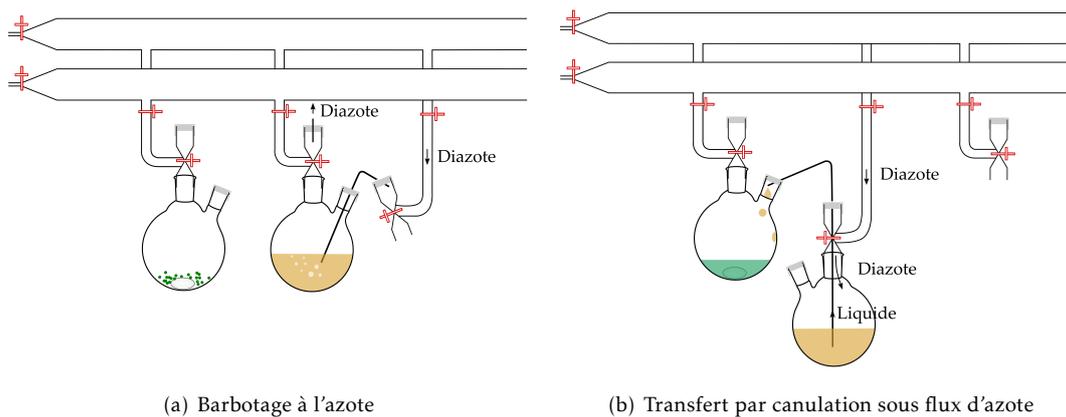


FIGURE II.6 – Schéma des différentes étapes préalables à la synthèse.

### II.2.c Caractérisation

Les copolymères sont caractérisés par RMN<sup>1</sup>H et chromatographie d'exclusion stérique.

La RMN<sup>1</sup>H permet de déduire le rapport  $\frac{\text{nombre d'unités DMS}}{\text{nombre d'unités DMAEMA}}$ , et donc d'estimer la longueur du bloc PDMAEMA à partir du nombre d'unités diméthylsiloxanes du macroamorceur. Pour cela, on compare les intensités relatives du signal obtenu pour les groupements méthyles portés par les atomes de silicium ( $\delta=0$ ppm, signal *a* sur la FIGURE II.7), et les signaux des hydrogènes portés par le bloc DMAEMA, en particulier ceux des méthyles portés par l'atome d'azote ( $\delta=2,2$  ppm, 6 protons, signal *f* sur la FIGURE II.7), et par les deux carbones en  $\alpha$  et  $\beta$  ( $\delta=2,4$  ppm, 2 protons, signal *e*, et  $\delta=4$  ppm, 2 protons, signal *d*).

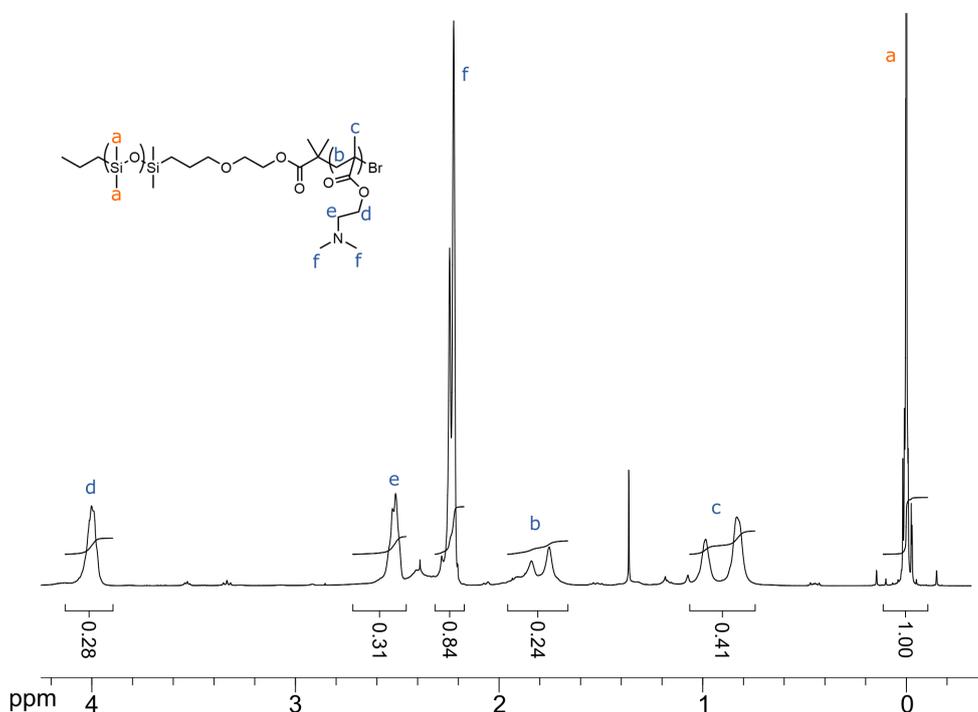


FIGURE II.7 – Spectre RMN<sup>1</sup>H typique d'un polymère PDMS-*b*-PDMAEMA dans le CDCl<sub>3</sub>, ici le PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub>.

La mesure de SEC, dont un exemple est présenté à la FIGURE II.8, nous donne accès à la dispersité de nos copolymères. Elle permet de vérifier qu'on a bien formé un polymère monomodal, et qu'il ne reste pas de macroamorceur qui n'aurait pas réagi.

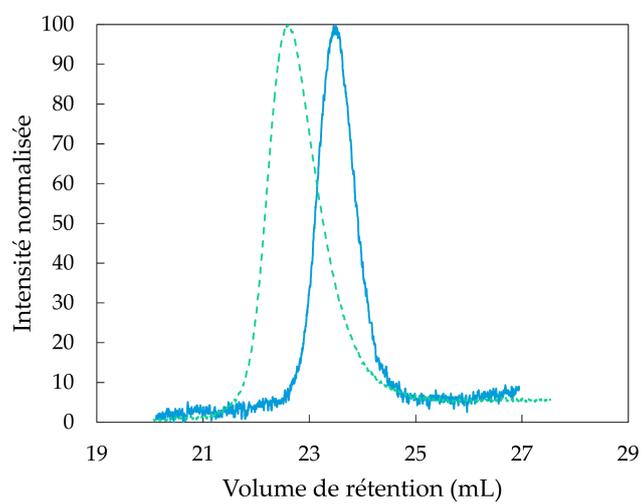


FIGURE II.8 – Signaux de SEC typiques obtenus pour le macroamorceur PDMS-Br (train plein) et pour le polymère PDMS-*b*-PDMAEMA associé (train pointillé), ici le PDMS<sub>104</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>89</sub>.

### II.3 Conclusions : Polymères synthétisés

Le TABLEAU II.3 présente les différents polymères qui ont été synthétisés et étudiés au cours de ce travail.

Formule brute	Rapport $\frac{\text{Hydrophile}}{\text{Hydrophobe}}$	Dispersité	Schéma
PDMS <sub>60</sub> - <i>b</i> - PDMAEMA <sub>40</sub>	0,67	1,26	
PDMS <sub>60</sub> - <i>b</i> - PDMAEMA <sub>50</sub>	0,83	1,08	
PDMS <sub>60</sub> - <i>b</i> - PDMAEMA <sub>80</sub>	0,67	1,26	
PDMS <sub>60</sub> - <i>b</i> - PDMAEMA <sub>265</sub>	4,4	1,24	
PDMS <sub>104</sub> - <i>b</i> - PDMAEMA <sub>89</sub>	0,86	1,11	

TABLEAU II.3 – Copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA synthétisés et étudiés - Une boule représente environ 10 unités monomères (jaune pour le diméthylsiloxane, bleu pour le métacrylate de diméthyle de diaminoéthyle). Le rapport  $\frac{\text{hydrophile}}{\text{hydrophobe}}$  R est estimé par RMN <sup>1</sup>H, et la dispersité par SEC.

Les quatre premiers polymères ont été synthétisés à partir du même bloc de PDMS hydroxylé de 60 unités DMS. Pour le dernier, un PDMS plus long (104 unités DMS) a été utilisé.

### III Étude de la cytotoxicité des copolymères synthétisés

Nous souhaitons utiliser ces polymères pour développer des applications pour l'homme. Il est donc nécessaire de s'assurer de leur biocompatibilité. Après une étude bibliographique de la toxicité de chacun des deux blocs composant notre polymère, nous présenterons les expériences réalisées pour mesurer la cytotoxicité des copolymères formulés en émulsions.

#### III.1 Étude bibliographique de la cytotoxicité des copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA

##### III.1.a Utilisations et toxicité du PDMAEMA

Les polycations, comme le PDMAEMA à bas pH, sont capables d'interagir avec la membrane cellulaire et d'induire sa perméabilisation, conduisant à une diminution du métabolisme de la cellule, puis à sa nécrose<sup>11,12</sup>. La perméabilisation est déclenchée par l'hydrolyse des phospholipides qui composent la membrane cellulaire, catalysée par les polycations et leur capacité à échanger des protons<sup>12</sup>. À structure égale, la toxicité des polycations est d'autant plus forte que la chaîne est longue et chargée<sup>11</sup>, car la capacité à perméabiliser la membrane est accrue.

Malgré cette toxicité, les polycations sont toutefois couramment utilisés pour des applications biologiques. En particulier, ils constituent de très bons vecteurs dans le cadre de la thérapie génique. De par leurs charges positives, ils sont capables de se lier de façon électrostatique à l'ADN chargé négativement, et permettent ainsi de le transporter au cœur des cellules par endocytose (internalisation d'une particule au sein de la cellule après que celle-ci a été entourée par la membrane cellulaire)<sup>13</sup>. La formation du complexe polycation/ADN permet de protéger ce dernier de l'action de la nucléase (enzyme clivant les acides nucléiques) et permet de maximiser les chances de transfection de la cellule et l'expression du gène ainsi transporté.

Le PDMAEMA a été largement étudié comme vecteur dans le cadre de la thérapie génique<sup>12,14,15</sup>, mais la transfection n'est pas la seule application biologique envisagée pour ce polymère. Ainsi, par exemple, Rawlinson et al.<sup>16</sup> utilisent le PDMAEMA pour ses propriétés antimicrobiennes : le polymère, comme d'autres biocides cationiques, est capable de se lier à la bactérie, puis de perméabiliser sa membrane et d'entraîner la mort cellulaire. Une autre application, étudiée en particulier par Keely et al.<sup>17</sup>, est d'utiliser le PDMAEMA comme mucoadhésif grâce à sa capacité à interagir électrostatiquement et par liaisons hydrogènes avec le mucus. Ceci lui permet par exemple d'augmenter le temps de résidence gastrointestinal de principes actifs et ainsi de favoriser leur biodisponibilité.

Pour mieux connaître les possibilités d'utilisation du PDMAEMA, sa toxicité a été étudiée dans différentes conditions. Ainsi, Layman et al.<sup>15</sup> mesurent la viabilité de cellules endothéliales de moelle osseuse mises au contact pendant 12h avec des concentrations variées de PDMAEMA, de masse molaire comprise entre 43 kDa et 915 kDa. Ils concluent que pour une concentration donnée, les chaînes les plus longues conduisent à une IC<sub>50</sub> (concentration à laquelle on obtient une diminution de 50% de la viabilité des cellules) comprise entre 5 et 15 µg/mL. Celle-ci est plus élevée pour les chaînes les plus courtes qui sont donc moins toxiques, entre 20 et 30 µg/mL. Rawlinson et al.<sup>18</sup> travaillent avec des cellules permettant de quantifier la cytotoxicité lors d'une injection par voie intraveineuse, et trouvent pour leur PDMAEMA de 12,8 kDa une IC<sub>50</sub> comprise

entre 25 et 50 µg/mL après une mise en contact de 24 à 72 h avec les cellules. Enfin, Moreau et al.<sup>19</sup> couplent une étude *in vitro* sur des globules rouges et *in vivo* sur des souris. Ils concluent qu'une exposition des globules rouges à une concentration de PDMAEMA de 10 mM (exprimée en concentration équivalente en monomère, soit 1,93 mg/mL) conduit à une augmentation significative de l'hémolyse, c'est-à-dire de la libération dans le sang de l'hémoglobine suite à la destruction des globules rouges. Concernant les tests *in vivo*, ils observent le décès des animaux en moins d'une heure pour des concentrations injectées autour de 5 g/kg, et leur mort quasi-instantanée pour des concentrations injectées plus élevées.

A notre connaissance, Rawlinson et ses collaborateurs<sup>18</sup> sont les seuls à avoir étudié la cytotoxicité du PDMAEMA sur des cellules intestinales (Caco-2), dans le but de quantifier la toxicité par voie orale du polycation. D'après leurs expériences, celle-ci s'avère nettement moins élevée que pour la voie intraveineuse, avec une IC<sub>50</sub> comprise entre 100 et 250 µg/mL.

Toutes ces expériences sont réalisées à pH biologique, c'est-à-dire autour de 7,4. Cette valeur est proche du pK<sub>A</sub> du polycation, qui est alors relativement peu chargé. Les IC<sub>50</sub> obtenues sont finalement relativement élevées pour ce polymère, qui présente donc une toxicité limitée. Il faut en effet prendre en compte le fait que le polymère, une fois formulé, est administré par intraveineuse ou ingéré, et sa concentration est alors fortement diminuée par rapport à la concentration initiale dans la formulation. Il est donc peu probable d'atteindre *in vivo* les concentrations au delà desquelles le polymère va devenir toxique. La toxicité observée *in vivo* par l'équipe de Moreau pour des concentrations supérieures à 5 g/kg représenteraient pour un humain l'injection de plusieurs centaines de grammes en une seule prise, c'est-à-dire une quantité très importante.

#### III.1.b Utilisations et toxicité du PDMS

Le PDMS est largement utilisé dans le domaine du biomédical, en particulier pour recouvrir des implants<sup>20</sup>, ou bien pour les lentilles de contact<sup>21</sup>.

En 1977, l'institut américain du cœur, du poumon et du sang (NHLBI) a constaté que les informations manquaient quant aux potentielles interactions entre les biomatériaux alors utilisés, dont le PDMS, et le sang avec lequel ils sont fréquemment en contact<sup>22</sup>. A la suite de cela, de nombreuses études de cytotoxicité et d'hémocompatibilité furent effectuées pour le PDMS. On peut citer par exemple l'étude de Bordenave et ses collaborateurs<sup>23</sup> qui ont réalisé des tests de cytotoxicité sur des cellules endothéliales. Dans leurs expériences, les cellules ne sont pas en contact direct avec le PDMS, leur étude se concentrant sur les potentielles molécules toxiques relarguées par le matériau dans le milieu. Ils concluent que la croissance des cellules en présence de PDMS est similaire au contrôle. Ertel et al.<sup>24</sup> étudient quant à eux directement la croissance de cellules de différentes lignées sur le PDMS. Lorsque celles-ci sont cultivées dans du milieu de culture (acides aminés, vitamines, sels et glucose) sans ajout de sérum ou de protéines, leur mortalité s'avère importante lorsqu'elles sont en contact avec le PDMS. En revanche, en présence de sérum (constitué essentiellement de protéines), la mortalité est nettement diminuée. Ce phénomène est expliqué par le fait que le PDMS ne relargue pas de composés toxiques dans le milieu, la mortalité observée semblant plutôt liée aux propriétés physiques du substrat (par exemple la capacité des protéines membranaires à être solubilisées dans le polymère, ce qui engendre la destruction des

cellules). En présence de protéines adsorbées sur le substrat, cette toxicité intrinsèque de la surface est grandement diminuée. *In vivo*, en présence de protéines, la mort cellulaire est donc très limitée.

Des études réalisées *in vivo* sur des rats ou des lapins après injection d'un implant recouvert de PDMS montrent que le processus d'inflammation puis de guérison lié à l'introduction dans l'organisme d'un corps étranger est similaire à celui observé avec d'autres biomatériaux, et que les cellules semblent se développer normalement à la surface de l'implant<sup>22,25,26</sup>.

Le PDMS est principalement étudié pour sa toxicité en tant que matériau et il n'existe pas à notre connaissance de tests de cytotoxicité des chaînes non réticulées pour une administration par voie orale. En revanche il est fait mention dans la littérature de systèmes microfluidiques où des cellules Caco-2, souvent utilisées pour mimer les parois intestinales, sont cultivées à la surface de PDMS sans incidence notable sur leur croissance et leur métabolisme<sup>27,28</sup>.

### III.1.c Etude de toxicité des polymères diblocs PDMS-*b*-PDMAEMA

Dans la littérature, nous n'avons trouvé qu'un exemple d'étude de cytotoxicité de polymères diblocs PDMS-*b*-PDMAEMA. Car et son équipe<sup>29</sup> ont examiné la viabilité de cellules cancéreuses au contact de copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA avec un bloc PDMS de taille fixée à 74 unités monomères, et un bloc hydrophile de longueur variable (5, 13 ou 22 unités monomères). Le milieu de culture est à pH proche de 7,4, et contient divers sels. Ils concluent que la cytotoxicité est d'autant plus forte que la chaîne PDMAEMA est longue, comme dans le cas des homopolymères. Seul le plus petit polymère ne présente pas de toxicité pour des concentrations en dessous de 300 µg/mL, les autres commencent à affecter la croissance cellulaire dès 50 µg/mL.

### III.1.d Conclusion et remarques

Le PDMAEMA et les copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA présentent une toxicité pour l'homme pour des concentrations dépendant de la taille de la chaîne. Dans le cas d'une injection par voie intraveineuse, une toxicité a pu être observée dès 5 µg/mL, la toxicité étant moindre pour une ingestion par voie orale.

La concentration de copolymères utilisée dans nos émulsions est bien supérieure aux différents seuils de toxicité trouvés dans la littérature pour le PDMAEMA. En revanche, comme dit plus haut, le polymère une fois ingéré sera dilué dans le milieu digestif. De plus, contrairement aux études présentées, notre polymère est administré sous forme d'émulsions, une grande partie de celui-ci n'est donc pas libre, mais adsorbée aux interfaces eau/huile, le reste étant réparti entre la phase huile, et *a priori* dans une moindre mesure la phase aqueuse.

De façon à vérifier la biocompatibilité de notre polymère sous cette formulation, et son utilisation pour des applications avec administration par voie orale à l'homme, nous avons réalisé nos propres études de cytotoxicité adaptées à nos conditions expérimentales.

## III.2 Etude de cytotoxicité des copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA formulés en émulsions

Comme nous souhaitons administrer nos émulsions par voie orale, les mesures de cytotoxicité seront effectuées sur des cellules intestinales. Les cellules classiquement étudiées pour ce genre de tests sont les cellules Caco-2<sup>30</sup>, d'ailleurs utilisées par Rawlinson et al.<sup>18</sup> pour mesurer l'IC<sub>50</sub> du

PDMAEMA pour une administration par cette voie. Cependant, l'utilisation simple de cellules Caco-2 ne permet pas d'avoir un modèle satisfaisant de paroi intestinale : la surexpression des jonctions serrées (qui assurent l'étanchéité entre les cellules épithéliales, notamment intestinales), et l'absence de mucus (couche protectrice lubrifiante présente à la surface des cellules) faussent les résultats obtenus pour l'absorption de molécules par l'organisme<sup>31</sup>.

De façon à mieux mimer les parois intestinales humaines, nous allons utiliser ici une co-culture de Caco-2 et d'une autre lignée cellulaire, les HT29-MTX. Les HT29 sont des cellules cancéreuses humaines du cancer du colon. Lorsqu'elles sont cultivées en présence de l'anticancéreux méthotrexate (MTX) en faibles concentrations (inférieures à l'IC<sub>50</sub>, entre 10<sup>-5</sup> et 10<sup>-7</sup> M), elles sont capables de se différencier en cellules productrices de mucus<sup>32</sup>. Au cours du processus de différenciation, on observe une altération de la croissance cellulaire, et même une mortalité des cellules. Il faut trois mois aux cellules pour retrouver un processus de croissance semblable aux cellules HT29 non différenciées. Ici, nous avons choisi de nous procurer des cellules HT29 déjà différenciées en présence de MTX, de façon à faire l'économie de l'étape de différenciation coûteuse en temps.

#### III.2.a Protocole des tests de cytotoxicité

Nous nous basons sur le protocole élaboré par Bénudeau et al.<sup>31, 33</sup>.

Les cellules Caco-2 et HT29-MTX sont adhérentes, c'est-à-dire qu'elles poussent sur le substrat sur lequel elles sont cultivées, en y adhérant.

Le milieu de culture utilisé pour les deux lignées est du DMEM (*Dulbecco/Vogt Modified Eagle's minimal essential Medium*), un milieu utilisé pour tout type cellulaire et constitué d'acides aminés, de différents sels, de glucose et de vitamines. On y ajoute 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*), 1% d'acides aminés non essentiels (les acides aminés essentiels étant ceux que le corps ne peut pas synthétiser par lui-même, ou bien en quantité insuffisante) et 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Ce milieu de culture contient un indicateur coloré : il doit être utilisé lorsque la coloration est rouge orangée.

**Décongélation des cellules** Pour la conservation sur des temps longs, les cellules sont congelées dans du DMSO et stockées dans de l'azote liquide. Le DMSO permet une bonne conservation des cellules congelées, mais devient toxique pour les cellules une fois qu'elles sont décongelées. Rapidement après décongélation dans un bain à 37°C, les cellules sont diluées dans 9 fois leur volume de milieu de culture, puis centrifugées à 200 g pendant 5 min dans un tube Eppendorf® afin de former un culot. Le surnageant est retiré à la pipette et le culot est redispersé dans du milieu neuf. Cette étape de centrifugation permet d'éliminer le DMSO. Les cellules sont ensuite introduites dans une flasque de culture de 75 cm<sup>2</sup> (cf FIGURE II.9(a)) dans 15 mL de milieu, et laissées se multiplier dans un incubateur à 37°C, avec atmosphère saturée en eau et un taux de CO<sub>2</sub> égal à 5%.

**Repiquage** Préalablement aux tests proprement dits, les cellules sont cultivées pendant 22 jours pour les Caco-2 et 25 jours pour les HT29-MTX, de façon à ce qu'elles puissent se remettre de l'important stress causé par la congélation/décongélation et retrouver un rythme de croissance normal. Durant cette période, elles sont repiquées tous les 3 à 4 jours.

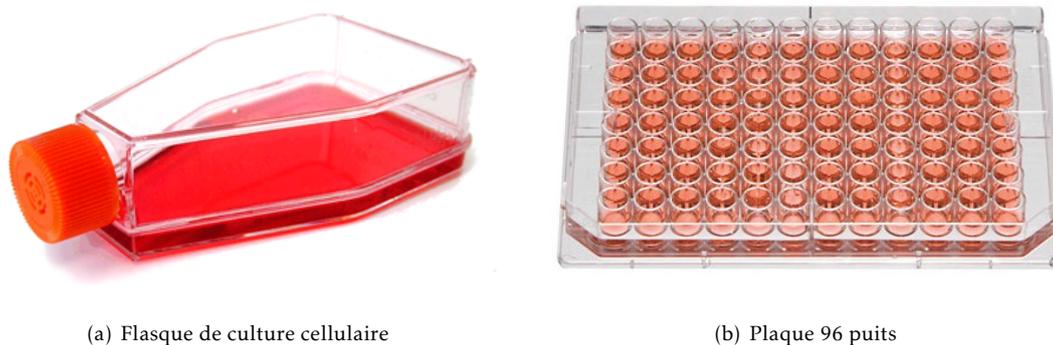


FIGURE II.9 – Matériel utilisé pour la culture cellulaire.

Le *repiquage* consiste à diminuer la concentration cellulaire dans le milieu et permet ainsi d'éviter que les nutriments ne viennent à manquer ou que les cellules ne s'auto-étouffent. Celui-ci se fait en plusieurs étapes : tout d'abord, après aspiration du milieu de culture, les cellules sont "lavées" par une solution de tampon phosphate salin afin d'éliminer les protéines en suspension. Les cellules sont ensuite décollées à l'aide d'une protéine, la trypsine. Cette protéine est une endoprotéase capable d'hydrolyser les liaisons peptidiques entre certains acides aminés. Elle est ainsi capable de cliver les protéines membranaires d'adhésion des cellules et de les détacher de leur substrat. On laisse agir la trypsine pendant 5 min à 37°C jusqu'à ce que toutes les cellules soient décollées. Les cellules sont ensuite diluées dans du milieu de culture et centrifugées à 200 g pendant 5 min. Le culot est récupéré. Cette étape permet d'éliminer la trypsine qui peut avoir un effet nocif sur les cellules. Le culot est dilué dans la quantité appropriée de milieu de façon à obtenir le taux de dilution souhaité dans chaque flasque. Cette valeur est estimée de façon à avoir un taux de recouvrement des cellules au fond de la flasque d'environ 70 à 80% lors du prochain repiquage quelques jours plus tard. On dit qu'on est à 70-80% de la *confluence*, c'est-à-dire l'état où toutes les cellules sont au contact.

Une étape de repiquage suivie par une dilution cellulaire est appelée un *passage*, noté P suivi du numéro du passage. Ici, les cellules Caco-2 étaient déjà présentes au laboratoire et ont été décongelées au P71. Les cellules HT29-MTX ont été décongelées au P50.

**Tests de cytotoxicité** Au cinquième passage après décongélation, les cellules Caco-2 sont comptées sous microscope dans une lame de Kova après décollement par la trypsine. Les lames de Kova sont des cellules de microscope dans lesquelles on peut introduire une suspension cellulaire. Au fond de la cellule est dessiné un carré de 81 cases, qui est recouvert par un volume de 1  $\mu\text{L}$  de liquide lorsque la cellule est remplie. En comptant les cellules présentes dans chaque case du carré on peut déduire le nombre de cellules par microlitre de suspension, et calculer les volumes de dilution nécessaires pour avoir le nombre de cellules souhaité pour les tests de toxicité. 5000 cellules sont introduites dans chaque puits d'une plaque 96 puits (cf FIGURE II.9(b)), en suspension dans 200  $\mu\text{L}$  de milieu de culture. Les puits des bords sont laissés vides pour éviter tout risque de contamination. Deux plaques sont ainsi remplies.

Après trois jours, les puits sont vidés de leur milieu de culture qui est remplacé par 100  $\mu\text{L}$  de

milieu neuf. 10 000 cellules HT29-MTX sont ajoutées dans chaque puits, dispersées dans 100  $\mu\text{L}$  de milieu. Les deux lignées sont laissées à l'incubateur en coculture durant 18 jours, le milieu de culture étant remplacé trois fois par semaine par du milieu neuf.

A l'issue de ces 18 jours, le mucus s'est développé à la surface des cellules grâce aux HT29-MTX, et ce de façon uniforme. Le milieu est aspiré et 100  $\mu\text{L}$  de milieu de culture et 100  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont ajoutés dans chaque puits. Les échantillons testés seront détaillés dans le prochain paragraphe. Les échantillons sont laissés au contact des cellules durant 24h. Les puits sont ensuite vidés par aspiration et remplis par 200  $\mu\text{L}$  de milieu neuf auxquels sont ajoutés 20  $\mu\text{L}$  de solution de MTT à 5 mg/mL (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium), composé de couleur jaune. Le MTT est réduit en formazan au contact des mitochondries des cellules saines, plus précisément grâce à la production par les mitochondries de NADH-déshydrogénase<sup>34,35</sup> (cf FIGURE II.10). Le formazan est un composé violet insoluble dans l'eau, qui précipite dans le milieu, en quantité proportionnelle à l'activité cellulaire. Le MTT est laissé au contact des cellules pendant environ 3h à l'incubateur. Le milieu de culture de chaque puits est ensuite aspiré : le précipité de formazan formé au niveau des mitochondries reste dans les cellules. 200  $\mu\text{L}$  de DMSO sont alors ajoutés dans chaque puits pour dissoudre le formazan et obtenir une solution de couleur violette. L'absorbance des puits est mesurée à 570 nm grâce à un lecteur de plaques : plus la viabilité des cellules est bonne, plus on aura formé de formazan et plus la solution sera colorée.

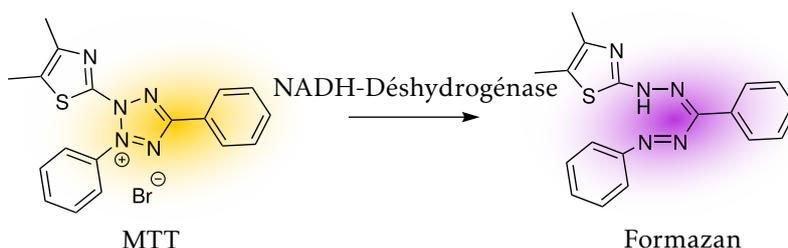


FIGURE II.10 – Réduction du MTT en formazan.

### III.2.b Échantillons étudiés

Peu de détails sont volontairement donnés ici sur la formation des émulsions et leur déstabilisation. Cette étude au complet sera présentée dans le Chapitre III.

Pour ces tests, nous travaillons avec le Miglyol<sup>®</sup> 812, une huile biocompatible. 3 mL de phase aqueuse à pH 3 et  $[\text{NaCl}] = 0,15 \text{ M}$  sont mis au contact durant 24h avec 3 mL d'huile dans laquelle le PDMS<sub>60</sub>-b-PDMAEMA<sub>50</sub> est dissous à 5 mg/mL. A l'issue de ces 24h, le pH de la phase aqueuse a augmenté et vaut environ 8. Les deux phases sont émulsifiées à l'Ultra Turrax<sup>®</sup> durant 40 s. L'émulsion obtenue est multiple E/H/E, comme attesté par une observation en microscopie optique.

Les émulsions sont ensuite divisées en deux : une partie est laissée telle quelle, l'autre partie de l'émulsion est laissée crémier, puis la phase aqueuse sous-nageante est prélevée et remplacée par une phase aqueuse de même concentration en NaCl mais de pH 1. Après une légère agitation manuelle, l'émulsion devient directe.

Chacune de ces deux émulsions filles est diluée 5 fois et 50 fois dans du milieu de culture. Au préalable il a été vérifié que la dilution de nos émulsions dans le milieu de culture ne conduisait

pas à une déstabilisation des émulsions. A titre indicatif, après l'ingestion d'une gorgée d'émulsion, celle-ci sera diluée dans 30 à 40 mL de liquide digestif dans l'estomac à jeun, et maximum 1 L lors d'un repas. Elle sera donc diluée entre 2 et 200 fois approximativement, ce qui correspond aux taux de dilution testés.

Lors des tests de cytotoxicité, 100  $\mu$ L de milieu de culture et 100  $\mu$ L d'échantillon sont introduits dans chaque puits, ce qui double encore le taux de dilution. Six échantillons d'émulsions sont ainsi testés : l'émulsion double E/H/E diluée 2, 10 et 100 fois et la même émulsion déstabilisée en émulsion directe avec les mêmes taux de dilution. Les phases aqueuses à pH 1 et pH 8, [NaCl]=0,15 M, diluées 2 et 10 fois, sont testées comme contrôle. Enfin, le Triton<sup>TM</sup> X100 (TX 100), qui perméabilise les membranes<sup>36,37</sup> et conduit à la mort cellulaire, est utilisé comme contrôle à 0,1 % massique dans l'eau pour s'assurer que nous sommes bien dans des conditions où l'on est capable de tuer les cellules.

Toutes les mesures de viabilité cellulaires seront effectuées par rapport à une référence constituée par les cellules mises au contact avec 200  $\mu$ L de milieu de culture sans ajout d'échantillon (conditions pour lesquelles la viabilité sera maximale).

Pour chacune des conditions énoncées, six puits sont traités de façon identique pour améliorer la fiabilité des résultats. Les six puits de référence sont présents sur chaque plaque.

### III.2.c Résultats des tests de cytotoxicité

Ainsi qu'il est mentionné plus haut, l'estimation de la viabilité cellulaire s'effectue par mesure d'absorbance : plus celle-ci est élevée, plus la viabilité des cellules sera importante. Ces mesures s'effectuent en pourcentage par rapport au contrôle, c'est-à-dire par rapport à la valeur d'absorbance obtenue pour les cellules qui n'ont été en contact qu'avec du milieu de culture cellulaire. Pour chaque échantillon, la moyenne des absorbances mesurées sur les six puits est calculée, puis le pourcentage de viabilité est calculé en faisant le rapport entre cette absorbance moyenne et l'absorbance moyenne obtenue pour les six puits de contrôle.

Les résultats sont présentés à la FIGURE II.11, les barres bleues représentant les pH autour de 8 et les barres roses les pH acides.

**Émulsions E/H/E** Pour les émulsions E/H/E non déstabilisées, dont la phase aqueuse externe est à un pH d'environ 8, toutes les valeurs de viabilité cellulaire obtenues pour nos échantillons sont supérieures à 70% (cf FIGURE II.11, échantillon 2). Elles ne sont pas significativement différentes de la viabilité obtenue pour la phase aqueuse à pH 8 et 0,15 M de NaCl (échantillon 1).

**Émulsions E/H/E déstabilisées en émulsions H/E** Pour les émulsions E/H/E mises au contact d'une phase aqueuse pH 1 et déstabilisées en émulsions directes, la viabilité cellulaire est autour de 10% pour l'échantillon le plus concentré et dépasse 70% pour les autres (cf FIGURE II.11, échantillon 4). On constate cependant que la mortalité observée n'est pas due au polymère, mais au pH trop acide de la solution en contact avec les cellules : en effet l'échantillon 3, qui ne contient pas de polymère, conduit lui aussi à une baisse significative de la viabilité cellulaire, tandis que l'on retrouve une viabilité élevée dès que les échantillons sont plus dilués et que le pH est plus élevé (pH 2 pour 4' et 3 pour 4''). Le pH de l'intestin étant légèrement basique, cela est cohérent avec la viabilité faible des cellules dans des conditions de pH bas.

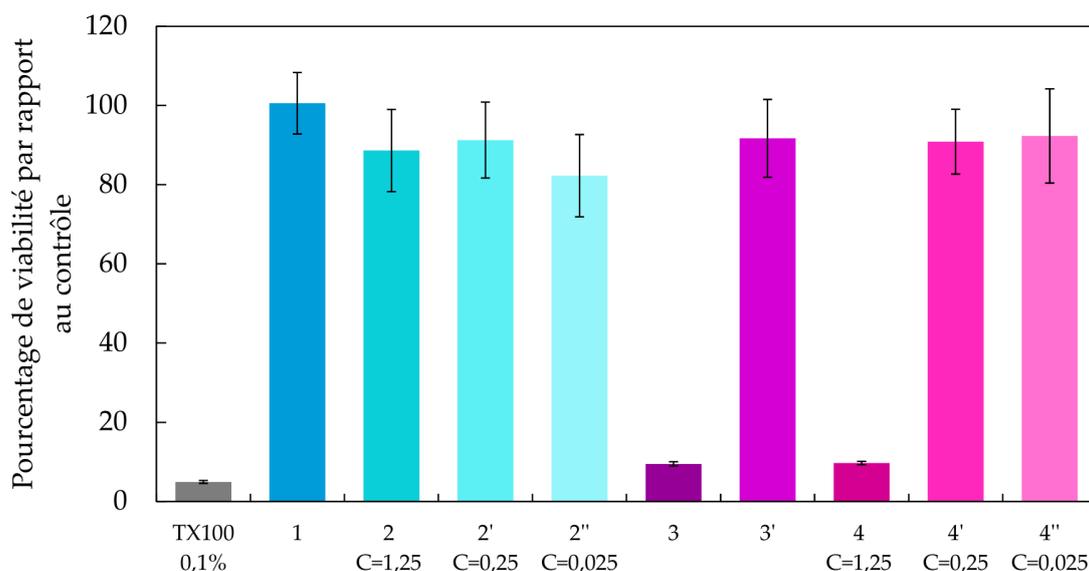


FIGURE II.11 – Résultats de cytotoxicité obtenus sur des cocultures Caco-2/HT29-MTX : 1 : phase aqueuse pH 8, [NaCl]=0,15 M - 2 : émulsions doubles E/H/E à pH 8 - 3 : phase aqueuse pH 1, [NaCl]=0,15 M - 4 : émulsions doubles déstabilisées en émulsions simples par mise au contact avec une phase aqueuse à pH 1. Taux de dilution : sans marque, diluées 2 fois - primées, diluées 10 fois - double primées, diluées 100 fois. C représente la concentration de PDMS<sub>60</sub>-b-PDMAEMA<sub>50</sub> introduite dans chaque échantillon (mg/mL).

### III.2.d Conclusion

Avec ces tests de cytotoxicité sur coculture de cellules Caco-2 et HT29-MTX, nous avons démontré qu'il n'existe pas d'IC<sub>50</sub> pour le polymère PDMS<sub>60</sub>-b-PDMAEMA<sub>50</sub> formulé en émulsion avec du Miglyol® 812, dans les conditions de concentrations étudiées. L'état du polymère après passage de l'émulsion par un milieu acide comme c'est le cas dans l'estomac n'engendre en outre pas de toxicité supplémentaire.

Ces résultats nous confirment qu'il est raisonnable d'utiliser ce polymère pour développer des systèmes à libération contrôlée de molécules au niveau de l'estomac humain.

#### A RETENIR DE CE CHAPITRE :

- Une famille de copolymère PDMS-*b*-PDMAEMA a été synthétisée en deux étapes.
- Des émulsions stabilisées par le copolymère PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub> n'ont pas montré de toxicité sur une coculture cellulaire Caco-2/HT29-MTX mimant la paroi intestinale ⇒ utilisation possible pour des applications à l'homme.

## Bibliographie

- [1] Fontanielle, M.; Vairon, J.-P. *Polymérisation*; Techniques de l'ingénieur, 2009; Vol. Ref AM3040 v1.
- [2] Guyot, A. *Polymérisation*; Techniques de l'ingénieur, 2000; Vol. Ref J5830 v1.
- [3] Matyjaszewski, K. *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*; John Wiley & Sons, Ltd, 2012.
- [4] Hamaide, T. *Polymérisations en chaîne - Mécanismes*, techniques de l'ingénieur ed.; 2017; Vol. Ref J5830 v2.
- [5] Matyjaszewski, K.; Xia, J. Atom Transfer Radical Polymerization. *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 2921–2990.
- [6] Matyjaszewski, K. Introduction to Living Polymeriz. Living and/or Controlled Polymerization. *Journal of Physical Organic Chemistry* **1995**, *8*, 197–207.
- [7] Matyjaszewski, K. The Synthesis of Functional Star Copolymers as an Illustration of the Importance of Controlling Polymer Structures in the Design of New Materials. *Polymer International* **2003**, *52*, 1559–1565.
- [8] Matyjaszewski, K. Radical Nature of Cu-Catalyzed Controlled Radical Polymerizations (Atom Transfer Radical Polymerization). *Macromolecules* **1998**, *31*, 4710–4717.
- [9] Luo, Z.-h.; He, T.-y. Synthesis and Characterization of Poly(Dimethylsiloxane)-Block-Poly(2,2,3,3,4,4,4-Heptafluorobutyl Methacrylate) Diblock Copolymers with Low Surface Energy Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization. *Reactive and Functional Polymers* **2008**, *68*, 931–942.
- [10] Protat, M. Formation d'émulsions multiples stimulables en une seule étape d'émulsification : effet du sel et évolution vers des architectures biocompatibles. Ph.D. thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, 2016.
- [11] Fischer, D.; Li, Y.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Kissel, T. In Vitro Cytotoxicity Testing of Polycations : Influence of Polymer Structure on Cell Viability and Hemolysis. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1121–1131.
- [12] Monnery, B. D.; Wright, M.; Cavill, R.; Hoogenboom, R.; Shaunak, S.; Steinke, J. H.; Thanou, M. Cytotoxicity of Polycations : Relationship of Molecular Weight and the Hydrolytic Theory of the Mechanism of Toxicity. *International Journal of Pharmaceutics* **2017**, *521*, 249–258.
- [13] Agarwal, S.; Zhang, Y.; Maji, S.; Greiner, A. PDMAEMA Based Gene Delivery Materials. *Materials Today* **2012**, *15*, 388–393.
- [14] van de Wetering, P.; Cherng, J.-Y.; Talsma, H.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. 2-(Dimethylamino)Ethyl Methacrylate Based (Co)Polymers as Gene Transfer Agents. *Journal of Controlled Release* **1998**, *53*, 145–153.
- [15] Layman, J. M.; Ramirez, S. M.; Green, M. D.; Long, T. E. Influence of Polycation Molecular Weight on Poly(2-Dimethylaminoethyl Methacrylate)-Mediated DNA Delivery In Vitro. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1244–1252.
- [16] Rawlinson, L.-A. B.; Ryan, S. M.; Mantovani, G.; Syrett, J. A.; Haddleton, D. M.; Brayden, D. J. Antibacterial Effects of Poly(2-(Dimethylamino Ethyl)Methacrylate) against Selected Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 443–453.
- [17] Keely, S.; Rullay, A.; Wilson, C.; Carmichael, A.; Carrington, S.; Corfield, A.; Haddleton, D. M.; Brayden, D. J. In Vitro and Ex Vivo Intestinal Tissue Models to Measure Mucoadhesion of Poly (Methacrylate) and N-Trimethylated Chitosan Polymers. *Pharmaceutical Research* **2005**, *22*, 38–49.
- [18] Rawlinson, L.-A. B.; O'Brien, P. J.; Brayden, D. J. High Content Analysis of Cytotoxic Effects of pDMAEMA on Human Intestinal Epithelial and Monocyte Cultures. *Journal of Controlled Release* **2010**, *146*, 84–92.
- [19] Moreau, E.; Domurado, M.; Chapon, P.; Vert, M.; Domurado, D. Biocompatibility of Polycations : In Vitro Agglutination and Lysis of Red Blood Cells And In Vivo Toxicity. *Journal of Drug Targeting* **2002**, *10*, 161–173.

- [20] Lee, D. S. ; Kim, S. J. ; Kwon, E. B. ; Park, C. W. ; Jun, S. M. ; Choi, B. ; Kim, S. W. Comparison of in Vivo Biocompatibilities between Parylene-C and Polydimethylsiloxane for Implantable Microelectronic Devices. *Bulletin of Materials Science* **2013**, *36*, 1127–1132.
- [21] Liu, L. ; Sheardown, H. Glucose Permeable Poly (Dimethyl Siloxane) Poly (N-Isopropyl Acrylamide) Interpenetrating Networks as Ophthalmic Biomaterials. *Biomaterials* **2005**, *26*, 233–244.
- [22] Bélanger, M. ; Marois, Y. Hemocompatibility, Biocompatibility, Inflammatory and in Vivo Studies of Primary Reference Materials Low-Density Polyethylene and Polydimethylsiloxane : A Review. *Journal of Biomedical Materials Research* **2001**, *58*, 467–477.
- [23] Bordenave, L. ; Bareille, R. ; Lefebvre, F. ; Caix, J. ; Baquey, C. H. Cytocompatibility Study of NHLBI Primary Reference Materials Using Human Endothelial Cells. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1992**, *3*, 509–516.
- [24] Ertel, S. I. ; Ratner, B. D. ; Kaul, A. ; Schway, M. B. ; Horbett, T. A. In Vitro Study of the Intrinsic Toxicity of Synthetic Surfaces to Cells. *Journal of Biomedical Materials Research* **1994**, *28*, 667–675.
- [25] Spilizewski, K. L. ; Marchant, R. E. ; Anderson, J. M. ; Hiltner, A. In Vivo Leucocyte Interactions with the NHLBI-DTB Primary Reference Materials : Polyethylene and Silica-Free Polydimethylsiloxane. *Biomaterials* **1987**, *8*, 12–17.
- [26] Bélanger, M.-C. ; Marois, Y. ; Roy, R. ; Mehri, Y. ; Wagner, E. ; Zhang, Z. ; King, M. W. ; Yang, M. ; Hahn, C. ; Guidoin, R. Selection of a Polyurethane Membrane for the Manufacture of Ventricles for a Totally Implantable Artificial Heart : Blood Compatibility and Biocompatibility Studies. *Artificial Organs* **2000**, *24*, 879–888.
- [27] Jung Kim, H. ; Huh, D. ; Hamilton, G. ; E. Ingber, D. Human Gut-on-a-Chip Inhabited by Microbial Flora That Experiences Intestinal Peristalsis-like Motions and Flow. *Lab on a Chip* **2012**, *12*, 2165–2174.
- [28] Fisichella, M. ; Berenguer, F. ; Steinmetz, G. ; Auffan, M. ; Rose, J. ; Prat, O. Intestinal Toxicity Evaluation of TiO<sub>2</sub> Degraded Surface-Treated Nanoparticles : A Combined Physico-Chemical and Toxicogenomics Approach in Caco-2 Cells. *Particle and Fibre Toxicology* **2012**, *9*, 18.
- [29] Car, A. ; Baumann, P. ; Duskey, J. T. ; Chami, M. ; Bruns, N. ; Meier, W. pH-Responsive PDMS-b-PDMAEMA Micelles for Intracellular Anticancer Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 3235–3245.
- [30] Sambuy, Y. ; Angelis, I. D. ; Ranaldi, G. ; Scarino, M. L. ; Stammati, A. ; Zucco, F. The Caco-2 Cell Line as a Model of the Intestinal Barrier : Influence of Cell and Culture-Related Factors on Caco-2 Cell Functional Characteristics. *Cell Biology and Toxicology* **2005**, *21*, 1–26.
- [31] Béduneau, A. ; Tempesta, C. ; Fimbel, S. ; Pellequer, Y. ; Jannin, V. ; Demarne, F. ; Lamprecht, A. A Tunable Caco-2/HT29-MTX Co-Culture Model Mimicking Variable Permeabilities of the Human Intestine Obtained by an Original Seeding Procedure. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2014**, *87*, 290–298.
- [32] Lesuffleur, T. ; Barbat, A. ; Dussaulx, E. ; Zweibaum, A. Growth Adaptation to Methotrexate of HT-29 Human Colon Carcinoma Cells Is Associated with Their Ability to Differentiate into Columnar Absorptive and Mucus-Secreting Cells. *Cancer Research* **1990**, *50*, 6334–6343.
- [33] Antoine, D. ; Pellequer, Y. ; Tempesta, C. ; Lorscheidt, S. ; Kettel, B. ; Tamaddon, L. ; Jannin, V. ; Demarne, F. ; Lamprecht, A. ; Béduneau, A. Biorelevant Media Resistant Co-Culture Model Mimicking Permeability of Human Intestine. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *481*, 27–36.
- [34] Pagliacci, M. C. ; Spinozzi, F. ; Migliorati, G. ; Fumi, G. ; Smacchia, M. ; Grignani, F. ; Riccardi, C. ; Nicoletti, I. Genistein Inhibits Tumour Cell Growth in Vitro but Enhances Mitochondrial Reduction of Tetrazolium Salts : A Further Pitfall in the Use of the MTT Assay for Evaluating Cell Growth and Survival. *European Journal of Cancer* **1993**, *29*, 1573–1577.
- [35] Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- [36] Koley, D. ; Bard, A. J. Triton X-100 Concentration Effects on Membrane Permeability of a Single HeLa Cell by Scanning Electrochemical Microscopy (SECM). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 16783–16787.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- [37] Kim, K.-P.; Loessner, M. J. Enterobacter Sakazakii Invasion in Human Intestinal Caco-2 Cells Requires the Host Cell Cytoskeleton and Is Enhanced by Disruption of Tight Junction. *Infection and Immunity* **2008**, *76*, 562–570.

## Chapitre III

# Formation par voie mécanique d'émulsions stabilisées par des copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA - Encapsulation et relargage d'une molécule modèle, le saccharose

### Sommaire

---

<b>I</b>	<b>Formation de différents types d'émulsions stabilisées par des copolymères PDMS-<i>b</i>-PDMAEMA</b>	<b>77</b>
I.1	Protocoles de formation et d'étude des émulsions	78
I.1.a	Formation des émulsions à l'Ultra-Turrax®	78
I.1.b	Observation des émulsions	79
I.1.c	Vieillessement des émulsions	79
I.1.d	Caractérisations physico-chimiques des phases non émulsifiées	80
	Mesures de tensions interfaciales	80
	Mesures de diffusion de la lumière (DLS)	81
	Mesures de cryo-microscopie électronique en transmission (cryo-MET)	82
I.2	Diagrammes d'émulsions	82
I.2.a	Émulsions formées sans polymère	84
I.2.b	Émulsions stabilisées par le COPO <b>60b50</b>	85
	Rationalisation des diagrammes d'émulsions	89
	Mesures de tensions interfaciales	91
	Partitionnement du copolymère - Mesures de DLS	92
	Conclusions	95
I.2.c	Émulsions stabilisées par le COPO <b>60b265</b>	96
I.2.d	Émulsions stabilisées par le COPO <b>104b89</b>	98

I.2.e	Conclusions . . . . .	100
<b>II</b>	<b>Déstabilisation des émulsions multiples E/H/E . . . . .</b>	<b>102</b>
II.1	Déstabilisation par prélèvement de la phase aqueuse sous-nageante . . . . .	103
II.2	Déstabilisation par dialyse . . . . .	105
II.3	Conclusions . . . . .	108
<b>III</b>	<b>Encapsulation d'une molécule modèle, le saccharose . . . . .</b>	<b>108</b>
III.1	Émulsions chargées en saccharose . . . . .	108
III.1.a	Méthode de formation des émulsions chargées en saccharose . . . . .	108
III.1.b	Émulsions obtenues en présence de saccharose . . . . .	108
	Variation de la concentration en saccharose . . . . .	108
	Variation de la concentration en NaCl . . . . .	110
	Conclusions . . . . .	110
III.2	Encapsulation et relargage de saccharose . . . . .	112
III.2.a	Détection du saccharose . . . . .	112
III.2.b	Lavage de la phase aqueuse externe de l'émulsion . . . . .	113
	Évolution de la morphologie des émulsions au cours des lavages . . . . .	113
III.2.c	Relargage du saccharose . . . . .	115
	Étude de l'hypothèse de la <i>fuite</i> du saccharose . . . . .	117
	Étude de l'hypothèse de l'interaction du saccharose avec l'interface . . . . .	120
III.3	Conclusions . . . . .	122

---

## I Formation de différents types d'émulsions stabilisées par des copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA

Nous avons vu en partie introductive que le PDMAEMA est un polymère multi-stimulable, sensible au pH et à la force ionique par son groupement amine, ainsi qu'à la température de par sa capacité à former des liaisons H qui sont rompues à haute température. Nous utiliserons cette propriété pour former différents types d'émulsions stabilisées par ces copolymères, en jouant sur les différents paramètres physico-chimiques. Plus précisément, nous ferons varier ici uniquement le pH et la force ionique de la phase aqueuse, laissant la température de côté. En effet, Marine Protat a montré dans sa thèse<sup>1</sup> que la température à partir de laquelle un effet est observé sur les émulsions était autour de 60°C, ce qui ne nous semble pas une température pertinente pour mettre au point des applications pour le vivant.

Nous étudierons les émulsions formées avec deux huiles différentes, le Miglyol<sup>®</sup> 812 et le myristate d'isopropyle.

La première huile est composée principalement d'un mélange de triglycérides capryliques et capriques, c'est-à-dire de triglycérides portant des chaînes carbonées C<sub>8</sub> et C<sub>10</sub>. Les chaînes les plus courtes (capryliques) sont en excès, constituant 50 à 65% du mélange, les chaînes les plus longues (capriques) représentant quant à elles 30 à 45% du mélange. On y trouve également une petite quantité de chaînes plus courtes et plus longues, et une faible proportion d'acides gras libres. Le Miglyol<sup>®</sup> 812 entre dans la formulation de nombreuses crèmes hydratantes<sup>2</sup>, anti-rides<sup>3</sup> ou encore démaquillants<sup>4</sup>. C'est une huile trente fois plus visqueuse que l'eau.

Le myristate d'isopropyle est un ester en C<sub>14</sub> qui est largement utilisé en cosmétique comme agent huileux non gras et entre dans la formulation de nombreux produits hydratants à application cutanée<sup>5-7</sup>. La viscosité du myristate d'isopropyle est plus faible que celle du Miglyol<sup>®</sup> 812, elle vaut 5 mPa.s à 20°C.

Bien que de façon plus marginale, on trouve aussi des applications pour lesquelles ces huiles sont utilisées comme composant d'une émulsion destinée à la voie orale<sup>8-11</sup>. Elles sont autorisées par l'EFSA (*European Food and Safety Authority*) et considérées comme GRAS (*Generally Recognized as Safe*) par la FDA (*Food Drug Administration*) américaine<sup>10</sup>.

Ces deux huiles sont représentées sur la FIGURE III.1.

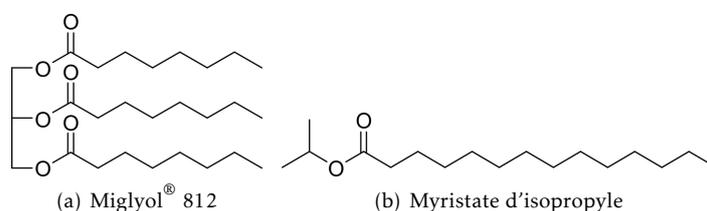


FIGURE III.1 – Représentation des huiles utilisées pour former nos émulsions.

En premier lieu, nous présenterons le mode opératoire nous permettant d'obtenir nos émulsions, puis nous verrons les types d'émulsions obtenus en fonction du pH et de la force ionique pour différents polymères. Enfin, nous étudierons la stabilité et l'évolution au cours du temps des émulsions formées.

## I.1 Protocoles de formation et d'étude des émulsions

### I.1.a Formation des émulsions à l'Ultra-Turrax®

De façon à pouvoir comparer au mieux les résultats obtenus, le protocole de formation des émulsions utilisé est identique au protocole développé par Lucie Besnard et Marine Protat<sup>12,13</sup> qui a permis l'obtention d'émulsions doubles stables. Il n'a pas été modifié.

Les émulsions sont toutes composées d'une phase huile dans laquelle le copolymère PDMS-*b*-PDMAEMA est dissous à 5 mg/mL, ainsi que d'une phase aqueuse dont le pH est modifié par ajout d'acide chlorhydrique (HCl) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH), et dont la force ionique est ajustée grâce à l'ajout de chlorure de sodium (NaCl). Les volumes d'eau et d'huile sont identiques, 3 mL pour chaque phase. Dans un premier temps, les deux phases sont mises au contact durant 24 h. Pour cela, la phase huile est déposée doucement à la pipette sur la phase aqueuse en prenant garde à ne pas créer de gouttes, directement dans le pilulier en verre dans lequel les deux phases seront émulsifiées.

Ces 24 h de mise au contact vont permettre au copolymère, initialement en phase huile mais ayant une affinité pour la phase aqueuse, de passer partiellement dans l'eau. Durant ces 24 h, il peut également y avoir une évolution du pH de la phase aqueuse. En effet, le copolymère est capable de capter des protons dans l'eau, ce qui conduit à une augmentation du pH. Le pH reporté sur les diagrammes d'émulsions est le pH remesuré après les 24 h de mise au contact des deux phases et avant émulsification.

La durée de 24 h a été établie par Marine Protat et Lucie Besnard comme suffisante pour que le partitionnement du copolymère entre les deux phases ait atteint son équilibre. Cette durée a été évaluée grâce au suivi de la concentration en copolymère en phase aqueuse par spectroscopie UV-visible, grâce au styrène qui absorbe à 254 nm<sup>14</sup>. Dans notre cas, nous n'avons pas de moyen simple de savoir si l'équilibre de partitionnement est atteint (et nous verrons par la suite qu'il ne l'est probablement pas toujours), nous avons cependant respecté cette durée de mise au contact préalable à l'émulsification pour tous nos échantillons.

A l'issue des 24 h de mise au contact, les deux phases sont émulsifiées à l'Ultra-Turrax® T10 (Ika®) muni d'un outil de dispersion fine S10N-8G. L'Ultra-Turrax® est un système rotor-stator couramment utilisé en formulation, qui permet de cisailer les deux liquides pour former des gouttelettes. L'émulsification se fait à 30 000 tours/min et dure 40 s.

Après émulsification, le pH de la phase aqueuse est mesuré dans la phase sous-nageante de l'émulsion (si on est en présence d'une émulsion à phase eau continue) pour obtenir la valeur de pH stable aux temps longs, c'est-à-dire le pH d'équilibre. C'est ce pH qui apparaît sur les diagrammes d'émulsions **vieillies**.

Pour résumer, trois valeurs de pH distinctes seront utilisées et discutées dans la suite de ce manuscrit : le pH de préparation de la phase aqueuse ou **pH initial**, le **pH après 24 h** de mise au contact avec la phase huile avant émulsification, et le **pH d'équilibre** mesuré aux temps longs sur la phase sous-nageante de l'émulsion.

Des émulsions de référence ont été réalisées en suivant le même protocole mais en l'absence de copolymère en phase huile.

### I.1.b Observation des émulsions

La quasi-totalité de nos observations est effectuée en microscopie confocale. Cette technique de microscopie a l'avantage de permettre la focalisation sur un plan unique avec une profondeur de champ d'environ 400 nm, et ainsi l'observation nette d'une émulsion même concentrée. La microscopie optique non confocale nécessite quant à elle de diluer les émulsions pour pouvoir observer des gouttes. Cette dilution, effectuée dans une eau de même pH et de même concentration en NaCl que l'émulsion pour les émulsions à phase eau continue et dans l'huile pour les émulsions à phase huile continue, présente le risque de déstabiliser ou de modifier la morphologie de l'émulsion considérée. Suite à un dysfonctionnement du microscope confocal au tout début du travail, les premières émulsions ont cependant été étudiées en microscopie optique classique.

De façon à pouvoir observer nos émulsions en microscopie confocale, un colorant insoluble dans l'eau, le Rouge Nil, est introduit en phase huile préalablement à l'émulsification, ce même pour des émulsions qui ont été au tout début observées en microscopie optique. L'observation se fait dans une cellule en quartz de 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur qui peut contenir 150  $\mu\text{L}$  d'émulsion. L'utilisation d'une telle cellule permet d'éviter aux gouttes d'être contraintes et éventuellement déstabilisées par le cisaillement et la pression qui seraient imposés par une lamelle déposée sur une lame de microscope. 150  $\mu\text{L}$  d'émulsion sont prélevés à la pipette pour chaque observation, directement dans le pilulier où est stockée l'émulsion.

Le type d'émulsion est déterminé en microscopie confocale sur un appareil Olympus<sup>®</sup> Fluoview FV1000. Grâce à la fluorescence du Rouge Nil excité par un LASER multi-argon à 488 nm, il est possible de distinguer la phase huile (colorée) de la phase aqueuse qui apparaît noire. Sur les images qui suivront, pour assurer un meilleur contraste, la phase huile apparaîtra colorée en bleu et non en rouge, cette coloration étant purement artificielle.

### I.1.c Vieillessement des émulsions

Après formation et observation, les émulsions sont stockées à température ambiante et à l'abri de la lumière et leur évolution est observée de façon régulière en microscopie confocale jusqu'à déstabilisation. Pour certains échantillons, l'évolution de la taille des gouttes au cours du temps est mesurée grâce à un programme de détection des contours des gouttes réalisé sur MatLab par Jean-Baptiste Thomazo (Laboratoire Jean Perrin, Sorbonne-Universités).

Ce programme a été développé car les fonctions de détection de contour classiquement proposées par le logiciel ImageJ ne permettent pas de détecter simplement les globules car ceux-ci sont très proches les uns des autres, et il est également très difficile de détecter les gouttelettes internes qui ont un contraste identique au fond de l'image.

Ce programme développé sur Matlab renvoie dans deux fichiers séparés les diamètres des globules d'huile et des gouttelettes d'eau internes et génère en outre une image sur laquelle sont représentés les contours détectés, permettant de s'assurer de la véracité des informations recueillies. La FIGURE III.2 donne un exemple de ce traitement d'image.

Les études de tailles de gouttes sont réalisées sur au moins deux images de microscopie confocale, le nombre de gouttes utilisées pour le calcul du diamètre moyen étant dans la grande majorité des cas supérieur à 200, sauf pour les émulsions présentant des tailles de globules très importantes.

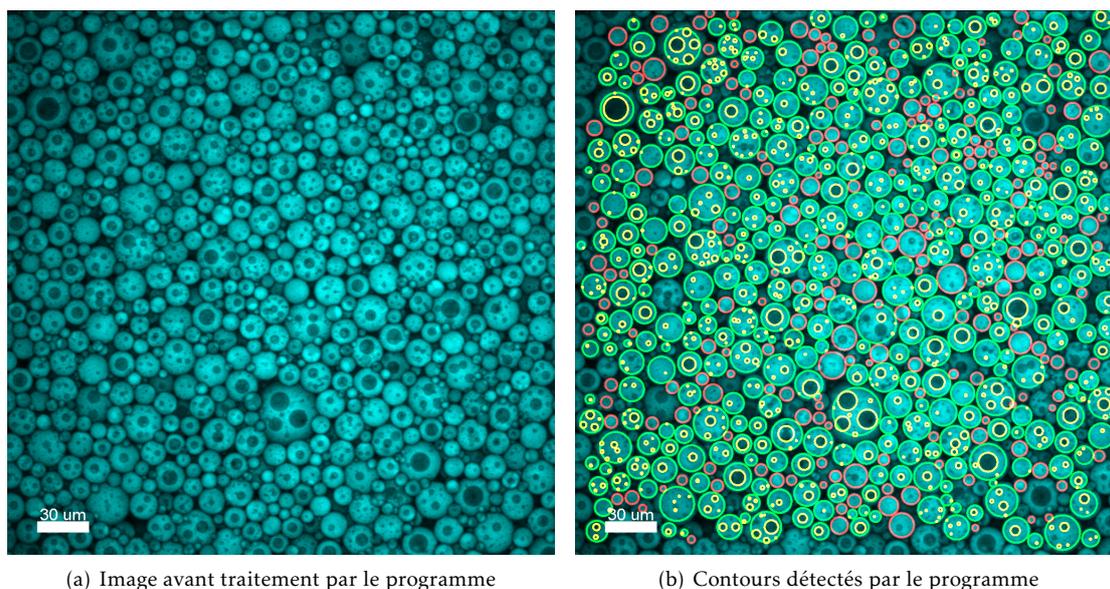


FIGURE III.2 – Exemple de détection de contours de gouttes sur une image d'émulsion typique. Les contours en vert représentent les globules d'huile dans lesquelles sont détectés des gouttes d'eau, en rouge les globules d'huile dans lesquels rien n'est détecté, et ceux en jaune les contours des gouttelettes d'eau internes.

Comme on peut le voir sur la FIGURE III.2, le programme ne permet pas la détection de toutes les gouttes. On peut cependant considérer que les gouttes "oubliées" sont représentatives de l'échantillon, on ne discrimine pas uniquement les petites gouttes ou bien les grosses. Malgré tout, les gouttelettes internes sont parfois trop petites pour être détectées car elles ne mesurent que quelques pixels (1 pixel vaut entre 0,3 et 0,5  $\mu\text{m}$  selon les images). La précision des mesures renvoyées par ce programme n'est donc pas excellente, mais elle n'est pas moins bonne que les résultats qu'on obtiendrait par des mesures à la main où il est très difficile de mesurer la totalité des gouttes et où un biais peut facilement être introduit inconsciemment (mesure préférentielle des gouttes les plus grosses par exemple).

Il est à noter que dans le cas de globules dans le diamètre excède 50  $\mu\text{m}$ , la détection est très mauvaise du fait du contour mal défini de ces gouttes. Pour ces quelques échantillons, la mesure est effectuée manuellement.

#### I.1.d Caractérisations physico-chimiques des phases non émulsifiées

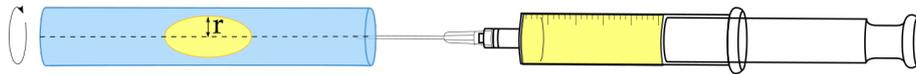
**Mesures de tensions interfaciales** La grande majorité des mesures de tensiométrie sont effectuées par goutte tournante.

Nous travaillons pour ces mesures avec un appareil SVT 20N de Data Physics muni d'un capillaire cylindrique en quartz thermostaté à 20°C, mesurant 500  $\mu\text{m}$  de diamètre et 11 cm de long. Les densités des huiles et des phases aqueuses à différentes concentrations en sel ont été déterminées à l'aide d'un densitomètre DMA<sup>TM</sup> 4500 Anton Paar, également thermostaté à 20°C.

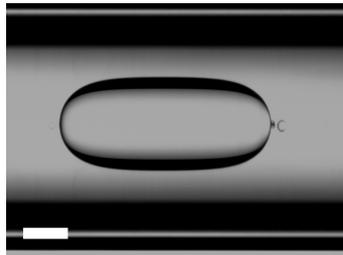
Le capillaire est rempli de la phase la plus dense, l'eau ici. Celui-ci est mis en rotation sur son axe, et une goutte de la phase la moins dense, l'huile ici, est introduite à l'aide d'une seringue. La goutte ainsi formée s'allonge du fait de la rotation du capillaire (cf FIGURE III.3). Si elle est

suffisamment allongée, il est possible de remonter à la valeur de la tension interfaciale  $\gamma$  qui s'exprime en fonction de la vitesse de rotation du capillaire  $\omega$ , du rayon  $r$  de la section verticale de la goutte et de la différence des masses volumiques  $\Delta\rho$  selon l'équation de Vonnegut<sup>15</sup> :

$$\gamma = \frac{\omega^2 \Delta\rho r^3}{4}$$



(a) Schéma de principe de la mesure de tensions interfaciales par la méthode de la goutte tournante



(b) Type d'images obtenues et étudiées. La barre d'échelle représente 100  $\mu\text{m}$ .

FIGURE III.3 – Tensiométrie à goutte tournante.

Le logiciel lié à l'appareil permet de détecter les contours de la goutte introduite et réalise trois ajustements basés sur différentes méthodes de calcul. Les valeurs de tension retenues résultent de la moyenne de deux de ces valeurs, issues des travaux de Laplace et Young<sup>16</sup> et de Cayias, Schechter et Wade<sup>17</sup>.

Les échantillons utilisés pour réaliser ces mesures sont préparés comme suit : 2,4 mL de phase aqueuse et le même volume d'huile contenant le copolymère à 5 mg/mL sont mis au contact durant 24 h. Chaque phase est ensuite prélevée séparément : la phase aqueuse est utilisée pour remplir le capillaire, la phase huile est prélevée à la seringue et une goutte en est injectée dans le capillaire en rotation pour faire la mesure. Une mesure est réalisée chaque seconde. La tension interfaciale met un certain temps à atteindre l'équilibre, de l'ordre de la dizaine de minutes à une heure, du fait de la diffusion lente du copolymère vers l'interface, et du temps nécessaire à l'adoption de sa conformation d'équilibre. Les mesures ont été stoppées quand la variation de tension était inférieure à 0,05 mN/m pendant plus de 30 s.

Les mesures de tension interfaciale entre l'eau milliQ et les huiles en l'absence de copolymère ont été mesurées par tensiométrie à goutte montante sur un appareil Teclis.

**Mesures de diffusion de la lumière (DLS)** 1,5 mL de phase aqueuse filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$  est mis au contact durant 24h avec 1,5 mL de phase huile contenant le copolymère à 5 mg/mL. Les phases huiles myristate d'isopropyle ont également été filtrées à 0,22  $\mu\text{m}$  ; mais pas les phases Miglyol<sup>®</sup> 812, trop visqueuses. Durant ces 24 h, le polymère est susceptible de s'auto-assembler en phase huile pour former des micelles, *a priori* gonflées d'eau, mais également de passer en phase aqueuse et d'y former là aussi des édifices auto-assemblés. Des mesures de diffusion dynamique de la

lumière (*Dynamic Light Scattering* ou DLS) sont susceptibles de donner des informations sur la présence de ce type d'objets dans chaque phase ainsi que sur leurs tailles.

Les mesures de diffusion sont effectuées dans chaque phase à l'issue des 24 h de mise au contact avec un granulomètre Cordouan Vasco Flex<sup>TM</sup> muni d'une tête de mesure *in situ* qui évite d'avoir à prélever chaque phase séparément pour réaliser la mesure. L'échantillon est éclairé par un LASER de longueur d'onde 658 nm et le signal rétrodiffusé est mesuré à 170°. Le corrélogramme en intensité est récupéré, et une courbe exponentielle est ensuite ajustée aux données expérimentales pour déterminer la ou les tailles correspondant au signal mesuré. Il est à noter qu'avec ces mesures, nous n'avons aucune information concernant la concentration en objets dans chaque phase puisque les corrélogrammes sont malheureusement normalisés directement par l'appareil.

**Mesures de cryo-microscopie électronique en transmission (cryo-MET)** 1 mL de phase aqueuse est mis au contact durant 24 h avec 1 mL de myristate d'isopropyle contenant le copolymère à 5 mg/mL. Les deux phases sont ensuite prélevées ; filtrées à 0,22 µm et utilisées pour préparer les grilles.

Pour les échantillons aqueux, les grilles Quantifoil R2/2 recouvertes d'un film de carbone sont d'abord rincées à l'acétate d'éthyle puis exposées à un rayonnement plasma pour les nettoyer et améliorer le mouillage de l'eau. Les grilles sont ensuite préparées à l'aide d'un appareil Vitrobot de Leica. Une goutte d'eau est déposée sur la grille, l'excès de liquide est épongé par pression avec du papier absorbant par la machine, puis la grille est plongée dans l'éthane liquide pour la congélation.

Pour les phases huile, le protocole est similaire mais les grilles ne sont pas exposées au plasma car nous ne souhaitons pas qu'elles soient trop hydrophiles. La congélation est réalisée dans l'éthane liquide ou dans l'azote liquide. L'azote liquide n'est jamais utilisé comme liquide cryogénique pour des échantillons aqueux car il conduit à l'obtention d'eau sous forme cristalline et non vitreuse comme nécessaire. Ce n'est pas le cas pour des phases organiques, et l'utilisation de ce cryogène permet d'éviter que les solvants et huiles ne se solubilisent dans l'éthane<sup>18-21</sup>.

Les grilles sont ensuite observées avec Frédéric Gobeaux (LIONS, CEA) au Laboratoire de Physique du Solide à Orsay, sur un microscope JEOL 2010 FEG utilisé à 200 kV à basse température.

## I.2 Diagrammes d'émulsions

Les diagrammes d'émulsions présentent le type d'émulsion obtenu en fonction de la concentration en NaCl et du pH (pH après 24 h de mise au contact pour les diagrammes juste après émulsification, pH d'équilibre pour les diagrammes d'émulsions vieilles). Les émulsions sont considérées comme directes (H/E) dès lors que plus de la moitié des globules d'huile ne contient pas de gouttelettes d'eau. Elles sont considérées comme multiples E/H/E lorsque plus de la moitié des globules d'huile contient des gouttelettes d'eau. Elles sont considérées comme inverses (E/H) lorsque la phase continue est de l'huile. Nous n'avons jamais observé de multiples H/E/H au cours de cette étude.

Chaque point d'un diagramme représente un échantillon différent. Les émulsions directes sont symbolisées par des carrés bleus, les émulsions inverses par des triangles jaunes, les multiples E/H/E par des disques verts, et les émulsions déstabilisées par des croix rouges. Nous avons

travaillé avec des phases aqueuses de pH initiaux de 1, 3, 6 et 12, et des concentrations en NaCl variant entre 0 et 2 M. Les couleurs en fond de diagramme sont là uniquement pour aider l'œil à repérer les différentes zones, elles sont qualitatives et placées de façon arbitraire. Il peut arriver que l'on observe une coexistence entre deux types d'émulsions, notamment des grandes plages d'émulsion inverse conjointement à des gouttes E/H/E ou H/E (voir un exemple de ce type d'émulsion sur la FIGURE III.4). Ce type d'émulsion sera alors représenté par des zones hachurées.

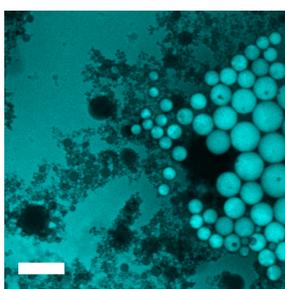


FIGURE III.4 – Exemple d'émulsion pour laquelle on observe conjointement des plages d'émulsion inverse et des gouttes H/E. La barre d'échelle représente 30  $\mu\text{m}$ .

Il est à noter que toutes les zones du diagrammes ne sont pas accessibles : la famille de polymères utilisée pour stabiliser des émulsions est en effet, comme on l'a vu plus haut, capable de capter des protons. Il en résulte une sorte d'effet tampon du copolymère sur la phase aqueuse engendrant un saut de pH : presque toutes les phases aqueuses qui sont initialement à un pH de 3 ou 6 se stabilisent à un pH autour de 8, atteint la plupart du temps à l'issue des 24 h de mise au contact, parfois 24 h après émulsification pour un pH de 3 et des concentrations en NaCl faibles.

Deux émulsions de même concentration en NaCl mais de pH initiaux différents (typiquement 3 et 6) peuvent donc avoir des pH d'équilibre similaires et apparaître très proches sur le diagramme. Elles ne seront pas forcément explicitement différenciées dans la suite, mais il faut prendre en compte que le pH initial étant différent, le polymère ne sera pas dans le même état de charge pour ces deux émulsions après la remontée du pH à 8. Ceci peut expliquer les stabilités et évolutions éventuellement différentes de ces émulsions.

Les émulsions sont observées à intervalles réguliers pour voir leur évolution. Toutes les émulsions crèment ou sédimentent (selon leur type) en quelques heures. Si l'intégrité des gouttes est préservée durant ce phénomène, nous ne considérerons pas cela comme une déstabilisation. Une émulsion est dite déstabilisée lorsque la coalescence a été suffisante pour qu'une couche d'huile devienne visible à la surface des émulsions à phase eau continue, ou une couche d'eau au fond des piluliers pour les émulsions à phase huile continue.

Nous présenterons les diagrammes obtenus pour trois polymères qui présentent des comportements différents :

- Le PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub>, noté COPO **60b50** (rapport  $\frac{\text{hydrophile}}{\text{hydrophobe}} = 0,83$ ), sera le polymère avec lequel seront réalisées la totalité des études de la fin de ce chapitre et des deux suivants ;
- Le PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>265</sub>, noté COPO **60b265** (rapport  $\frac{\text{hydrophile}}{\text{hydrophobe}} = 4,4$ ), présente un long bloc hydrophile ;
- Le PDMS<sub>104</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>89</sub>, noté COPO **104b89** (rapport  $\frac{\text{hydrophile}}{\text{hydrophobe}} = 0,86$ ), est deux fois plus long que le premier polymère pour un rapport  $\frac{\text{hydrophile}}{\text{hydrophobe}}$  similaire.

Les deux autres polymères synthétisés (PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>40</sub> et PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>80</sub>) ont présenté des comportements semblables au COPO 60b50 et ne seront donc pas présentés ici.

### I.2.a Émulsions formées sans polymère

Les huiles utilisées pour former nos émulsions présentent des têtes polaires et de longues chaînes carbonées hydrophobes. Elles sont donc potentiellement à même de stabiliser des émulsions sans ajout d'autre stabilisant. De façon à s'assurer que les émulsions obtenues en présence de copolymère ne sont pas en réalité stabilisées par les huiles, nous avons réalisé des émulsions sans copolymère. Pour la quasi-totalité des échantillons testés, il a été impossible de former des émulsions (démixtion immédiate dès arrêt de l'agitation). Seule une émulsion directe est obtenue pour une phase aqueuse de pH 12 et sans NaCl, pour les deux huiles. Ces émulsions ne sont stables que pendant 24 h. Les résultats sont illustrés sur la FIGURE III.5. Il est à noter que l'on n'observe pas de saut de pH dans ces conditions, ce qui confirme que celui-ci est bien lié à la présence de polymère.

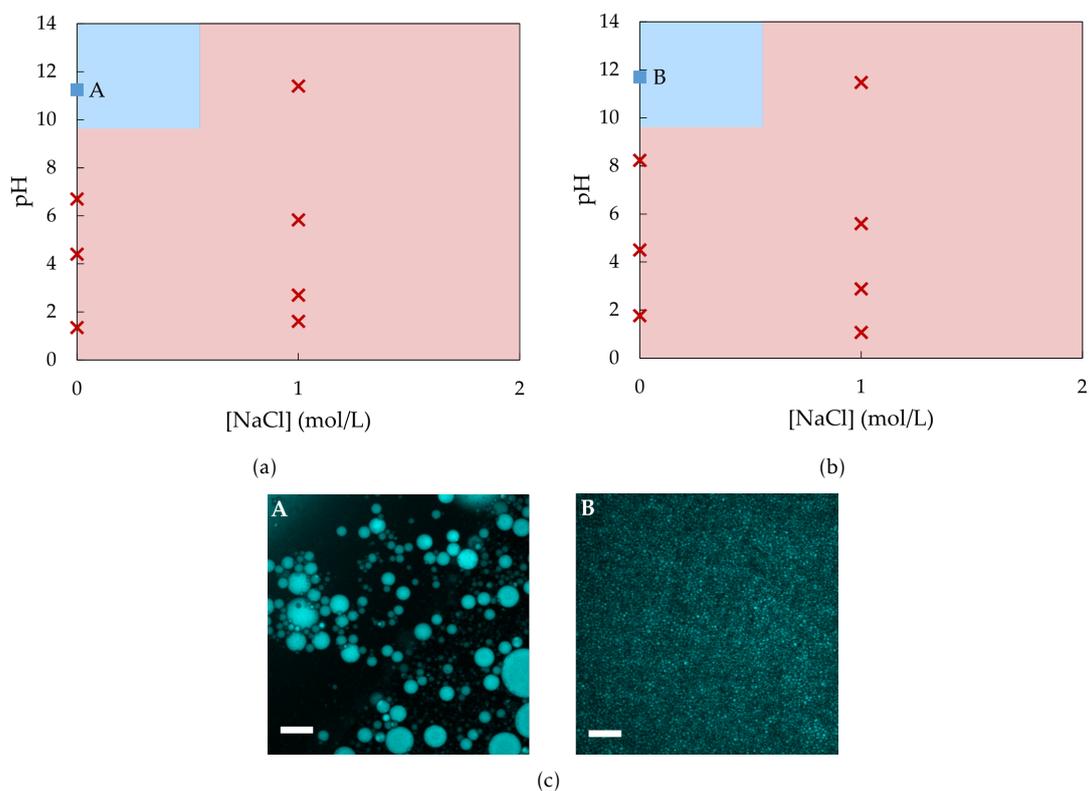


FIGURE III.5 – Diagrammes présentant les types d'émulsions obtenus sans ajout de copolymère PDMS-*b*-PDMAEMA. (a) pour le Miglyol<sup>®</sup> 812 et (b) pour le myristate d'isopropyle, ■ = Émulsion H/E, × = Émulsion instable, (c) : Images de microscopie confocale des émulsions obtenues, A avec le Miglyol<sup>®</sup> 812 et B avec le myristate d'isopropyle. Les barres d'échelle représentent 30 µm.

Malgré les valeurs de pH élevées dans les conditions de formation de ces émulsions, les huiles ne sont pas saponifiées ou très peu. En effet, leurs valeurs de saponification (c'est-à-dire la masse de NaOH en mg à ajouter à 1g d'huile pour en obtenir la saponification complète) sont respectivement

de 330 pour le Miglyol<sup>®</sup> 812<sup>22</sup> et de 210 pour le myristate d'isopropyle<sup>23</sup>. Or, les phases aqueuses contiennent ici moins de 1,4 mg de NaOH par gramme d'huile, ce qui est très en dessous de la valeur de saponification.

### I.2.b Émulsions stabilisées par le COPO 60b50

Les diagrammes des émulsions stabilisées par le COPO 60b50, présentés aux FIGURES III.6 (pour le Miglyol<sup>®</sup> 812) et III.7 (pour le myristate d'isopropyle) sont globalement similaires pour les deux huiles. Trois tendances générales peuvent y être distinguées :

- À pH 1 et/ou à basse concentration en NaCl, des émulsions directes sont observées ;
- À pH et à concentration en sel élevés, des émulsions inverses sont formées ;
- Entre ces deux comportements extrêmes, le copolymère est capable de stabiliser des émulsions doubles E/H/E.

L'évolution des émulsions au cours du temps est présentée aux FIGURES III.8 (Miglyol<sup>®</sup> 812) et III.9 (myristate d'isopropyle).

Les émulsions formées en présence de NaCl dont le pH est de 3 lors de l'émulsification (à l'issue des 24 h de mise au contact des deux phases) ont un pH d'équilibre de 8. Seule l'émulsion formée avec le myristate d'isopropyle à pH 3 sans sel ne subit pas d'augmentation de pH. Le TABLEAU III.1 permet de résumer toutes les variations de pH observées pour ce copolymère.

Huile	pH <sub>initial</sub>	[NaCl] (M)	pH <sub>24h</sub>	pH <sub>équilibre</sub>
Miglyol <sup>®</sup> 812	3	0	3	8
Miglyol <sup>®</sup> 812	3	0,15 à 2	8	8
Myristate d'isopropyle	3	0	3	3
Myristate d'isopropyle	3	0,15 à 0,5	entre 3 et 5	8
Myristate d'isopropyle	3	0,6 à 2	8	8
Les deux	6	0 à 2	8	8

TABLEAU III.1 – Évolution des pH pour les différentes conditions physico-chimiques étudiées. pH<sub>initial</sub> représente le pH de préparation de la phase aqueuse, pH<sub>24h</sub> le pH mesurée avant émulsification, et pH<sub>équilibre</sub> le pH définitif, remesuré après émulsification dans la phase aqueuse sous-nageante de l'émulsion.

Les émulsions inverses obtenues à pH 12 et 2 M en NaCl sont très instables pour les deux huiles et commencent à démixer dès leur formation. La séparation de phase est totale en quelques heures. Les émulsions à pH 1 sont toutes instables et ont complètement démixé en quelques jours. Les émulsions multiples E/H/E sont quant à elles pour la plupart stables sur plus de deux ans, la stabilité étant meilleure pour le Miglyol<sup>®</sup> 812 dans lequel toutes les émulsions doubles restent stables, tandis que les émulsions doubles sans sel formées avec le myristate d'isopropyle se vident de leurs gouttes internes pour donner à terme des émulsions directes.

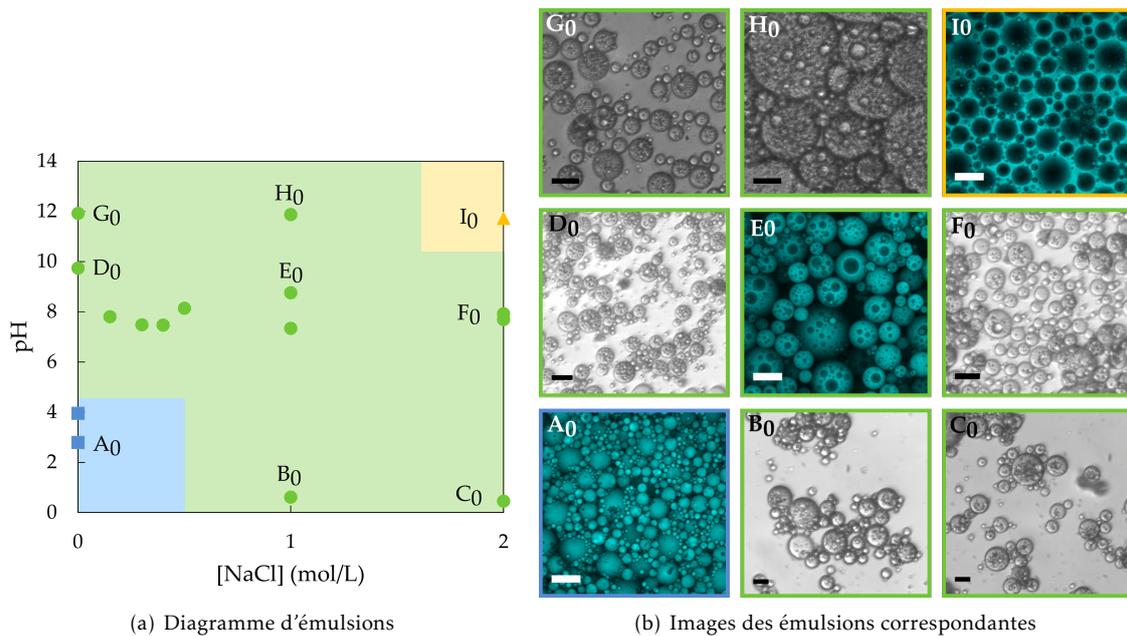


FIGURE III.6 – Diagramme présentant les types d'émulsions obtenus juste après émulsification pour le Miglyol<sup>®</sup> 812 et en présence du COPO 60b50. ■ = Émulsion H/E, ● = Émulsion E/H/E, ▲ = Émulsion E/H. Toutes les barres d'échelles représentent 30 μm. Les émulsions A<sub>0</sub>, E<sub>0</sub> et I<sub>0</sub> sont observées en microscopie confocale, les autres émulsions en microscopie optique.

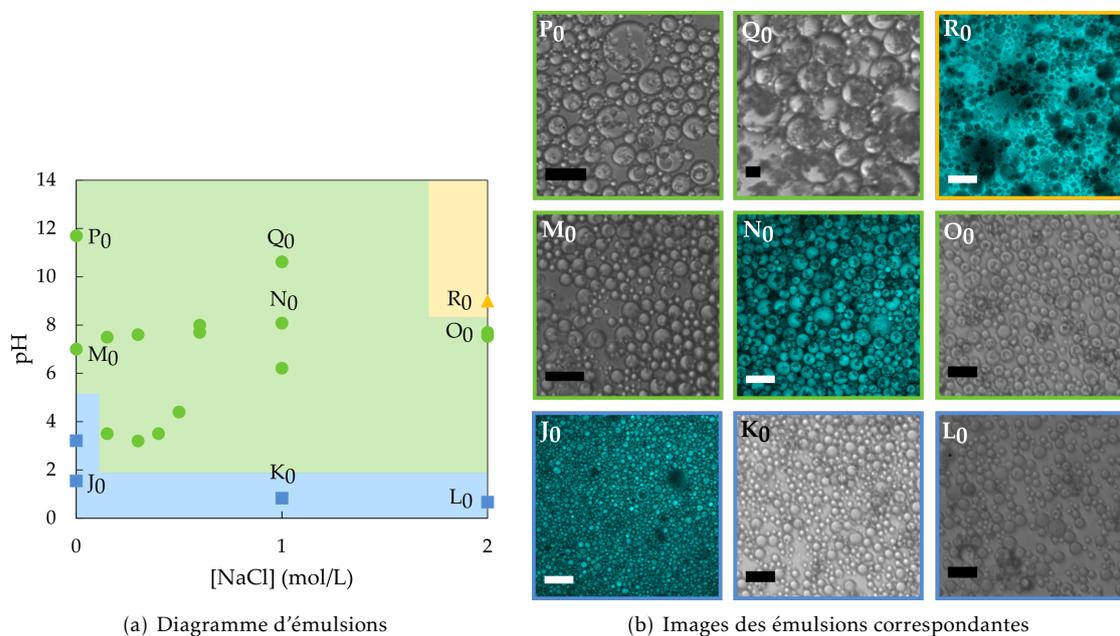


FIGURE III.7 – Diagramme présentant les types d'émulsions obtenus juste après émulsification pour le myristate d'isopropyle et en présence du COPO 60b50. ■ = Émulsion H/E, ● = Émulsion E/H/E, ▲ = Émulsion E/H. Toutes les barres d'échelles représentent 30 μm. Les émulsions J<sub>0</sub>, N<sub>0</sub> et R<sub>0</sub> sont observées en microscopie confocale, les autres émulsions en microscopie optique.

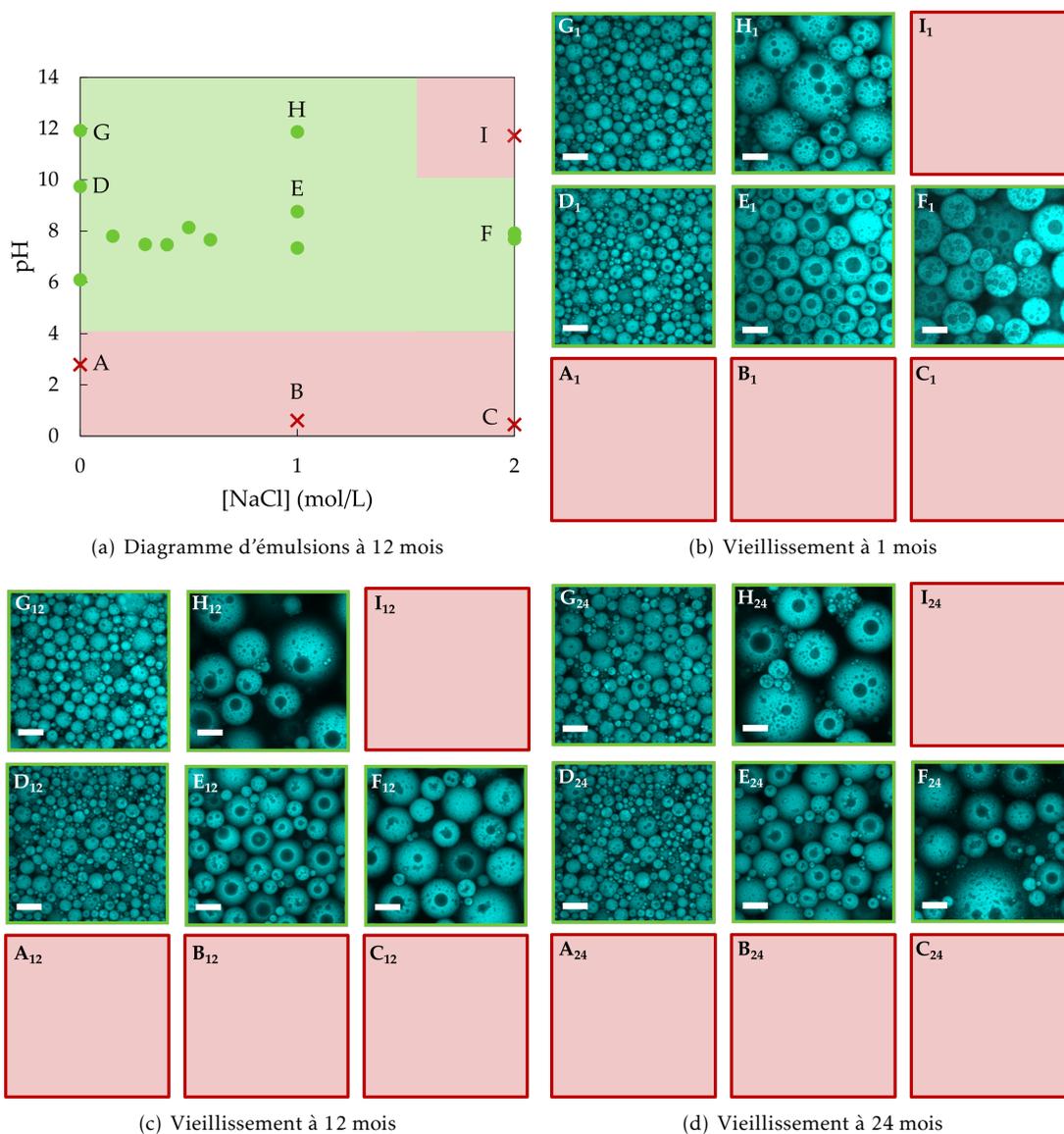


FIGURE III.8 – Diagramme et images de microscopie confocale présentant l'évolution des émulsions obtenues pour le Miglyol<sup>®</sup> 812 et en présence du COPO 60b50. ● = Émulsion E/H/E, × = Émulsion instable. Toutes les barres d'échelles représentent 30  $\mu\text{m}$ . Les émulsions A, B, C et I sont déstabilisées et n'ont donc pas été observées.

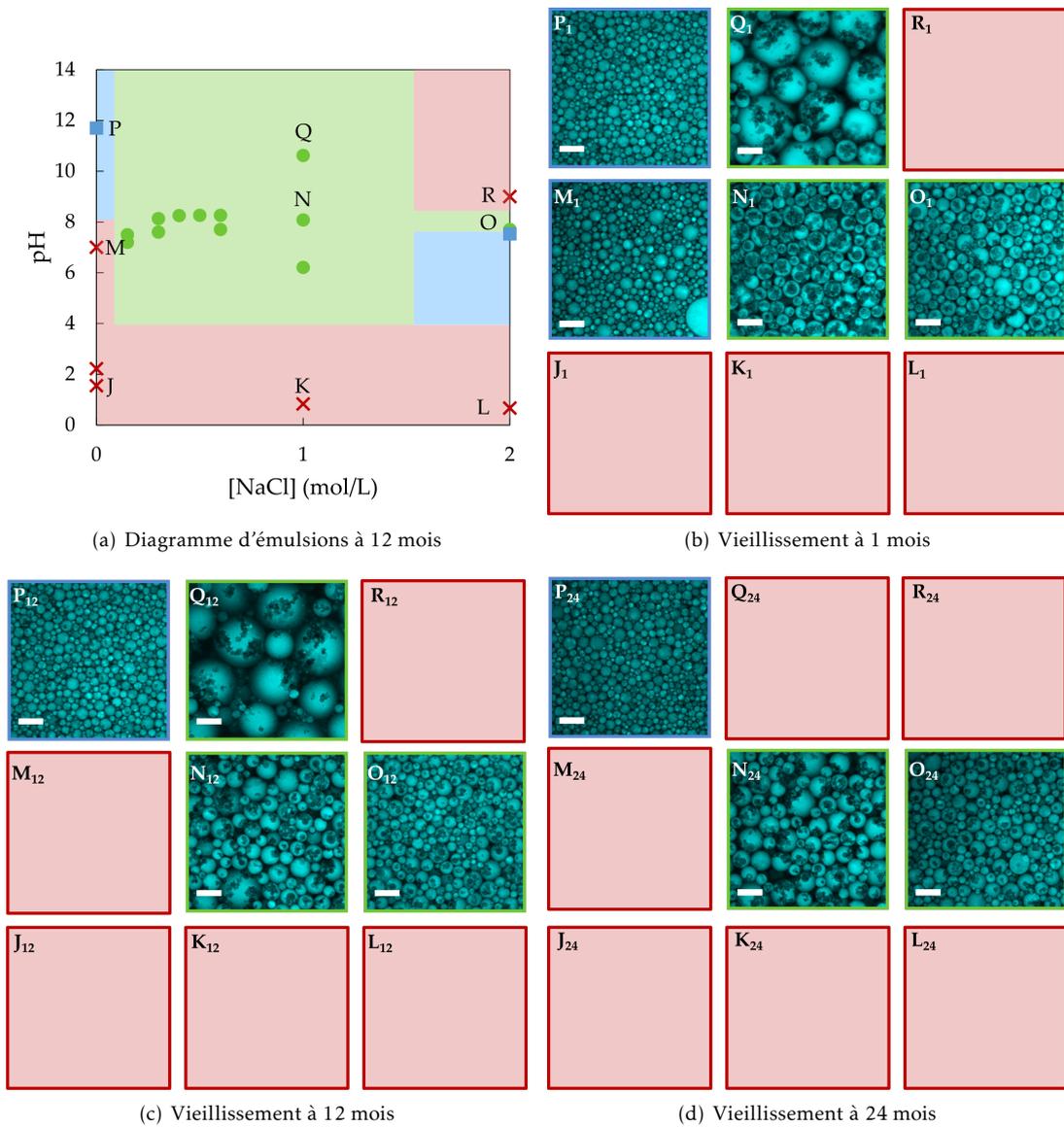


FIGURE III.9 – Diagramme et images de microscopie confocale présentant l'évolution des émulsions obtenues pour le myristate d'isopropyle et en présence du COPO 60b50. ● = Émulsion E/H/E, × = Émulsion instable. Toutes les barres d'échelles représentent 30  $\mu\text{m}$ . Les émulsions J, K, L et R sont déstabilisées et n'ont donc pas été observées.

**Rationalisation des diagrammes d'émulsions** Ces diagrammes d'émulsions sont à mettre en regard des résultats obtenues par Lucie Besnard<sup>12-14</sup> et Marine Protat<sup>1</sup> qui ont travaillé avec des copolymères à base de styrène et de DMAEMA. Ce système et la façon dont il a été étudié se rapprochent en effet de ce qui est fait ici : stabilisation des interfaces par un copolymère amphiphile, étude de l'influence de pH et du sel sur les émulsions formées, protocole de formation des émulsions identique.

L'étude menée par Lucie Besnard et Marine Protat avait permis de mettre en avant trois critères nécessaires (mais pas suffisants) pour la formation d'émulsions doubles stabilisées par le copolymère PS<sub>40</sub>-*b*-P(S<sub>21</sub>-*stat*-DMAEMA<sub>68</sub>) :

- une tension interfaciale basse (<1,5 mN/m) entre le toluène contenant le copolymère et la phase aqueuse aux pH et concentration en NaCl considérés ;
- un transfert du copolymère depuis la phase huile vers la phase aqueuse relativement faible (<25%), conférant à ce système des propriétés anti-Bancroft<sup>12</sup> ;
- une conformation du copolymère pour laquelle l'extension est similaire dans chacune des deux phases, rendant possible la stabilisation des deux types de courbures (conformément à l'étude présentée par Kabalnov et Wennerström<sup>24</sup> sur l'incidence de la courbure spontanée de l'émulsifiant).

Pour ce système, des émulsions directes ont toujours été obtenues lorsque les tensions interfaciales étaient supérieures à 2 mN/m, et lorsque le transfert du copolymère en phase aqueuse était supérieur à 25%. La formation d'émulsions inverses a pu être corrélée à un transfert très faible (inférieur à 10%).

De façon plus générale, le type d'émulsion formé a pu être corrélé à la conformation du copolymère à l'interface grâce à des mesures de réflectivité de neutrons<sup>12,25</sup>. Cette technique de caractérisation est très utile pour les systèmes organiques car il existe un contraste important entre l'atome d'hydrogène et les autres atomes. En jouant sur la présence de deutérium dans certaines parties du système, il est possible d'obtenir des informations sélectives, par exemple sur l'étendue du polymère à l'interface. L'étude réalisée par Marine Protat a permis de montrer que le copolymère PS<sub>40</sub>-*b*-P(S<sub>21</sub>-*stat*-DMAEMA<sub>68</sub>) est environ deux fois plus étendu côté eau que côté huile dans le cas de la formation d'une émulsion directe. Dans le cas des émulsions inverses, une fine couche dense de copolymère en phase aqueuse s'oppose à une couche plus étendue et plus diluée en phase huile. Pour les émulsions doubles, on assiste à un comportement intermédiaire avec une extension semblable dans chacune des deux phases.

La FIGURE III.10 compare le diagramme d'émulsion obtenu par Marine Protat avec le copolymère PS<sub>40</sub>-*b*-P(S<sub>21</sub>-*stat*-DMAEMA<sub>68</sub>) et le toluène, et les diagrammes d'émulsion obtenus avec le COPO 60**b**50 et les deux huiles biocompatibles utilisées ici.

Au premier abord, le diagramme obtenu par Protat peut sembler très différent de ceux présentés ici. On retrouve cependant les trois grandes zones : émulsions directes aux bas pH et concentrations en NaCl, inverses aux pH et concentrations en NaCl élevés, et une zone intermédiaire où des émulsions doubles sont formées. Le copolymère PS<sub>40</sub>-*b*-P(S<sub>21</sub>-*stat*-DMAEMA<sub>68</sub>) présente la particularité de stabiliser une émulsion multiple à phase huile continue, ce qui n'a pas été observé avec les copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA. La zone où sont formées les émulsions doubles est également

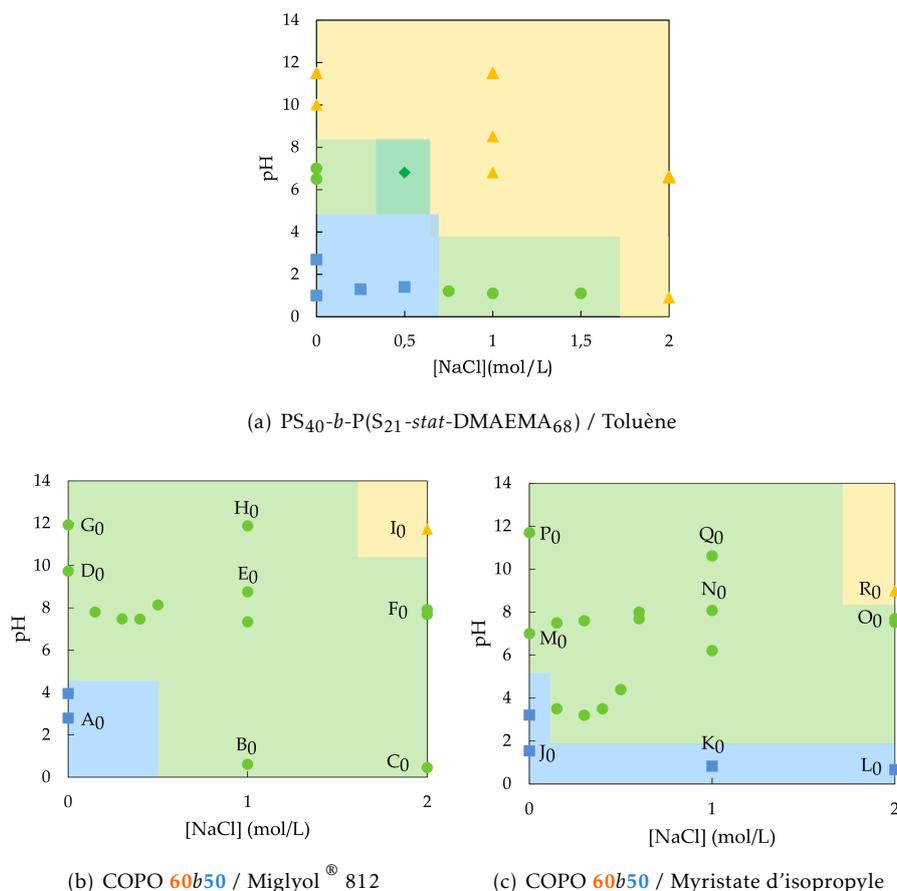


FIGURE III.10 – Comparaison des diagrammes d'émulsions juste après émulsification obtenus (a) par Marine Protat<sup>1</sup> avec le PS<sub>40</sub>-*b*-P(S<sub>21</sub>-stat-DMAEMA<sub>68</sub>) pour le toluène, (b) en présence du COPO 60b50<sup>®</sup> pour le Miglyol<sup>®</sup> 812 et (c) en présence du COPO 60b50 pour le myristate d'isopropyle. ■ = Émulsion H/E, ● = Émulsion E/H/E, ◆ = Émulsion H/E/H, ▲ = Émulsion E/H.

beaucoup plus restreinte, et, à l'inverse, la zone où sont formées les émulsions E/H est beaucoup plus étendue. Cela peut s'expliquer par la structure différente des deux copolymères. En effet, nous utilisons ici un copolymère dibloc, tandis que Lucie Besnard et Marine Protat ont travaillé avec un bloc hydrophile alternant de façon statistique des monomères hydrophiles et hydrophobes. Les maillons styrènes du bloc hydrophile, en phase aqueuse malgré leur caractère hydrophobe, interagissent entre eux par liaisons de Van der Waals pour minimiser leurs interactions avec l'eau. Cela conduit à une contraction de la chaîne en phase aqueuse, et favorise la formation d'émulsions inverses.

Le système de Lucie Besnard et Marine Protat est aussi beaucoup plus sensible aux paramètres physico-chimiques de la phase aqueuse puisqu'une légère variation de la concentration en sel ou du pH conduisent à la formation de différents types d'émulsions. La formation de multiples est corrélée à un réglage très précis de l'extension des chaînes qui va dépendre de l'état de charge du copolymère.

Avec notre copolymère, nous formons quasi exclusivement des émulsions doubles, et seules ces émulsions sont stables. Le type d'émulsion formé n'est que peu sensible à la concentration en NaCl, probablement car les émulsions stables ont toutes un pH d'équilibre supérieur à 7/8, pH au

dessus du  $pK_A$  du copolymère pour lequel la chaîne est donc peu chargée<sup>26</sup>. A pH 1 en revanche, une émulsion directe est obtenue sans sel pour le Miglyol<sup>®</sup> 812 tandis qu'une émulsion E/H/E est formée pour une concentration de 1 M en NaCl : pour cette dernière concentration on peut donc supposer que les charges sont suffisamment écrantées pour que la chaîne se comporte comme une chaîne neutre, et par conséquent le comportement est similaire à celui observé pour des pH plus élevés.

La conformation du polymère aux interfaces et le type d'émulsion qui en découle semblent donc pouvoir être rationalisés de la même façon que le copolymère PS<sub>40</sub>-*b*-P(S<sub>21</sub>-*stat*-DMAEMA<sub>68</sub>). Pour avoir des informations plus quantitatives, il serait intéressant de réaliser des expériences de réflectivité de neutrons avec les copolymères biocompatibles, mais aussi plus ardu. En effet, il n'est pas possible dans notre cas d'utiliser une huile deutérée car les huiles biocompatibles utilisées n'existent pas sous cette forme. Il pourrait être envisageable de travailler avec un copolymère deutéré, mais le développement d'un protocole pour la synthèse d'un tel polymère représenterait un travail important et en marge du projet développé ici. Nous ferons donc l'hypothèse raisonnable que les comportements de ces deux copolymères à l'interface présentent des similitudes et peuvent être interprétés de façon semblable. En particulier, nous supposons que la formation d'émulsions doubles est liée à l'adoption par le copolymère d'une conformation dans laquelle son extension est similaire en phase huile et en phase aqueuse.

Nous allons maintenant voir si le critère de la tension interfaciale basse dans la zone de formation des émulsions E/H/E est également respecté.

**Mesures de tensions interfaciales** La formation d'émulsions multiples a été corrélée par Lucie Besnard et Marine Protat avec des tensions interfaciales basses, inférieures à 1,5 mN/m. Une faible valeur de tension favorise en effet la création d'interfaces et permet la formation d'émulsions multiples. De façon à voir si notre système suit également cette règle, des mesures de tensions interfaciales ont été réalisées.

La méthode la plus couramment utilisée pour la mesure de tension interfaciale entre l'eau et l'huile est la méthode de la goutte montante. A l'aide d'une seringue, une goutte du liquide le moins dense est formée en sortie de l'aiguille incurvée dont est munie la seringue, dans une cellule contenant la phase la plus dense. La tension interfaciale est alors déterminée en analysant le profil de la goutte et en résolvant l'équation de Laplace qui exprime l'équilibre entre les forces interfaciales et la gravité.

Dans notre cas, en présence de copolymère, les tensions sont pour la plupart très basses : la goutte d'huile formée en sortie de la seringue est arrachée en quelques minutes et la mesure n'est pas possible. Nous avons donc utilisée une méthode alternative pour la mesure de nos tensions interfaciales : la tensiométrie en goutte tournante.

Les résultats de ces mesures sont présentées à la FIGURE III.11. Les incertitudes sur les mesures effectuées avec le myristate d'isopropyle sont parfois très importantes. En effet, du fait des tensions très basses, la gouttes a tendance à s'allonger énormément au cours de l'expérience, rendant la mesure difficile.

Les tensions interfaciales eau / myristate d'isopropyle et eau / Miglyol<sup>®</sup> 812 en l'absence de copolymère sont respectivement de 27,1 et 24,3 mN/m (mesurées par la méthode de la goutte

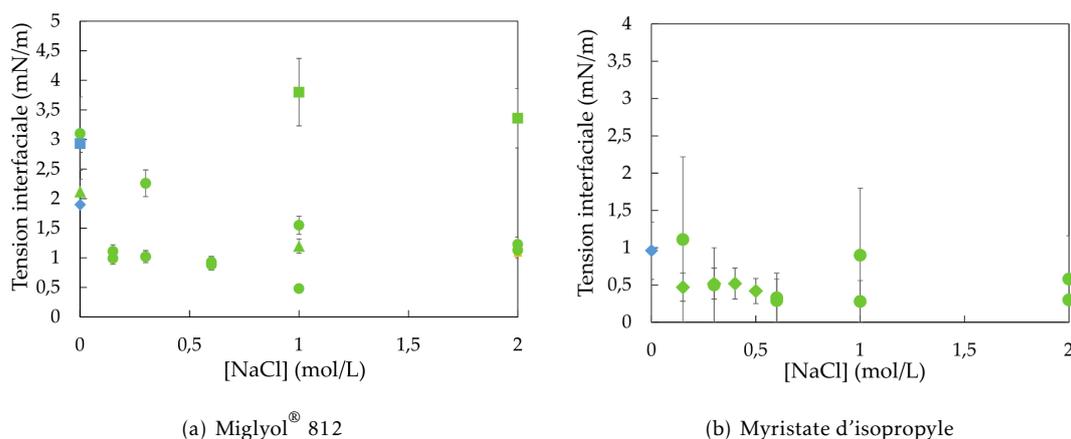


FIGURE III.11 – Mesures de tensions interfaciales en goutte tournante : (a) entre l'eau et le Miglyol® 812, en présence du COPO 60b50, (b) entre l'eau et le myristate d'isopropyle, en présence du COPO 60b50 - ■ :  $pH_{24h} = 1$ , ◆ :  $pH_{24h} = 3$ , ● :  $pH_{24h} = 8$ , ▲ :  $pH_{24h} = 12$ ; Échantillon correspondant à une émulsion directe, Échantillon correspondant à une émulsion multiple E/H/E, Échantillon correspondant à une émulsion inverse.

montante). Les valeurs des tensions sont diminuées de façon importante en présence de copolymère, ce qui confirme bien son effet tensioactif.

Les tensions mesurées sont toutes très basses, et les échantillons correspondant à des émulsions E/H/E stables conduisent à des valeurs de tension interfaciale faibles, autour de 1,5 mN/m pour le Miglyol® 812 et encore plus basses, entre 0,1 et 1 mN/m, pour le myristate d'isopropyle. Le critère de formation des émulsions doubles énoncé par Lucie Besnard et Marine Protat est donc vérifié.

**Partitionnement du copolymère - Mesures de DLS** Le transfert du copolymère de la phase huile vers la phase aqueuse lors des 24 h de mise au contact des deux phases préalablement à l'émulsification a été mis en évidence par Lucie Besnard et Marine Protat comme un facteur déterminant pour la formation d'émulsions multiples. Un transfert trop important en phase aqueuse conduit en effet à des émulsions directes, il est nécessaire pour pouvoir stabiliser des émulsions doubles que moins de 25% du copolymère initialement introduit diffuse en phase aqueuse. Si la quantification du transfert était facile avec le copolymère PS<sub>40</sub>-*b*-P(S<sub>21</sub>-*stat*-DMAEMA<sub>68</sub>) qui présente une bande d'absorption en UV grâce aux groupements aromatiques portés par le PS, elle est beaucoup moins évidente avec les copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA.

Pour essayer d'obtenir malgré tout des informations à ce sujet, nous avons réalisé des mesures de DLS dans chacune des phases afin de voir si des autoassemblages sont observés.

Des mesures ont d'abord été effectuées sur les phases huiles seules dans lesquelles le copolymère est en solution, ce avant leur mise au contact avec la phase aqueuse. Des objets de 4 nm sont détectés dans ces phases, ce qui correspond à la taille typique de simples pelotes de copolymère en bon solvant, et démontre l'absence d'autoassemblage à ce stade. Le corrélogramme obtenu pour le myristate d'isopropyle est présenté en FIGURE III.12(a) (—).

Les mesures ont été ensuite réalisées sur trois échantillons pour chaque huile, après 24 h de mise au contact des deux phases : pour les conditions extrêmes de pH et de concentrations en sel étudiées pour lesquelles des émulsions directes et inverses instables sont obtenues, et

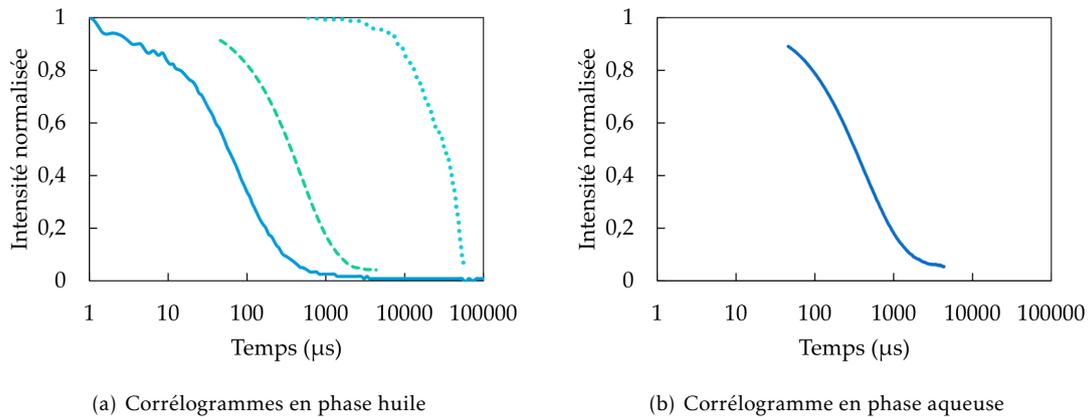


FIGURE III.12 – Corrélogrammes typiques obtenus pour les objets formés par le COPO 60b50 (a) en phase huile, (b) en phase aqueuse. (a) — phase myristate d'isopropyle avant mise au contact de l'eau, --- phase myristate d'isopropyle après 24 h de mise au contact avec une phase aqueuse à  $pH_{24h}=8$  et  $[NaCl]=0,6$  M, .... phase Miglyol® 812 après 24 h de mise au contact avec une phase aqueuse à  $pH_{24h}=8$  et  $[NaCl]=0,6$  M, (b) phase aqueuse à  $pH_{24h}=8$  et  $[NaCl]=0,6$  M après 24 h de mise au contact avec une phase myristate d'isopropyle.

pour un échantillon intermédiaire qui conduit à une émulsion multiple stable. Des exemples de corrélogrammes sont présentés à la FIGURE III.12.

Les diamètres des objets observés, déterminés par ajustement d'une exponentielle sur le corrélogramme mesuré, sont présentés dans le TABLEAU III.2.

Huile	$pH_{24h}$	$[NaCl]$	Émulsion	$D_{eau}$	$D_{huile}$
Miglyol® 812	1	0 M	H/E	60 nm + 184 nm	566 nm
Miglyol® 812	8	0,6 M	E/H/E	84 nm	1240 nm
Miglyol® 812	12	2 M	E/H	84 nm	1800 nm
Myristate d'isopropyle	1	0 M	H/E	70 nm + 236 nm	64 nm
Myristate d'isopropyle	8	0,6 M	E/H/E	300 nm	64 nm
Myristate d'isopropyle	12	2 M	E/H	272 nm	64 nm

TABLEAU III.2 – Tailles des objets formés par le COPO 60b50 en phase aqueuse et en phase huile pour différents échantillons dont les phases ont été laissées en contact durant 24 h.  $D_{eau}$  et  $D_{huile}$  représentent respectivement les diamètres des objets observés dans l'eau et dans l'huile.

Pour tous les échantillons, des objets ont été observés à la fois en phase aqueuse et en phase huile. Les objets observés en phase huile sont de tailles nettement plus importantes qu'avant la mise au contact avec la phase aqueuse, ce qui laisse supposer qu'on a dans ce cas auto-assemblage des chaînes autour d'un cœur aqueux. Dans le myristate d'isopropyle, des objets de tailles identiques de 64 nm sont formés dans l'huile quels que soient le pH et la concentration en NaCl, correspondant probablement à des micelles gonflées par l'eau. En revanche, les objets formés dans le Miglyol® 812 sont de tailles très importantes, on peut supposer qu'il s'agit plutôt d'émulsification spontanée, conduisant à la formation de petites gouttes d'eau au sein de la phase huile, plutôt que de micelles

gonflées. Il pourrait également s'agir éventuellement de vésicules à cœur huileux. Les tailles exactes sont cependant à considérer avec précaution car on sort ici de la gamme de taille accessibles pour des mesures de DLS.

Deux populations sont observées en phase aqueuse à pH 1, ce pour les deux huiles. Ce phénomène est typique des chaînes polyélectrolytes en solution aqueuse en l'absence de sel pour écranter les charges<sup>27</sup>. Aucune des deux populations ne représente la taille réelle des objets : la taille la plus faible (mode rapide) est un pic diffusif correspondant à la diffusion conjointe des chaînes et de leurs contre-ions, tandis que la taille la plus élevée (mode lent) semble liée à des interactions interchaînes conduisant à la formation de *clusters*. Les objets observés en phase aqueuse pour les échantillons à pH 8 et 12 sont de tailles similaires, ce qui est cohérent avec le fait que le taux de charge du polymère varie peu, mais ils sont plus gros lorsque la phase aqueuse a été au contact du myristate d'isopropyle.

Ces résultats peuvent être analysés par analogie avec les microémulsions où les objets formés ont une courbure proche de la courbure spontanée des émulsifiants. L'observation d'objets dans les deux phases paraît dans ce cas cohérente pour les échantillons conduisant à des émulsions multiples : les deux types d'interfaces peuvent être stabilisées par le copolymère, la courbure est donc proche de zéro et les deux types de micelles peuvent être formées. Il est plus surprenant d'obtenir des objets dans les deux phases pour les échantillons qui conduisent à la formation d'une émulsion simple. On s'attendrait en effet à ce que la courbure spontanée du polymère, plutôt tournée vers l'huile ou bien plutôt vers l'eau, interdise la formation de micelles dans une des deux phases. Cependant, la taille de ces objets reste relativement importante devant la taille du copolymère, la frustration de courbure engendrée par leur formation est donc limitée.

Ces résultats de DLS ne donnent pas d'informations directes sur le partitionnement du copolymère entre les deux phases, mais confirment qu'il a une affinité pour les deux phases, ce qui est en accord avec la stabilisation quasi exclusive d'émulsions E/H/E.

L'appareil de DLS utilisé pour ces expériences fournit un corrélogramme en intensité déjà normalisée. Il est donc impossible de remonter à la concentration des objets présents dans chaque phase. Cette information pourrait cependant être utile à la compréhension : par exemple, on s'attendrait à ce que la concentration d'objets observés en phase huile à pH 1 soit assez faible car la conformation du copolymère à bas pH n'est pas en faveur d'une courbure tournée vers l'eau. Nous pourrions également voir si le critère de formation des émulsions multiples établi par Lucie Besnard et Marine Protat concernant le partitionnement du copolymère est vérifié pour notre système, à savoir un transfert de moins de 25% du copolymère vers la phase aqueuse, sous peine d'obtenir une émulsion directe. Dans cette optique, il serait intéressant de réitérer ces mesures avec un appareil différent donnant accès à ce type d'informations.

Pour avoir de plus amples informations sur les objets formés dans les différentes phases, nous avons voulu réaliser des mesures de cryo-microscopie électronique en transmission (cryo-MET). Marine Protat<sup>28</sup> avait réalisé quelques mesures de ce type sur les phases aqueuses d'un échantillon eau/myristate d'isopropyle en présence d'un copolymère PDMS<sub>38</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>25</sub> ayant un comportement très similaire au COPO 60b50. Dans les conditions conduisant après émulsification à la formation d'une émulsion directe, des sphères de 16 nm de diamètre ont été détectées (cf FIGURE III.13 a.), tandis que dans les conditions conduisant à une multiple E/H/E un mélange de sphères de 21 nm de diamètre et de cylindres de 99 nm de long et de diamètre de 19 nm ont été

observés (cf FIGURE III.13 b.). Ces mesures sont en accord avec l'évolution supposée de la courbure spontanée du polymère : la courbure du polymère sera en effet plus proche de zéro dans le cas d'un cylindre que dans celui d'une sphère.

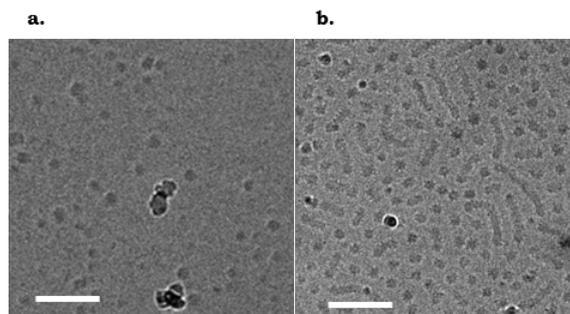


FIGURE III.13 – Images cryo-MET obtenues par Marine Protat<sup>28</sup> : a. dans une phase aqueuse à pH 1 sans NaCl, b. dans une phase aqueuse à pH 8 et 1 M en NaCl; après 24 h de mise au contact avec une phase myristate d'isopropyle contenant du PDMS<sub>38</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>25</sub> à 5 mg/mL. Les barres d'échelle représentent 100 nm.

Nous avons voulu étendre ces résultats en réalisant des mesures sur les phases aqueuses et huiles, pour les échantillons à base de myristate d'isopropyle qui sont ceux qui ont donné des résultats pour Marine Protat. Malheureusement, nous n'avons pu observer aucun objet dans nos échantillons, que ce soit en phase aqueuse ou en phase huile, et quel que soit le liquide utilisé pour la congélation des phases huiles (éthane ou azote). Étant donné que des objets ont été observés en DLS, nous supposons que cela est dû au protocole de préparation des échantillons : il est possible que la pression exercée par le papier absorbant pour retirer l'excès de liquide soit trop importante et conduise à l'absorption d'une grande partie de l'échantillon. Cette hypothèse semble plausible car de nombreux trous de la grille sont vides et ne contiennent pas de liquide congelé. La concentration en objets est peut être aussi trop faible, ce qui augmente la difficulté à les trouver sur une grille.

Il serait intéressant de refaire des tests en modifiant un peu le protocole de préparation des échantillons afin de voir si des objets peuvent être observés.

**Conclusions** Les critères de formation d'émulsions multiples établis à l'issue du travail de thèse de Lucie Besnard et Marine Protat avec le PS<sub>40</sub>-*b*-P(S<sub>21</sub>-*stat*-DMAEMA<sub>68</sub>) semblent aussi vérifiés avec le COPO 60b50 (PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub>). Il est raisonnable de corrélérer le type d'émulsion formé avec la conformation du polymère à l'interface et son extension dans chaque phase. Les tensions interfaciales correspondant aux échantillons formant des émulsions doubles sont faibles, inférieures à 2 mN/m, et le copolymère se répartit entre les deux phases lors des 24 h de mise au contact de l'eau et l'huile, sans que l'on sache toutefois si la répartition est asymétrique comme observé auparavant.

Cependant, avec ce système biocompatible, nous stabilisons quasi-exclusivement des émulsions doubles E/H/E, dans une large gamme de pH de départ et de concentration en NaCl. Cette facilité à obtenir des émulsions doubles sera un atout pour formuler des émulsions encapsulant une molécule d'intérêt.

Nous allons maintenant nous intéresser aux diagrammes d'émulsions obtenus pour les deux

autres copolymères, les COPO **60b265** et **104b89**.

### I.2.c Émulsions stabilisées par le COPO **60b265**

Les diagrammes d'émulsions pour le COPO **60b265** sont présentés aux FIGURES III.14 pour le Miglyol<sup>®</sup> 812 et III.15 pour le myristate d'isopropyle.

Le diagramme obtenu avec le Miglyol<sup>®</sup> 812 est très semblable à celui obtenu en présence du COPO **60b50**, avec une zone à bas pH et faibles concentrations en NaCl où des émulsions directes sont obtenues, une zone à haut pH et concentrations en NaCl élevées où l'on forme des émulsions inverses, et une large zone intermédiaire où des émulsions doubles E/H/E sont stabilisées. L'évolution de ces émulsions au cours du temps est présentée à la FIGURE III.16(a). Elle est très similaire à celle présentée précédemment, à savoir que les émulsions à pH 1 sont déstabilisées en quelques jours, et l'émulsion à pH 12 et 2 M en NaCl en quelques minutes.

La formation d'émulsions doubles avec ce copolymère très asymétrique est surprenante : avec ce long bloc hydrophile, on s'attendrait plutôt à former des émulsions directes. Il existe donc probablement des interactions entre le copolymère et l'huile qui restreignent son extension en phase huile. Le but étant ici de stabiliser des émulsions doubles, le Miglyol<sup>®</sup> 812 semble une huile particulièrement intéressante.

Le diagramme est assez différent dans le myristate d'isopropyle où des émulsions inverses sont formées aux pH autour de 8. Toutes les émulsions, hormis les émulsions à pH 12 et moins de 1 M en NaCl, sont déstabilisées en quelques semaines (cf FIGURE III.16(b)). Ces résultats peuvent être interprétés comme suit : le COPO **60b265** est nettement plus long que le COPO **60b50**. Son passage de la phase huile vers la phase aqueuse est donc fortement ralenti, car les mécanismes d'adsorption puis de désorption du copolymère à l'interface, nécessaires à la traversée de cette dernière, prendront plus de temps. Lors de l'émulsification, lorsque l'on forme de nouvelles interfaces à peupler, le copolymère couvrira en outre les interfaces moins rapidement et mettra plus de temps à adopter sa conformation d'équilibre. On peut supposer que pour les émulsions formées à partir de myristate d'isopropyle, le copolymère n'a que très peu transféré en phase aqueuse à l'issue des 24 h de mise au contact des deux phases. Il se trouve donc majoritairement en phase huile lors de l'émulsification, ce qui conduit à la formation d'émulsions inverses. Cependant, ce copolymère est très hydrophile du fait de son très long bloc de PDMAEMA. Aux temps longs, lorsque le copolymère a adopté la conformation qui lui est préférable et a atteint son partitionnement d'équilibre entre les deux phases, la stabilisation d'une interface tournée vers l'eau n'est plus du tout favorable et les émulsions démixent. Le diagramme d'émulsions après trois mois ressemble finalement beaucoup au diagramme obtenu sans copolymère. La morphologie des émulsions stables obtenues à pH 12 est très similaire à l'émulsion formée au même pH sans copolymère, avec des gouttes d'huile très petites. Il serait intéressant de voir si des émulsions stables peuvent être obtenues en laissant les deux phases en contact pendant plus de 24 h avant émulsification, afin de laisser au copolymère le temps d'atteindre sa répartition d'équilibre entre les deux phases, ainsi que sa conformation à l'équilibre.

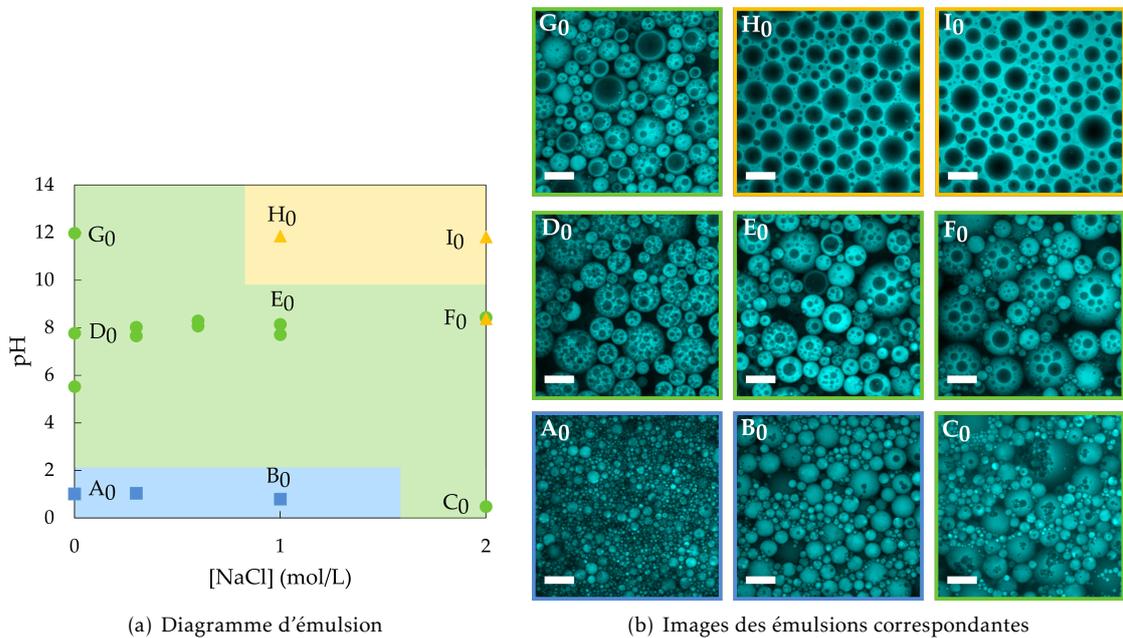


FIGURE III.14 – Diagramme présentant les types d'émulsions obtenus juste après émulsification pour le Miglyol<sup>®</sup> 812 en présence du COPO 60b265. ■ = Émulsion H/E, ● = Émulsion E/H/E, ▲ = Émulsion E/H. Toutes les barres d'échelles représentent 30 μm. Tous les clichés ont été pris en microscopie confocale.

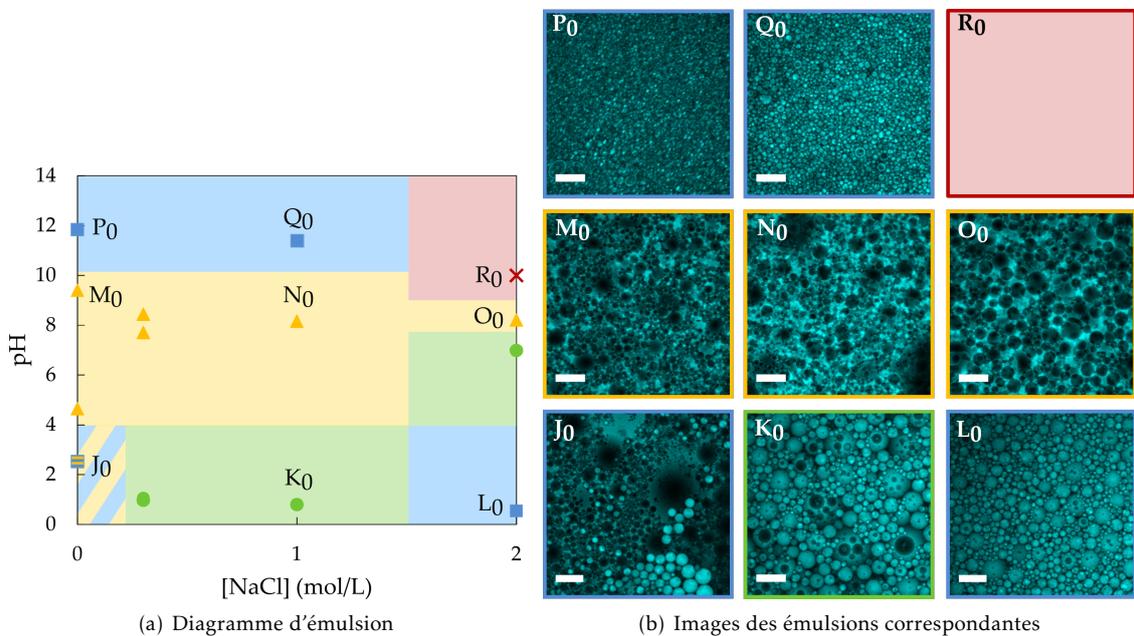
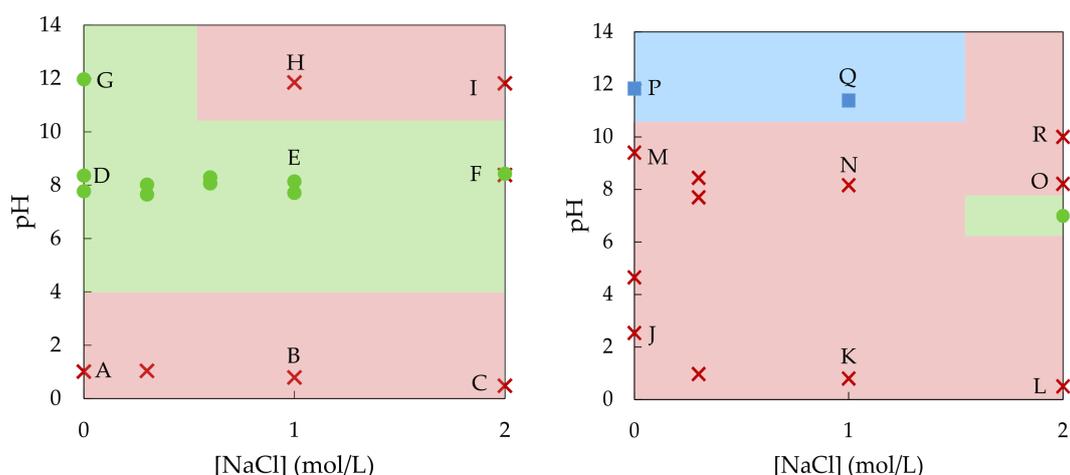


FIGURE III.15 – Diagramme présentant les types d'émulsions obtenus juste après émulsification pour le myristate d'isopropyle en présence du COPO 60b265. ■ = Émulsion H/E, ● = Émulsion E/H/E, ▲ = Émulsion E/H, × = Émulsion instable. Toutes les barres d'échelles représentent 30 μm. Tous les clichés ont été pris en microscopie confocale.



(a) Diagramme d'émulsions à 6 mois avec le Miglyol® 812 (b) Diagramme d'émulsions à 3 mois avec le myristate d'isopropyle

FIGURE III.16 – Diagrammes présentant l'évolution des émulsions stabilisées par le COPO 60b265 (a) pour le Miglyol® 812 et (b) pour le myristate d'isopropyle. ■ = Émulsion H/E, ● = Émulsion E/H/E, ▲ = Émulsion E/H, × = Émulsion instable.

#### I.2.d Émulsions stabilisées par le COPO 104b89

Les diagrammes d'émulsions pour le COPO 104b89 sont présentés aux FIGURES III.17 pour le Miglyol® 812 et III.18 pour le myristate d'isopropyle.

Là encore, le diagramme obtenu dans le Miglyol® 812 est tout à fait similaire à celui obtenu avec le COPO 60b50. Une grande zone d'émulsions doubles est obtenue aux pH autour de 8 et quelle que soit la concentration en NaCl. Ce copolymère étant symétrique (rapport  $\frac{\text{hydrophile}}{\text{hydrophobe}}$  proche de 1), l'obtention d'émulsions multiples paraît moins surprenante qu'avec le COPO 60b265. Cela confirme cependant que le Miglyol® 812 est une huile de choix pour former ce type d'émulsions avec notre système. La coexistence d'émulsions directes ou multiples avec des phases d'émulsions inverses est observée à bas pH : cela peut être lié au passage plus lent du COPO 104b89 de la phase huile vers la phase aqueuse, du fait de sa taille mais aussi de sa plus grande hydrophobie qui rendent la traversée de l'interface moins favorable. Lors de la formation des émulsions, une bonne partie du copolymère n'a pas encore eu le temps de passer en phase aqueuse pour atteindre l'équilibre de partitionnement entre les deux phases. La courbure préférée à ces pH serait plutôt une interface tournée vers l'huile du fait des charges portées par la chaîne PDMAEMA, mais comme une bonne partie du copolymère subsiste en phase huile lors de l'émulsification, des interfaces tournées vers l'eau sont également obtenues. Ces émulsions sont très vite déstabilisées (cf FIGURE III.19(a)). Là encore, il serait intéressant de laisser les phases aqueuse et huile au contact plus longtemps avant émulsification pour voir si des émulsions directes ou multiples pourraient être obtenues.

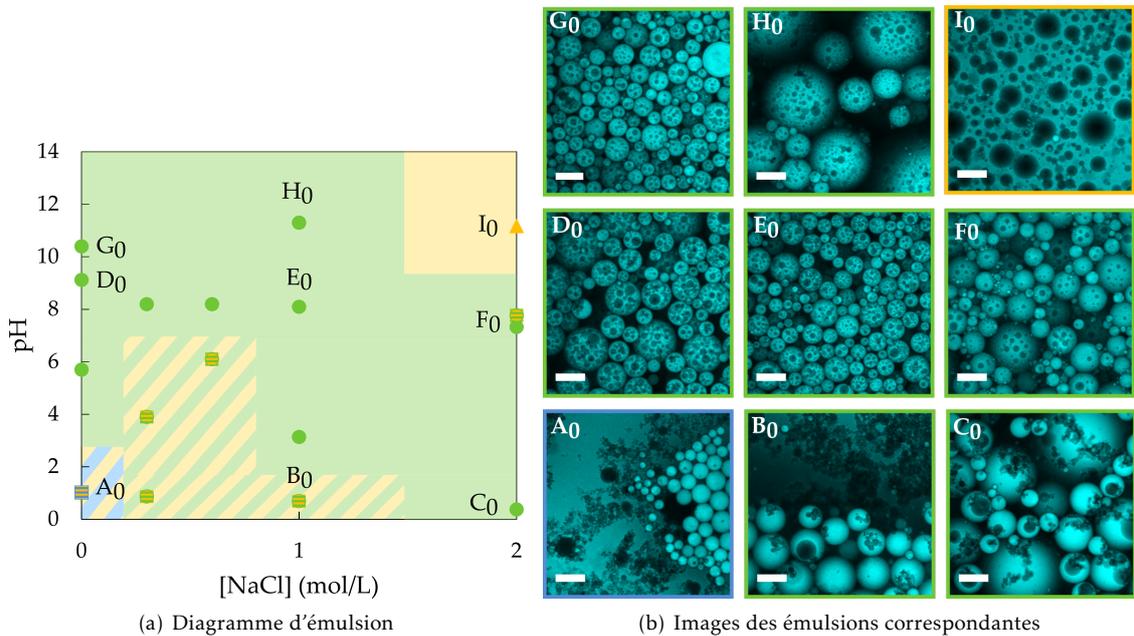


FIGURE III.17 – Diagramme présentant les types d'émulsions juste après émulsification obtenus pour le Miglyol® 812 et en présence du COPO 104b89. ■ = Émulsion H/E, ● = Émulsion E/H/E, ▲ = Émulsion E/H. Toutes les barres d'échelles représentent 30 μm. Les points et les parties hachurés du diagramme représentent la coexistence de deux types d'émulsions à phases continues opposées. Tous les clichés ont été pris en microscopie confocale.

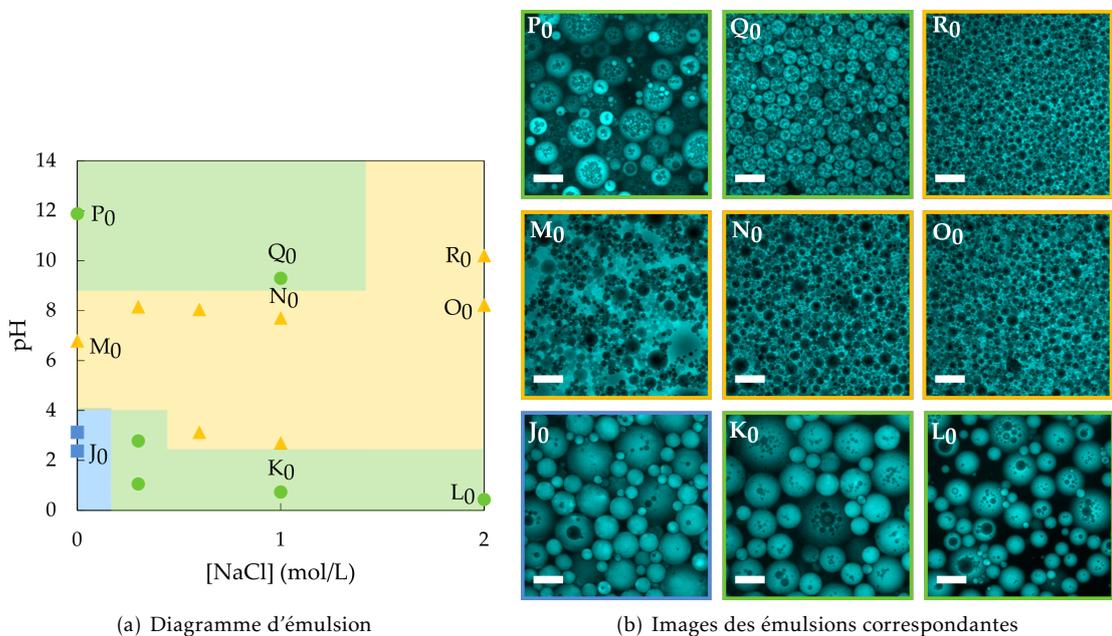


FIGURE III.18 – Diagramme présentant les types d'émulsions obtenus juste après émulsification pour le myristate d'isopropyle et en présence du COPO 104b89. ■ = Émulsion H/E, ● = Émulsion E/H/E, ▲ = Émulsion E/H. Toutes les barres d'échelles représentent 30 μm. Tous les clichés ont été pris en microscopie confocale.

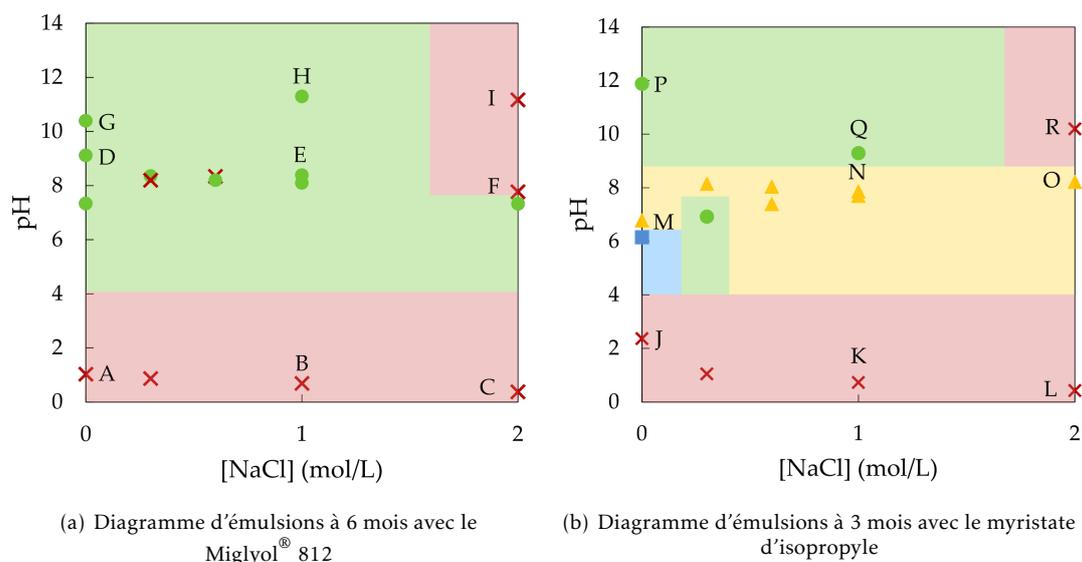


FIGURE III.19 – Diagrammes présentant l'évolution des émulsions stabilisées par le COPO 104b89 (a) pour le Miglyol® 812 et (b) pour le myristate d'isopropyle ■ = Émulsion H/E, ● = Émulsion E/H/E, ▲ = Émulsion E/H, × = Émulsion instable.

Le diagramme obtenu juste après émulsification pour le myristate d'isopropyle est assez similaire à celui obtenu en présence du COPO 60b265. En revanche, les émulsions obtenues sont stables (hormis les émulsions J, K, L et R) (cf FIGURE III.19(b)). Ce copolymère présente un bloc hydrophobe deux fois plus long que les deux autres, il paraît donc cohérent qu'il soit capable de stabiliser des interfaces tournées vers l'eau. La formation d'émulsions doubles à pH 12 peut être expliquée par la tendance naturelle de l'huile à former des émulsions directes à ces pH.

### I.2.e Conclusions

Quels que soient le copolymère et l'huile utilisés, aucune émulsion n'est stabilisée plus de quelques jours à des pH d'équilibre inférieurs à 7, à l'exception d'une émulsion à pH 3 sans sel dans le myristate d'isopropyle dont la stabilité est de quelques mois. La stabilité restreinte à pH 1 pourrait être liée à la mauvaise couverture des interfaces par le copolymère. Le copolymère déjà adsorbé à l'interface, très chargé, pourrait compliquer l'insertion de nouvelles chaînes à l'interface du fait de la répulsion électrostatique qu'il engendre.

La concentration en NaCl semble avoir assez peu d'influence sur la conformation du copolymère et le type d'émulsions formées. Ceci est lié au fait que les émulsions stables sont obtenues dans une gamme de pH supérieurs au  $pK_A$  pour lesquels la chaîne polymère est principalement neutre.

Dans le Miglyol® 812, les trois copolymères ont des comportements très proches et les diagrammes d'émulsions obtenus sont quasi-identiques. La structure du copolymère semble très peu influencer le type d'émulsions formées, ce qui peut paraître étonnant, en particulier avec le COPO 60b265 qui présente un bloc hydrophile pourtant très long. Cela semble montrer que le Miglyol® 812 interagit avec le copolymère, et limite d'une certaine façon son extension en phase aqueuse. Des différences plus marquées sont observées avec le myristate d'isopropyle pour lequel

l'architecture du copolymère modifie le type d'émulsions obtenues. La traversée de l'interface pour atteindre l'équilibre de partitionnement lors des 24 h de mise au contact des deux phases semble moins efficace dans cette huile où beaucoup d'émulsions inverses, stables pour le COPO 104b89 et instables pour le COPO 60b265, sont obtenues, indiquant *a priori* qu'une grande partie du copolymère se trouve encore en phase huile lors de l'émulsification.

Une des explications possibles pour rationaliser ces observations serait l'existence d'interactions entre les chaînes hydrophiles des copolymères et les acides gras libres résiduels présents en phase huile. Il est difficile de trouver des informations précises sur les quantités effectivement présentes dans chaque huile. Celle-ci est quantifiée par la "valeur acide", c'est-à-dire le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium à ajouter à un gramme d'huile pour le neutraliser. Nous avons trouvé des valeurs de 0,1 pour le Miglyol<sup>®</sup> 812 (fiche technique du fabricant) et de 1 pour le myristate d'isopropyle<sup>29</sup>. Ces acides, composés d'une tête polaire et d'une longue chaîne hydrophobe, vont *a priori* se placer aux interfaces. À pH autour de 8, ces acides gras sont neutres. Ils sont donc à même de former des liaisons hydrogènes avec le bloc PDMAEMA du copolymère.

Pour les blocs hydrophiles courts (cas du COPO 60b50), on peut supposer que la création de liaisons hydrogènes n'est pas favorable car cela contraindrait la chaîne à être très courbée : le bloc reste donc étendu de façon symétrique dans chaque phase et des émulsions multiples sont obtenues. Les acides gras joueraient donc dans ce cas un rôle limité.

Pour les blocs hydrophiles plus longs, en revanche, et en particulier pour le COPO 60b265, la création de liaisons hydrogènes pourrait minimiser l'extension du bloc hydrophile en phase aqueuse en constituant des point d'ancrage de la chaîne en phase huile. Cela permettrait de réduire la courbure spontanée et de stabiliser des émulsions doubles avec le Miglyol<sup>®</sup> 812, comme représenté à la FIGURE III.20(a). Dans le myristate d'isopropyle qui contient une proportion plus importante d'acides gras libres, un nombre plus conséquent de liaisons serait créé, à l'origine de la formation d'émulsions inverses du fait de l'extension très faible du copolymère en phase aqueuse (cf FIGURE III.20(b)). Les émulsions inverses obtenues avec le COPO 60b265 sont malgré tout rapidement déstabilisées, probablement du fait du passage de ce copolymère très hydrophile en phase aqueuse aux temps longs.

Des études de RMN<sup>1</sup> H sur les huiles pourraient permettre de quantifier de façon plus précise les acides gras qu'elles contiennent et ainsi de valider ou d'infirmer cette hypothèse.

Dans ce travail nous n'avons pas été en mesure de quantifier les taux d'encapsulation de nos émulsions, c'est-à-dire la proportion d'eau constituant la phase aqueuse interne par rapport au volume d'eau total. Lucie Besnard et Marine Protat<sup>1,14</sup> ont utilisé une méthode basée sur la mesure de conductivité de la phase aqueuse avant émulsification, puis de la phase aqueuse externe de l'émulsion. Le rapport  $\sigma$  de ces deux conductivités permet de remonter à la fraction volumique de phase aqueuse externe, puis au taux d'encapsulation  $\epsilon$ , selon la formule<sup>30</sup> :

$$\epsilon = 1 - \frac{6\sigma(1 + 11\sigma)}{1 + 25\sigma + 10\sigma^2}$$

Malheureusement, avec les huiles biocompatibles utilisées, nous n'avons jamais mesuré de taux d'encapsulation cohérents par cette méthode électrique (le plus souvent la valeur de 0 était obtenue même pour des émulsions qui présentaient un grand nombre de gouttes internes).

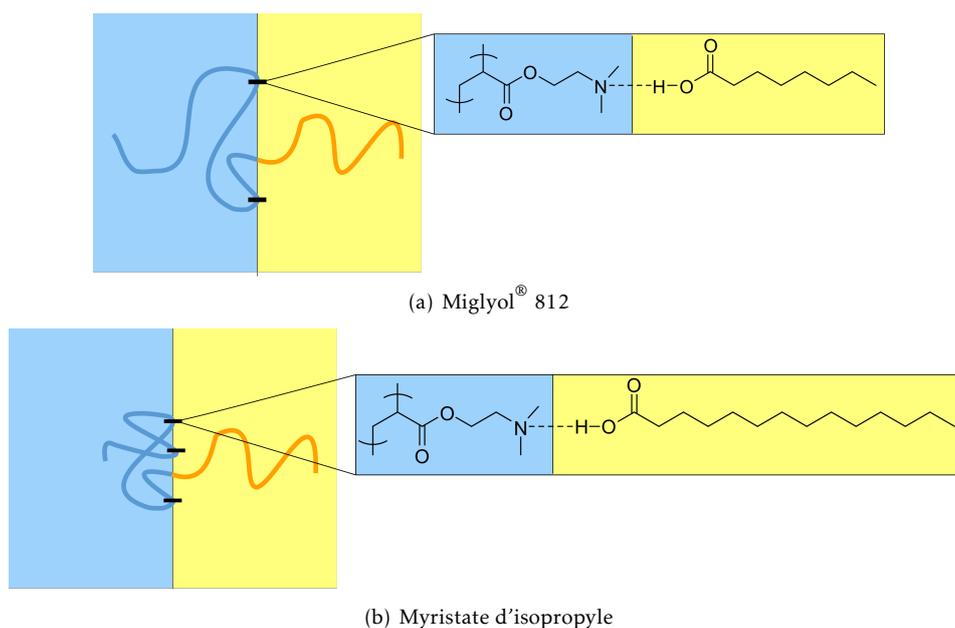


FIGURE III.20 – Schéma représentant les possibles liaisons hydrogènes (représentées par les petits rectangles noirs à l'interface) existant entre le bloc hydrophile du copolymère et les acides gras libres de chacune des huiles. Le nombre plus important de liaisons possibles avec le myristate engendre une extension plus faible du copolymère en phase aqueuse.

Les COPO 60b265 et 104b89 n'ont pas été étudiés plus en détails (pas de mesures de DLS ni de tensiométrie) car ils semblent moins performants pour stabiliser des émulsions doubles que le COPO 60b50 et n'ont pas été utilisés dans la suite. Il serait cependant intéressant de réaliser ces mesures de façon à voir si des différences sont observées entre les trois copolymères, notamment dans le myristate d'isopropyle pour lequel les diagrammes d'émulsions diffèrent selon le copolymère considéré.

## II Déstabilisation des émulsions multiples E/H/E

Le copolymère choisi pour stabiliser nos émulsions est sensible au pH, à la force ionique et à la température. Nous avons vu dans la partie précédente qu'il était possible de former différents types d'émulsions en faisant varier les deux premiers paramètres. Nous pouvons aussi jouer sur ces différents paramètres pour déstabiliser les émulsions multiples E/H/E. Marine Protat a étudié dans sa thèse les trois stimuli<sup>1</sup>. Elle a pu montrer de façon qualitative qu'il était possible de déstabiliser les émulsions par ces trois voies :

- L'exposition d'une émulsion E/H/E à une phase aqueuse à pH inférieur au pH d'équilibre conduit à une émulsion directe ;
- L'exposition d'une émulsion E/H/E à une phase aqueuse de force ionique différente conduit à un gonflement - pour une force ionique plus faible à l'extérieur - ou un dégonflement - pour une force ionique plus élevée à l'extérieur - des gouttes internes.
- L'exposition d'une émulsion E/H/E à une température supérieure à 60°C conduit au déphasage complet des deux phases, en passant par une émulsion intermédiaire inverse.

Comme nous souhaitons développer pour notre système des applications administrées par voie orale, nous nous sommes concentrés sur la déstabilisation par le pH qui correspond bien à la situation retrouvée lors de l'ingestion : la diminution du pH dans l'estomac permettra la déstabilisation de l'émulsion et donc la libération d'un éventuel principe actif encapsulé à l'intérieur.

Nous utilisons deux méthodes de déstabilisation des émulsions par le pH, qui seront présentées dans la suite. Ces deux méthodes conduisent à des résultats légèrement différents. Nous avons travaillé avec des émulsions à pH d'équilibre de 8 (au départ de pH 3) stabilisées par le COPO 60b50.

### II.1 Déstabilisation par prélèvement de la phase aqueuse sous-nageante

Comme on l'a vu plus tôt, les émulsions E/H/E formées par notre système crèment en quelques heures, les globules d'huile plus légers remontant à la surface de l'émulsion. Ce phénomène laisse apparaître une phase aqueuse sous-nageante d'un volume d'environ 1,5 mL qui est exploitée pour la déstabilisation. Celle-ci est prélevée délicatement à la pipette ou à la seringue, en prenant soin d'éviter au maximum les globules d'huile. Cette phase aqueuse est remplacée aussitôt par le même volume d'une phase aqueuse à pH inférieur et de même concentration en NaCl. Après une simple agitation manuelle, l'émulsion est observée. Il faut noter que la concentration en copolymère en phase aqueuse externe est modifiée lors du remplacement de la phase sous-nageante par une phase aqueuse à pH inférieur. La FIGURE III.21 représente schématiquement les différentes étapes suivies pour la déstabilisation.

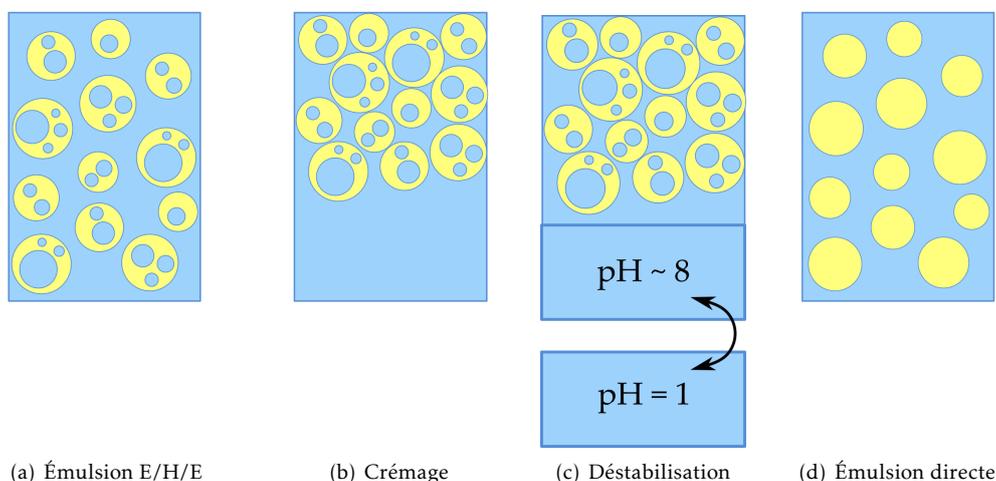


FIGURE III.21 – Déstabilisation d'émulsions par prélèvement de la phase aqueuse sous-nageante : (a) Émulsion de départ E/H/E, pH de la phase aqueuse d'environ 8 - (b) Crémage de l'émulsion - (c) Prélèvement de la phase aqueuse sous-nageante à la seringue ou à la pipette, remplacement de cette phase par un même volume de phase aqueuse à pH 1 et de même concentration en NaCl - (d) Déstabilisation en moins d'une minute de l'émulsion E/H/E en émulsion directe H/E.

Si la phase aqueuse remplaçant la phase aqueuse sous-nageante est à pH 1, l'émulsion multiple est déstabilisée en émulsion directe en moins d'une minute et l'étape de transition ne peut pas être observée. La déstabilisation est possible avec les deux huiles et à toutes les concentrations en sel étudiées. Si le pH de la phase aqueuse de substitution est supérieur à 1, rien ne se passe

car le polymère est capable de compenser rapidement la diminution du pH par son effet tampon (cf 83). Une très légère variation de pH est observée, inférieure à une unité, lorsque la phase aqueuse de substitution est à pH 2, et aucune variation n'est observée à pH 3. L'émulsion reste multiple dans ces deux cas. Le TABLEAU III.3 présente les émulsions obtenues dans différents cas de déstabilisation, pour des émulsions dont la phase aqueuse est à pH 8 et contient 1 M de NaCl.

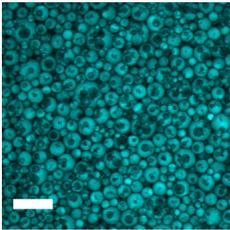
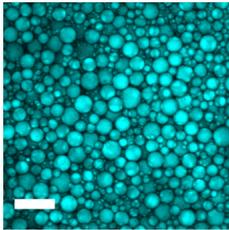
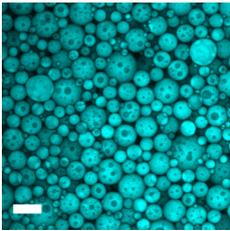
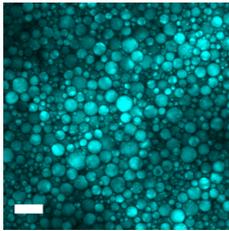
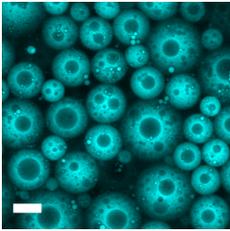
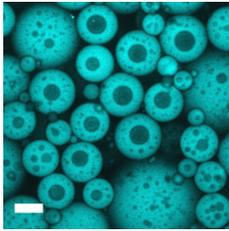
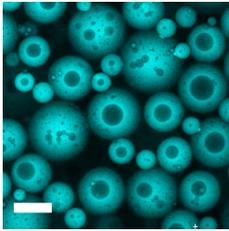
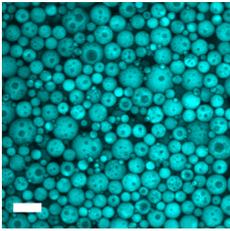
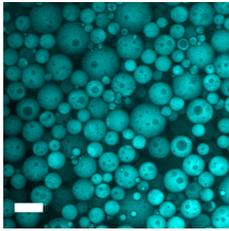
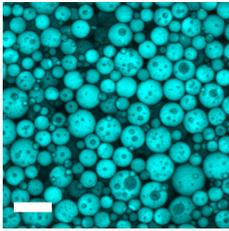
Huile utilisée	pH	Émulsion avant déstabilisation	Émulsion quelques minutes après déstabilisation	Émulsion une semaine après déstabilisation
Myristate d'isopropyle	1			émulsion démixée
Miglyol® 812	1			émulsion démixée
Miglyol® 812	2			
Miglyol® 812	3			

TABLEAU III.3 – Étude de la déstabilisation d'émulsions multiples E/H/E à pH 8 et 1 M en NaCl par prélèvement de la phase aqueuse sous-nageante, à différents pH. La colonne "pH" renseigne la valeur du pH de la phase substituant la phase aqueuse sous-nageante lors de la déstabilisation. Les barres d'échelle représentent 30  $\mu$ m.

La déstabilisation, liée à un déséquilibre de la concentration en protons entre les phases aqueuses internes et externes, peut être expliquée par deux mécanismes :

- les protons, en excès à l'extérieur, sont transportés par les micelles inverses gonflées d'eau de la phase aqueuse externe vers les gouttelettes d'eau internes pour équilibrer les concentrations (mécanisme n°1);
- l'eau interne est transportée par les micelles inverses de la phase aqueuse interne vers la phase aqueuse externe (mécanisme n°2) pour diluer les protons à l'extérieur.

Dans le cas du mécanisme n°1, l'arrivée des protons en phase aqueuse interne conduit au chargement des chaînes polymères et donc à la déstabilisation de l'interface tournée vers l'eau. Cela se traduit par la coalescence des gouttelettes internes avec la phase aqueuse externe, ce qui conduit à la formation d'une émulsion directe. Dans le cas du mécanisme n°2, le transfert de toute la phase aqueuse interne vers l'extérieur conduit également à une émulsion directe.

*A priori*, le mécanisme n°2 semble plus favorable. En effet, le transfert se fait par l'intermédiaire des micelles qui se créent à l'interface autour d'une petite quantité d'eau, un peu comme pour un mécanisme d'endocytose. Or, la création de ce type de micelles en phase aqueuse externe est défavorisée par le bas pH auquel le copolymère, chargé, est relativement étendu en phase aqueuse. La courbure spontanée est dans ce cas plutôt tournée vers l'huile (cf FIGURE III.22(a)). Elle est beaucoup plus favorable depuis la phase aqueuse interne où le pH est toujours élevé (cf FIGURE III.22(b)) et donc la courbure spontanée du copolymère proche de zéro.

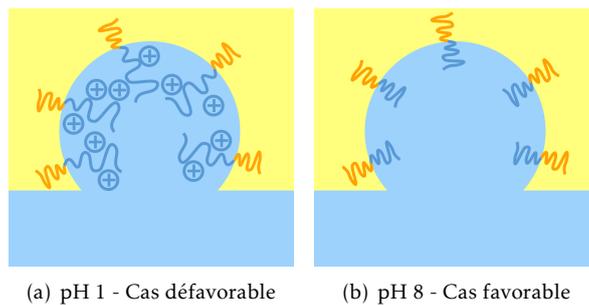


FIGURE III.22 – Illustration de la formation de micelles (a) depuis la phase aqueuse externe à pH 1 et (b) depuis la phase aqueuse interne à pH 8 lors de la mise au contact de l'émulsion avec une phase à bas pH.

Cependant les mesures de DLS (cf paragraphe I.2.b page 92) montrent que le copolymère forme des micelles en phase huile, même à pH 1. Nous n'avons en revanche aucune information sur la concentration de ces objets par rapport à ceux formés à pH plus élevé, il est probable qu'elle soit plus faible. Malgré tout la présence de ces micelles suggère que les deux mécanismes pourraient agir conjointement.

## II.2 Déstabilisation par dialyse

La déstabilisation par dialyse donne des résultats différents de la méthode par prélèvement. Contrairement à la première méthode, elle a en effet l'avantage de préserver l'intégrité de l'émulsion (pas de risque de prélever une partie des gouttes ou du copolymère présent en phase aqueuse externe). Elle permet également un contrôle plus fin du pH : comme l'émulsion est dialysée face à un grand volume d'eau, l'effet tampon du polymère sur le pH est négligeable. Il est ainsi possible de forcer le maintien du pH de la phase aqueuse à 2 ou 3, et de déstabiliser des émulsions multiples à ces pH, ce qui n'était pas le cas avec la méthode du prélèvement.

L'émulsion après formation est placée dans une membrane de dialyse (cut off : 6000-8000, qui ne permet pas le passage du polymère). Les 6 mL d'émulsion sont mis à dialyser sous agitation avec 250 mL de phase aqueuse de pH inférieur à 8 et de même force ionique (ajustée par ajout de NaCl) (cf FIGURE III.23). Un petit volume d'émulsion est prélevé à intervalle régulier pour être observé en microscopie confocale.

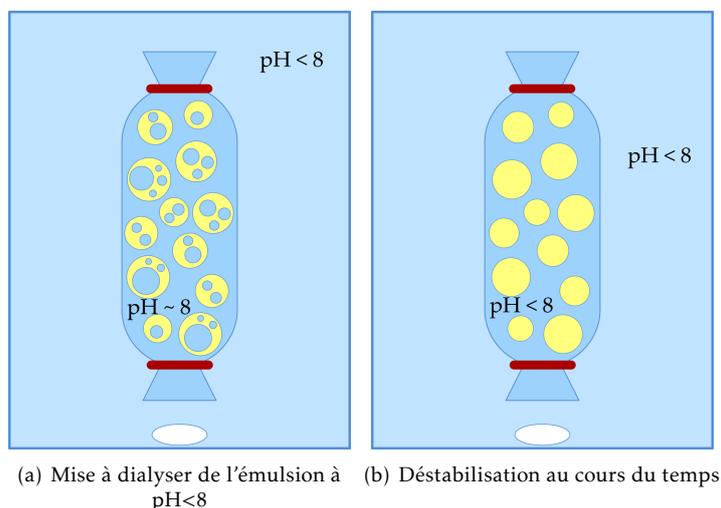


FIGURE III.23 – Déstabilisation d'émulsions par dialyse.

L'influence du pH sur la cinétique de déstabilisation a été étudiée avec cette méthode. Nous avons travaillé pour cette étude avec une émulsion à base de Miglyol<sup>®</sup> 812, présentant une phase aqueuse à pH 8 et 0,3 M de NaCl. Le test est réalisé à température ambiante à pH 1 ; 2 et 3, et également à 37°C pour le pH 1, de façon à mieux mimer les conditions de déstabilisation effectives dans l'organisme. Les résultats sont présentés dans le TABLEAU III.4.

La déstabilisation est d'autant plus rapide que le pH est bas, comme présenté dans le TABLEAU III.4. Ainsi, à pH 1 et température ambiante, une émulsion directe est obtenue en moins de 2 min. À pH 2, il faut attendre 5 min, et 30 min à pH 3. À pH 1 et 37°C, il faut 5 min pour obtenir une émulsion directe. La déstabilisation est un peu plus lente qu'à pH 1 et température ambiante, mais il faudrait réitérer ces expériences à plusieurs reprises pour s'assurer que la différence est significative.

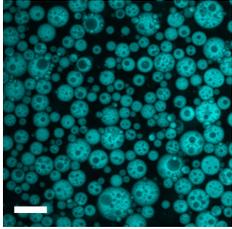
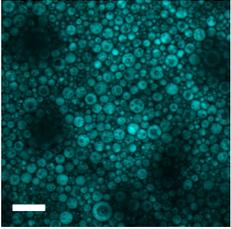
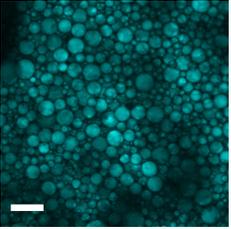
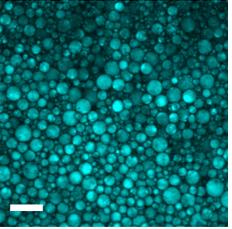
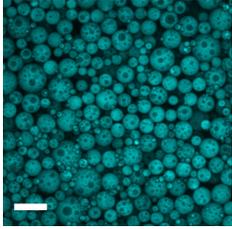
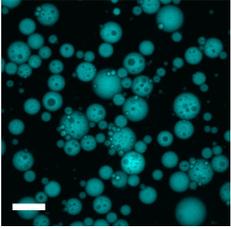
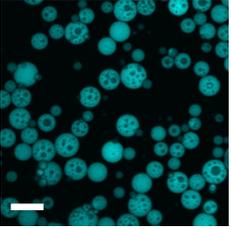
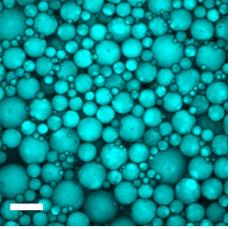
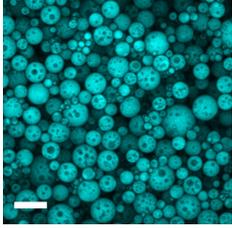
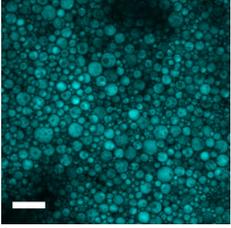
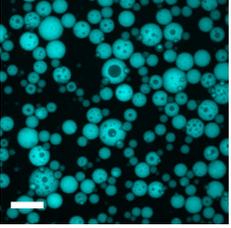
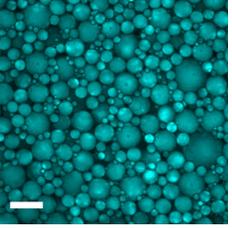
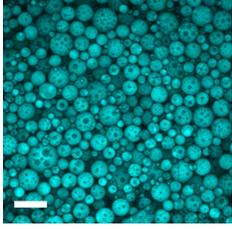
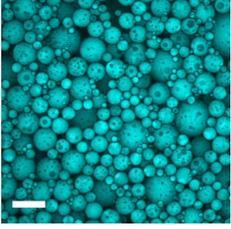
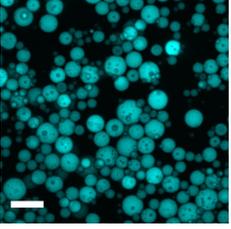
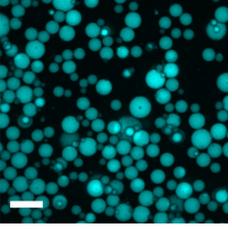
T (°C)	pH	Émulsions avant déstabilisation	Émulsions au cours de la déstabilisation					
25	1					1 min	2 min	5 min
37	1					1 min	2 min	5 min
25	2					1 min	2 min	5 min
25	3					5 min	15 min	30 min

TABLEAU III.4 – Déstabilisation à différents pH et températures d'une émulsion formée à partir de Miglyol<sup>®</sup> 812 et d'une phase aqueuse à pH 8 et 0,3 M de NaCl. Toutes les barres d'échelle représentent 30  $\mu$ m.

## II.3 Conclusions

Avec ces deux méthodes nous sommes capables d'obtenir une émulsion directe à partir d'une émulsion multiple E/H/E, c'est-à-dire de potentiellement libérer un principe actif encapsulé dans les gouttes internes de l'émulsion. La cinétique de la déstabilisation peut être ajustée en jouant sur le pH lorsque la méthode de déstabilisation adoptée est la méthode par dialyse. Nous avons également vérifié que la déstabilisation à 37°C, c'est-à-dire la température du corps humain, était possible. Notre système va donc pouvoir être utilisé pour le développement d'applications par voie orale destinées à l'homme.

## III Encapsulation d'une molécule modèle, le saccharose

Dans un premier temps, le saccharose a été choisi comme molécule modèle pour explorer les capacités d'encapsulation de notre système.

C'est une molécule biocompatible, non tensioactive<sup>31</sup>, et non sensible au pH dans les gammes de pH considérées<sup>32</sup>. Elle ne devrait donc pas venir se placer aux interfaces, et ne devrait pas affecter le comportement du polymère en modifiant le pH.

C'est également une molécule insoluble en phase huile. Son relargage pourra donc se faire soit par des mécanismes de coalescence, soit par diffusion en phase huile au sein de micelles gonflées d'eau.

Toute cette étude a été réalisée avec le COPO 60b50 et le Miglyol® 812. Nous commencerons par étudier les émulsions formées en présence de saccharose à différentes concentrations, puis nous nous intéresserons à son relargage.

### III.1 Émulsions chargées en saccharose

Le but étant d'encapsuler un composé au sein d'une émulsion double, nous avons choisi de limiter l'exploration du diagramme d'émulsions à la zone où des émulsions doubles E/H/E sont formées en l'absence de saccharose.

#### III.1.a Méthode de formation des émulsions chargées en saccharose

La quantité de saccharose souhaitée est d'abord dissoute dans les 3 mL de phase aqueuse aux pH et concentration en NaCl voulus. La phase huile est ensuite déposée à la surface de la phase aqueuse et les deux phases sont laissées au contact durant 24 h avant émulsification. Le protocole suivi ensuite est en tout point identique à la formation d'émulsion sans cargo (c'est-à-dire sans ajout d'une molécule en phase aqueuse, cf I.1.a page 78).

Nous avons fait varier la concentration en NaCl entre 0,15 et 1 M, et la concentration en saccharose entre 1 et 100 mg/mL.

#### III.1.b Émulsions obtenues en présence de saccharose

**Variation de la concentration en saccharose** Le TABLEAU III.5 présente les émulsions formées en présence de saccharose à des concentrations variant entre 1 et 100 mg/mL, pour des phases aqueuses toutes identiques à un pH d'environ 8 et une concentration en NaCl de 0,3 M, juste après et un an après formation.

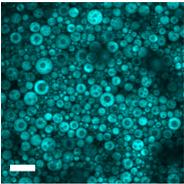
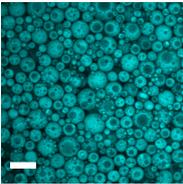
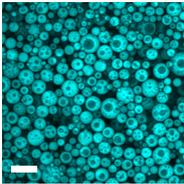
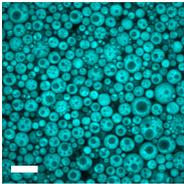
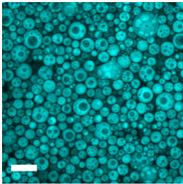
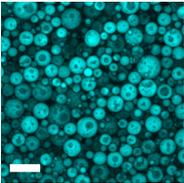
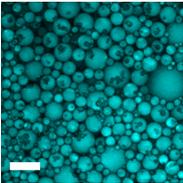
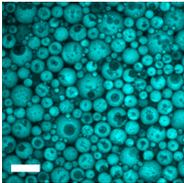
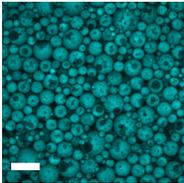
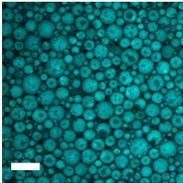
<i>Émulsions juste après formation</i>					
Concentration saccharose	1 mg/mL	10 mg/mL	30 mg/mL	60 mg/mL	100 mg/mL
Microscopie confocale					
$D_{huile}$ (µm)	$8,8 \pm 1,6$	$9,3 \pm 2,0$	$9,7 \pm 2,9$	$9,0 \pm 2,1$	$9,7 \pm 2,3$
$D_{eau}$ (µm)	$2,3 \pm 0,8$	$2,5 \pm 0,9$	$2,3 \pm 1,0$	$2,3 \pm 0,9$	$2,7 \pm 1,0$
<i>Émulsions 1 an après formation</i>					
Concentration saccharose	1 mg/mL	10 mg/mL	30 mg/mL	60 mg/mL	100 mg/mL
Microscopie confocale					
$D_{huile}$ (µm)	$9,7 \pm 2,3$	$8,4 \pm 1,8$	$9,5 \pm 2,3$	$9,1 \pm 2,1$	$8,5 \pm 1,9$
$D_{eau}$ (µm)	$2,3 \pm 1,0$	$2,0 \pm 0,9$	$2,2 \pm 1,0$	$2,0 \pm 0,8$	$2,4 \pm 0,9$

TABLEAU III.5 – Émulsions obtenues en présence de différentes concentrations de saccharose en phase aqueuse, juste après formation et après un an de conservation à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les phases aqueuses des émulsions sont toutes à pH 8 et 0,3 M en NaCl.  $D_{huile}$  et  $D_{eau}$  représentent respectivement les diamètres moyens des globules d'huile et des gouttelettes d'eau internes pour chaque émulsion, estimés grâce au programme Matlab (cf I.1.c). Les écarts au diamètre moyen représentent la polydispersité de l'émulsion et non l'erreur sur la mesure. Les barres d'échelle représentent 30 µm.

Juste après formation, les émulsions ont une morphologie très semblables, indépendamment de la quantité de saccharose introduite, avec des globules d'huile de diamètre moyen de  $9,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$  (soit 5% de variation entre les émulsions) et des gouttes d'eau interne de  $2,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$  (soit 17% de variation entre les émulsions, la variation plus élevée pouvant s'expliquer par la moins bonne précision de mesures sur ces gouttes parfois très petites).

Après un an de vieillissement des émulsions, les tailles des gouttes ont globalement peu varié, hormis pour l'émulsion contenant 100 mg/mL de saccharose pour laquelle la taille des gouttes a légèrement diminuée.

**Variation de la concentration en NaCl** Le TABLEAU III.6 présente les émulsions obtenues en présence de saccharose à 10 mg/mL pour différentes concentrations en NaCl. La formation d'émulsions multiples E/H/E est possible quelle que soit la concentration en NaCl parmi la gamme étudiée. Nous avons pu conserver ces émulsions pendant une année sous forme multiple sans observer de démixion. La taille des globules d'huile tend cependant à légèrement diminuer au cours du temps.

**Conclusions** Le système semble peu perturbé par la présence de saccharose, même en grande quantité. Les émulsions formées sont similaires à celles qui sont obtenues sans cargo sur toute la gamme de concentration en sel étudiée. Ceci confirme que le COPO 60b50 et le Miglyol<sup>®</sup> 812 sont de bons candidats pour l'obtention d'émulsions doubles stables.

Nous n'avons pas réalisé d'émulsions chargées en saccharose avec le myristate d'isopropyle. Cette huile ayant conduit à la formation de types d'émulsions différents du Miglyol<sup>®</sup> 812, il pourrait être intéressant de voir si la présence de saccharose en phase aqueuse modifie le type d'émulsions formées.

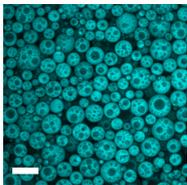
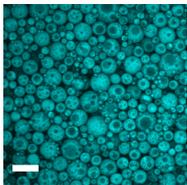
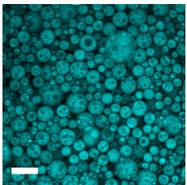
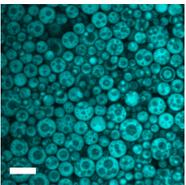
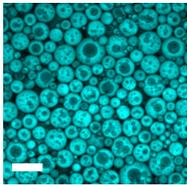
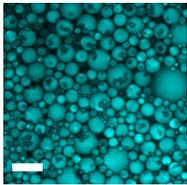
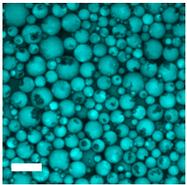
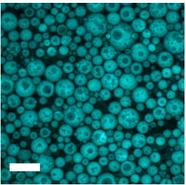
<i>Émulsions juste après formation</i>				
Concentration en NaCl	0,15 M	0,3 M	0,6 M	1 M
Microscopie confocale				
$D_{huile}$ (µm)	$12,6 \pm 2,6$	$9,3 \pm 2,0$	$10,8 \pm 2,3$	$12,3 \pm 2,8$
$D_{eau}$ (µm)	$2,9 \pm 1,1$	$2,3 \pm 1,0$	$2,4 \pm 0,8$	$2,9 \pm 1,1$
<i>Émulsions 1 an après formation</i>				
Microscopie confocale				
$D_{huile}$ (µm)	$10,6 \pm 2,3$	$8,4 \pm 1,8$	$9,8 \pm 2,2$	$8,9 \pm 1,9$
$D_{eau}$ (µm)	$2,3 \pm 1,1$	$2,0 \pm 0,9$	$2,2 \pm 0,9$	$2,0 \pm 0,9$

TABLEAU III.6 – Émulsions obtenues en présence de saccharose et pour différentes concentrations de NaCl en phase aqueuse, juste après formation et après un an de conservation à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les phases aqueuses des émulsions sont toutes à pH 8 et 10 mg/mL en saccharose.  $D_{huile}$  et  $D_{eau}$  représentent respectivement les diamètres moyens des globules d'huile et des gouttelettes d'eau internes pour chaque émulsion, estimés grâce au programme Matlab (cf I.1.c). Les écarts au diamètre moyen représentent la polydispersité de l'émulsion et non l'erreur sur la mesure. Les barres d'échelle représentent 30 µm.

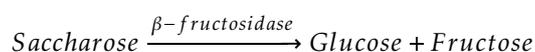
## III.2 Encapsulation et relargage de saccharose

L'objectif de cette partie est de pouvoir quantifier la quantité de saccharose encapsulée dans nos émulsions et pouvant être relarguée.

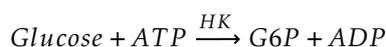
### III.2.a Détection du saccharose

Pour réaliser ces études, nous avons besoin de pouvoir quantifier le saccharose. Cette molécule n'est pas directement détectable avec les techniques facilement accessibles de spectroscopie UV/visible ou de fluorescence. Nous avons donc utilisé un kit de détection du saccharose (K-SUFRG) développé par la société Megazyme et basé sur l'action d'enzymes.

Dans un premier temps, le saccharose est décomposé quantitativement en glucose et fructose par action de la  $\beta$ -fructosidase.



La quantité de glucose ainsi produite est alors dosée. Le glucose réagit dans un premier temps avec l'ATP (adénosine-5'-triphosphate) pour former sous l'action de l'hexokinase (HK) un glucose portant un groupement phosphate (glucose-6-phosphate, G6P) ainsi que de l'ADP (adénosine-5'-diphosphate).



Le glucose ainsi phosphorylé réagit avec le  $\text{NADP}^+$  (nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate) en présence de l'enzyme glucose-6-phosphate dehydrogénase (G6P-DH) pour former entre autres produits du NADPH. Ce produit est caractérisable en UV-visible et présente un pic d'absorption à 340 nm.



Le kit se compose de  $\beta$ -fructosidase en solution dans l'eau à pH 4,6; d'un tampon à pH 7,6; d'un mélange de  $\text{NADP}^+$  et d'ATP en solution, ainsi que d'un mélange des deux enzymes HK et G6P-DH.

Le test de détection s'effectue ainsi :

- 200  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -fructosidase sont mis au contact avec un volume  $x$  d'échantillon ( $x$  étant compris entre 0,1 et 1 mL) directement dans une cuve en quartz. Ce mélange est laissé incubé 5 min à température ambiante. Le volume d'échantillon choisi doit permettre l'introduction d'une masse de saccharose comprise entre 4 et 80  $\mu\text{g}$ . A l'issue de cette étape la totalité du saccharose a été décomposé en fructose et glucose.
- $1-x$  mL d'eau distillée contenant 0,15 M de NaCl et 1 mL d'eau distillée sont ajoutés dans la cuve, ainsi que 100  $\mu\text{L}$  de tampon et 100  $\mu\text{L}$  de mélange  $\text{NADP}^+$ /ATP. L'échantillon est laissé incubé pendant 3 min, puis on prend une mesure d'absorbance à 340 nm notée  $A_1$ .
- 20  $\mu\text{L}$  de mélange d'enzymes HK et G6P-DH sont alors ajoutés. Après 5 min d'incubation, une deuxième mesure d'absorbance à 340 nm,  $A_2$ , est faite.

Le blanc est réalisé en ajoutant de l'eau distillée à la place de l'échantillon à la première étape. La valeur d'absorbance considérée pour le calcul de concentration est alors  $\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc}}$ .

Une droite d'étalonnage, présentée en Annexe B.3, est réalisée pour des solutions de saccharose à 0,15 M en NaCl dont la concentration varie entre 5 et 100 µg/mL. Malgré les préconisations du kit, la linéarité est conservée jusqu'à 100 mg de saccharose introduit. Cette droite nous permettra de connaître la quantité de saccharose présente en solution et ainsi de suivre le relargage de la molécule.

Les enzymes utilisées pour ce test sont sensibles au pH et ne fonctionnent correctement qu'à pH neutre. Il est donc important que l'échantillon testé soit à un pH proche de 7.

### III.2.b Lavage de la phase aqueuse externe de l'émulsion

Nos émulsions multiples présentent l'avantage d'être formées en une seule étape. Cependant, cela signifie que si l'on souhaite encapsuler une molécule, celle-ci sera présente en phase aqueuse interne mais aussi externe. Pour s'affranchir de la présence de la molécule en phase aqueuse externe, et ainsi pouvoir suivre le relargage de la molécule, il a été nécessaire de développer un protocole de lavage de nos émulsions.

L'émulsion choisie pour réaliser ces tests a une phase aqueuse à pH 8 et 0,3 M en NaCl, et contient 30 ou 60 mg/mL de saccharose.

Les 6 mL d'émulsion sont placés après formation dans une membrane de dialyse (cut off : 6000-8000), et mis au contact avec 250 mL de phase aqueuse ne contenant pas de saccharose. La concentration en sel de cette phase aqueuse peut être soit de 0,3 M, c'est-à-dire identique à la concentration présente dans l'émulsion, soit de 0,15 M, c'est-à-dire plus faible. L'utilisation d'une concentration plus faible de sel à l'extérieur permet d'avoir un déséquilibre de pression osmotique en faveur du gonflement des gouttelettes, et ainsi de minimiser les chances de fuite de la molécule présente en phase aqueuse interne. La dialyse se fait sous agitation et à température ambiante.

L'eau de dialyse est changée à intervalles réguliers jusqu'à ce que le saccharose ne soit plus détectable en phase aqueuse externe. La mesure de la quantité de saccharose se fait par prélèvement d'une partie de la phase aqueuse externe à la membrane de dialyse, et mesure de la concentration en solution grâce au kit K-SUFRG, après dilution ou concentration à l'évaporateur rotatif pour être dans la bonne gamme de concentration pour réaliser le test. L'équilibre entre les phases aqueuses internes et externes à la membrane de dialyse est d'autant plus long à atteindre que la concentration en saccharose est faible, la première eau de dialyse est donc laissée 6 h au contact de l'émulsion, la seconde environ 16 h, la troisième et l'éventuelle quatrième 24 h.

**Évolution de la morphologie des émulsions au cours des lavages** Nous présentons au TABLEAU III.7 les résultats obtenus pour des émulsions contenant 30 et 60 mg/mL de saccharose, lavées avec des phases aqueuses de même concentration en NaCl (0,3 M) ou plus faible (0,15 M).

Nous pouvons constater que les émulsions sont très robustes car les lavages répétés ne modifient que très peu leur morphologie. Une très légère tendance au gonflement des gouttelettes d'eau en début de lavage et une légère diminution de leur taille en fin de lavage peuvent malgré tout être relevées.

CHAPITRE III. FORMATION PAR VOIE MÉCANIQUE D'ÉMULSIONS STABILISÉES PAR DES COPOLYMÈRES PDMS-*B*-PDMAEMA - ENCAPSULATION ET RELARGAGE D'UNE MOLÉCULE MODÈLE, LE SACCHAROSE

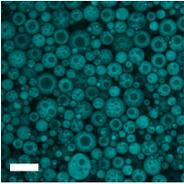
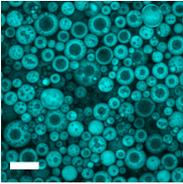
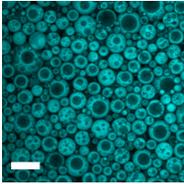
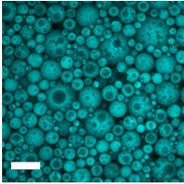
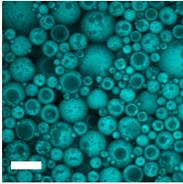
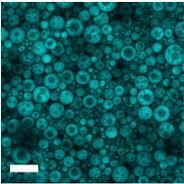
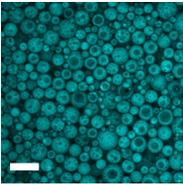
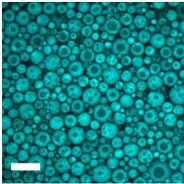
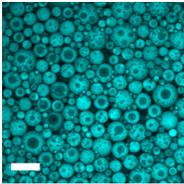
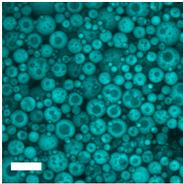
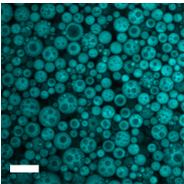
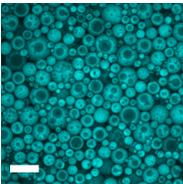
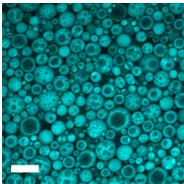
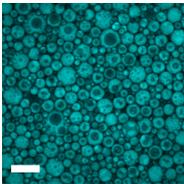
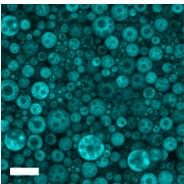
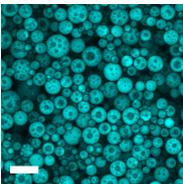
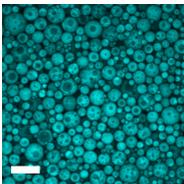
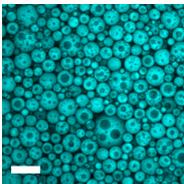
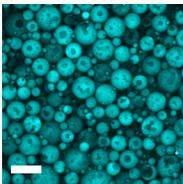
Émulsions	Émulsion après formation	Après dialyse 1	Après dialyse 2	Après dialyse 3	1 an après lavages
Saccharose 30 mg/mL - Lavage à 0,15 M en NaCl					
	$D_{huile} (\mu\text{m})$	$7,9 \pm 2,1$	$10,9 \pm 2,8$	$10,1 \pm 2,3$	$9,9 \pm 2,2$
$D_{eau} (\mu\text{m})$	$2,2 \pm 1,0$	$2,9 \pm 1,4$	$2,6 \pm 1,3$	$2,3 \pm 1,1$	$2,7 \pm 1,4$
Saccharose 30 mg/mL - Lavage à 0,3 M en NaCl					
	$D_{huile} (\mu\text{m})$	$8,0 \pm 2,0$	$9,5 \pm 2,2$	$9,5 \pm 2,3$	$9,4 \pm 2,2$
$D_{eau} (\mu\text{m})$	$2,1 \pm 0,9$	$2,3 \pm 1,0$	$2,4 \pm 1,0$	$2,2 \pm 1,0$	$2,4 \pm 1,1$
Saccharose 60 mg/mL - Lavage à 0,15 M en NaCl					Émulsion déstabilisée à pH 1 après les lavages
	$D_{huile} (\mu\text{m})$	$9,5 \pm 2,5$	$9,1 \pm 2,0$	$9,5 \pm 2,1$	
$D_{eau} (\mu\text{m})$	$2,3 \pm 0,9$	$2,6 \pm 1,2$	$2,5 \pm 1,2$	$2,4 \pm 1,1$	
Saccharose 60 mg/mL - Lavage à 0,3 M en NaCl					
	$D_{huile} (\mu\text{m})$	$8,6 \pm 2,3$	$9,3 \pm 2,1$	$8,2 \pm 1,7$	$8,5 \pm 1,8$
$D_{eau} (\mu\text{m})$	$2,0 \pm 0,8$	$2,1 \pm 0,9$	$1,9 \pm 0,7$	$2,2 \pm 0,9$	$2,1 \pm 0,9$

TABLEAU III.7 – Émulsions chargées à 30 mg/mL ou 60 mg/mL en saccharose et dialysées avec une phase aqueuse de pH environ 6 et contenant 0,15 ou 0,3 M de NaCl.  $D_{huile}$  et  $D_{eau}$  représentent respectivement les diamètres moyens des globules d'huile et des gouttelettes d'eau internes pour chaque émulsion, estimés grâce au logiciel Matlab (cf I.1.c). Les écarts au diamètre moyen représentent la polydispersité de l'émulsion et non l'erreur sur la mesure. Les barres d'échelle représentent 30  $\mu\text{m}$ .

### III.2.c Relargage du saccharose

Les tests de relargage sont tous réalisés avec une émulsion contenant 0,3 M de NaCl et 60 mg/mL de saccharose, soit au total 180 mg de saccharose introduits en phase aqueuse. Les lavages sont effectués avec des phases aqueuses contenant 0,15 M de NaCl. A l'issue des étapes de lavages présentés au paragraphe précédent, l'émulsion peut être déstabilisée pour relarguer le saccharose. Pour cela, on place la membrane de dialyse contenant l'émulsion dans 90 mL de phase aqueuse à pH 1 et 0,15 M en NaCl. La quantité de phase aqueuse contre laquelle est réalisée la dialyse a été diminuée par rapport aux lavages de façon à faciliter la détection du saccharose relargué. L'émulsion est observée après une demi heure et est bien devenue directe. L'émulsion est laissée à dialyser pendant trois jours avant mesure de la concentration en saccharose en phase aqueuse externe à la membrane de dialyse de façon à assurer que l'équilibre soit atteint (il a été vérifié que les concentrations de saccharose détecté dans la phase aqueuse externe de l'émulsion et dans la phase aqueuse externe à la membrane de dialyse étaient identiques à l'issue de ces trois jours). La concentration en saccharose est alors mesurée à l'aide du kit dans la phase aqueuse externe à la membrane de dialyse, après avoir ajusté le pH de l'échantillon autour de 7 par ajout de NaOH. Les concentrations obtenues suite aux différents lavages sont présentées sur le TABLEAU III.8.

Étape considérée	Concentration mesurée en phase aqueuse externe	Masse de saccharose correspondante
Dialyse 1	620 µg/mL	154,6 mg
Dialyse 2	22 µg/mL	5,4 mg
Dialyse 3	5 µg/mL	1,3 mg
Dialyse 4	0,1 µg/mL	0,05 mg
Dialyse à pH 1	3,8 mg/mL	3,4 mg

TABLEAU III.8 – Concentration de saccharose mesurée à l'issue des différentes étapes de dialyse, et masse de saccharose effective correspondante.

L'ajout d'un cargo dans nos émulsions peut nous permettre de déterminer le taux d'encapsulation de nos émulsions doubles, c'est-à-dire à la proportion d'eau constituant initialement la phase aqueuse interne. Connaissant la concentration en saccharose introduite, qui ne devrait pas varier au sein des gouttelettes d'eau pendant les lavages car leur taille n'est pas modifiée au cours des lavages, la masse de saccharose détectée après déstabilisation permet de remonter au volume d'eau interne et donc au taux d'encapsulation. Ici, 3,4 mg de saccharose sont relargués, ce qui correspondrait à un taux d'encapsulation de 1,9%. La reproduction à l'identique de la même expérience a conduit au relargage de 3,3 mg de saccharose, soit 1,8% d'encapsulation. Ces valeurs paraissent très faibles par rapport aux images observées. Nous avons réalisé une estimation grossière du taux d'encapsulation de nos émulsions en mesurant les rayons des gouttes d'eau et d'huile, et en déduisant le rapport  $\frac{\text{volume d'eau interne}}{\text{volume d'huile}}$ . Le volume d'eau total étant égal au volume d'huile, ce rapport permet d'estimer la valeur du taux d'encapsulation. Cette mesure a été réalisée manuellement afin de prendre en compte la totalité des gouttes. Par cette méthode, nous obtenons un taux d'encapsulation de 5,6%,

probablement sous-estimé car de nombreuses gouttes d'eau ne sont pas prises en compte car trop petites, ou bien hors du plan où l'image est prise. A titre de comparaison, pour l'émulsion formée avec du toluène et stabilisée par du PS<sub>40</sub>-*b*-P(S<sub>21</sub>-*stat*-DMAEMA<sub>68</sub>) présentée à la FIGURE III.24(b), Marine Protat avait mesuré par conductimétrie un taux d'encapsulation de 34%. Il est donc vraisemblable que notre taux d'encapsulation soit supérieur à la valeur estimée. La quantité de saccharose relarguée paraît donc très faible.

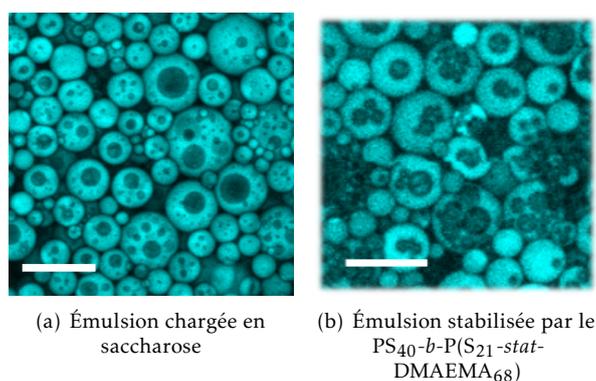


FIGURE III.24 – Comparaison des taux d'encapsulation de (a) une émulsion chargée en saccharose après formation et (b) une émulsion eau/toluène stabilisée par le copolymère PS<sub>40</sub>-*b*-P(S<sub>21</sub>-*stat*-DMAEMA<sub>68</sub>) dont le taux d'encapsulation est de 34%. Les barres d'échelle représentent 30  $\mu$ m.

En outre, la quantité totale de saccharose récupérée au cours de l'ensemble des lavages est de 164,8 mg ; soit une perte de 15,2 mg de saccharose.

La courbe d'étalonnage du kit K-SUFRG a été réalisée pour de simples solutions aqueuses de saccharose. Le milieu dans lequel évolue le saccharose lors de nos expériences est en réalité beaucoup plus complexe. Nous avons donc commencé par nous assurer que la quantité de saccharose détectée par le kit était inchangée en présence d'huile et de polymère, et pour différents pH. Pour cela, nous avons placé au contact dans des piluliers en verre une phase aqueuse à pH donné et à 0,15 M en NaCl contenant 60 mg/mL de saccharose et une phase huile contenant ou non du polymère à 5 mg/mL. Nous avons suivi sur 7 jours la quantité de saccharose détectée en phase aqueuse. Cette durée a été choisie car elle correspond à la durée totale de nos expériences de lavages puis relargage. Nous avons étudié 3 pH différents : pH 1 qui correspond au pH de déstabilisation, pH 3 qui est le pH initial de la phase aqueuse des émulsions étudiées, et pH 8 (ajusté par un tampon phosphate) qui correspond au pH d'équilibre de l'émulsion.

Les concentrations mesurées pour les différents échantillons varient entre 88% et 96% de la concentration réellement introduite, et aucune évolution significative de la concentration n'a pu être observée au cours du temps, comme présenté à la FIGURE III.25. Il n'y a donc *a priori* pas de soucis de détection du saccharose dans les conditions étudiées, mimant les conditions réelles de nos mesures lors des lavages et du relargage. Cependant, les concentrations sont en moyenne plus faibles que les concentrations réellement introduites, ce qui pourrait expliquer la perte apparente de 8% du saccharose lors de ces expériences de lavages et relargage.

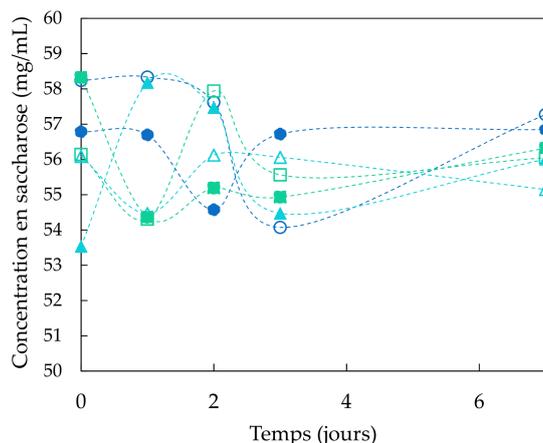


FIGURE III.25 – Évolution sur 7 jours de la concentration en saccharose mesurée avec le kit K-SUFRG pour différents échantillons contenant 1,5 mL de phase aqueuse contenant 0,15 M de NaCl, et 1,5 mL de phase huile Miglyol® 812 contenant ou non du polymère à 5 mg/mL : ○ = pH 1, sans polymère; ● = pH 1, avec polymère; △ = pH 3, sans polymère; ▲ = pH 3, avec polymère; □ = pH 8, sans polymère; ■ = pH 8, avec polymère.

Deux hypothèses au moins sont alors possibles pour expliquer la faible concentration relarguée après déstabilisation de l'émulsion :

- le saccharose *fuit* au cours des différents lavages, c'est-à-dire est transporté par des micelles de polymères hors des gouttes internes pour équilibrer les concentrations en saccharose en phase aqueuse interne et externe;
- le saccharose n'est pas réellement libéré lors de la déstabilisation, mais reste à l'interface eau/huile du fait d'interactions copolymère / saccharose et n'est par conséquent pas détectable.

La diffusion de la molécule encapsulée au travers de la phase huile a été observée dans la littérature pour de nombreux systèmes<sup>33-35</sup>, et est d'ailleurs mise à profit pour libérer un composé de façon passive en phase aqueuse externe. Le saccharose étant insoluble en phase huile, il est nécessairement transporté au sein de micelles gonflées d'eau. Comme nous n'avons pas vu d'évolution de la taille des gouttelettes internes au cours des lavages, si le saccharose fuit hors de la phase aqueuse interne, il y a probablement une partie de l'eau externe qui passe en phase aqueuse interne pour compenser. Il est aussi possible que le saccharose interagisse avec l'interface, ou que ces deux phénomènes agissent conjointement.

**Étude de l'hypothèse de la fuite du saccharose** La première hypothèse peut être vérifiée en encapsulant dans les émulsions une molécule de trop grande taille pour être transportée par les micelles de polymères. Nous avons choisi d'utiliser un polymère de sucre, le mannane, qui est un polymère de mannose.

La première étape de cette étude consiste à s'assurer qu'il est possible de former des émulsions chargées en mannane. Nous avons travaillé avec un polymère comprenant des chaînes entre 34 000 et 62 500 g/mol. La méthode de formation des émulsions chargées en mannane est identique à celle des émulsions chargées en saccharose. La concentration de mannane introduite est de 1 mg/mL. Nous avons constaté que les émulsions formées à partir d'une phase aqueuse de pH

initial de 3 étaient assez instables, les gouttes internes se vidant rapidement. Les émulsions à pH initial de 6 sont nettement plus stables mais elles finissent par se vider également de leurs gouttes internes et sont au bout de 3 mois presque directes, comme présenté au TABLEAU III.9. Nous avons malgré tout réalisé des tests de lavage avec une émulsion chargée en mannane, ayant une phase aqueuse de pH initial de 6 (pour une meilleure stabilité) et une concentration en NaCl de 0,3 M (de façon à être dans les mêmes conditions de concentration en NaCl que pour les expériences réalisées avec le saccharose).

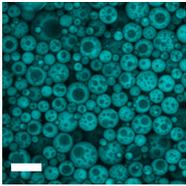
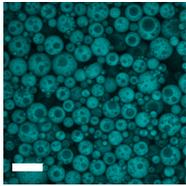
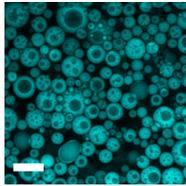
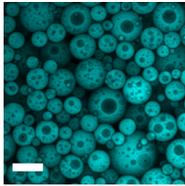
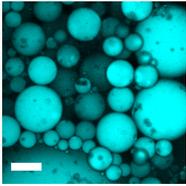
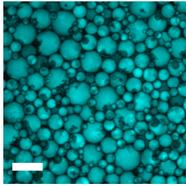
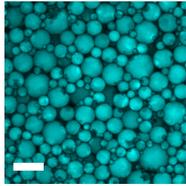
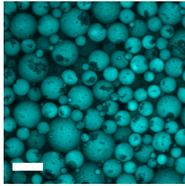
Concentration en NaCl	0,3 M	1 M	0,3 M	1 M
pH initial de la phase aqueuse	3	3	6	6
Émulsions juste après formation				
Émulsions un an après formation				

TABLEAU III.9 – Émulsions obtenues en présence de 1 mg/mL de mannane, juste après formation et après un an de conservation à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les barres d'échelle représentent 30  $\mu\text{m}$ .

Le mannane a été quantifié par une méthode de détection UV/visible des carbohydrates utilisée par Plata et son équipe<sup>36</sup>, inspirée du test de Molisch. Celle-ci consiste à mélanger 1 équivalent de solution aqueuse de carbohydrates (ici le mannane) avec 1 équivalent de solution aqueuse de phénol à 5% en masse et 5 équivalents d'acide sulfurique concentré. La présence d'acide engendre un réarrangement des cycles des sucres en solution, et des molécules de phénol viennent s'ajouter sur la molécule réarrangée, conduisant à la formation d'un composé coloré car présentant de nombreuses délocalisations. La solution devient aussitôt rouge orangée. Elle est ensuite laissée reposer 10 min à température ambiante puis 20 min à l'étuve à 30°C avant mesure d'absorbance à 488 nm. Une droite d'étalonnage est établie avec des solutions de concentrations connues et présentée en Annexe B.4. La reproductibilité n'est pas excellente, mais cette technique permet malgré tout de quantifier des concentrations en mannane comprises entre 15 et 200 mg/L.

Les étapes de lavages de l'émulsion chargée en mannane furent réalisées selon le même protocole que les émulsions chargées en saccharose, à une exception près : le mannane ayant une masse molaire supérieure au seuil de coupure des pores de la membrane de dialyse alors utilisée, nous

avons utilisé une membrane avec des pores plus larges, laissant passer des masses molaires jusqu'à 100 000 g/mol. Ces pores sont également suffisamment grands pour laisser passer le copolymère : contrairement aux expériences réalisées avec le saccharose, la phase aqueuse externe à la membrane de dialyse contiendra donc du copolymère.

Lors des tests de quantification du mannane réalisés sur les différentes phases aqueuses de lavages (éventuellement concentrées à l'évaporateur rotatif), la coloration obtenue pour la solution après ajout de l'acide sulfurique est cette fois bleutée au lieu d'orangée. La coloration se maintient après les 30 min de repos. Cette coloration bleue apparaît à l'identique si les mêmes étapes sont réalisées sur une émulsion ne contenant pas de mannane. La coloration est donc probablement due à la présence du copolymère dans les eaux de dialyse récupérées. La FIGURE III.26 présente les spectres obtenus pour les dialyses 1 et 3 pour le "blanc", c'est-à-dire l'émulsion sans mannane, et pour l'émulsion chargée en mannane. Pour la dialyse 1, un très léger signal est obtenu à 488 nm en l'absence de mannane, mais le pic est plus prononcé en présence du polymère de sucre. En revanche, les deux spectres sont très différents lors de la dialyse 3, où un maximum d'absorbance est observé vers 600 nm en l'absence de mannane, l'intensité du signal à 488 nm étant beaucoup plus faible. La ligne de base est également très élevée, à 0,2. Cette ligne de base élevée est conservée en présence de mannane, mais on retrouve un maximum d'absorbance à 488 nm.

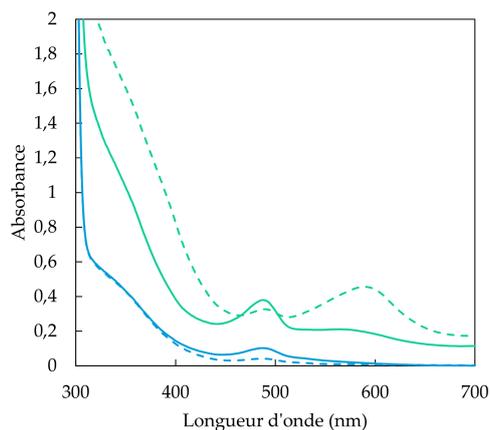


FIGURE III.26 – Spectres UV/visibles obtenus pour les eaux de dialyse 1 et 3, en pointillé en absence de mannane et en trait plein en présence de mannane. — Dialyse 1, — Dialyse 3. Attention, l'intensité relative des différents spectres présentés sur cette figure n'est pas significative : en effet, les phases aqueuses ont été concentrées à des taux différents. Ces taux de concentration ont été pris en compte dans les calculs de concentration de mannane.

Nous pouvons supposer qu'il se produit une réaction parasite entre les réactifs (acide sulfurique et phénol) et le polymère stabilisant nos émulsions, conduisant à la modification du signal UV/visible et à l'impossibilité de détecter plus précisément le mannane.

Nous pouvons évaluer la quantité de mannane récupéré à chaque étape de dialyse en soustrayant la valeur d'absorbance à 488 nm pour le blanc de la valeur obtenue pour l'émulsion chargée en mannane. En faisant la somme des quantités récupérées à chaque étape, 4 mg de mannane sont obtenus, soit 133% de la quantité réellement introduite, ce avant même d'avoir libéré le mannane encapsulé au sein des gouttes internes.

Cette méthode de détection, parasitée par le présence de polymère, pose donc un réel problème.

Faute de temps, et du fait de la stabilité moyenne des émulsions chargées en mannane, nous avons décidé de ne pas poursuivre cette étude, bien que son intérêt dans la compréhension des mécanismes soit important. Pour poursuivre l'étude, il faudrait mettre en place une méthode de quantification plus précise et pour laquelle la présence de polymère en solution ne risquerait pas de perturber la mesure.

En revanche, il pourrait être intéressant de voir si cette réaction parasite est quantitative et permet de remonter à une concentration de polymère. Cette méthode pourrait alors nous aider à répondre à la question du partitionnement du copolymère dans chaque phase lors de l'émulsification.

**Étude de l'hypothèse de l'interaction du saccharose avec l'interface** Le saccharose, comme tous les sucres, n'est pas réputé pour avoir un effet tensioactif mais au contraire pour engendrer une légère augmentation de tension de surface liée à la création de liaisons hydrogènes entre l'eau et la molécule qui conduit à une augmentation de l'énergie de cohésion et donc de la tension de surface<sup>31</sup>. Pour le vérifier, nous avons mesuré la tension de surface d'une solution de saccharose par la méthode d'arrachement de la lame de Wilhelmy<sup>37</sup>. Une vingtaine de millilitres de solution sont déposés dans une cuve préalablement lavée et rincée. La lame de platine, lavée dans un mélange sulfochromique, est doucement amenée au contact de la solution. La tension exercée sur la lame est ensuite mesurée chaque minute jusqu'à stabilisation à l'aide d'un tensiomètre K10 de la marque Kruss. Les valeurs de tension mesurées, présentées à la FIGURE III.27(a) sont bien inférieures à la tension de surface de l'eau pure. Ce phénomène peut être expliqué par la présence d'impuretés tensioactives dans le produit commercial. Ces impuretés pourraient venir se mettre à l'interface eau/huile de nos émulsions et ainsi modifier l'affinité du saccharose pour celle-ci, ce qui pourrait expliquer que le saccharose ne soit pas réellement relargué lors de la déstabilisation de l'émulsion.

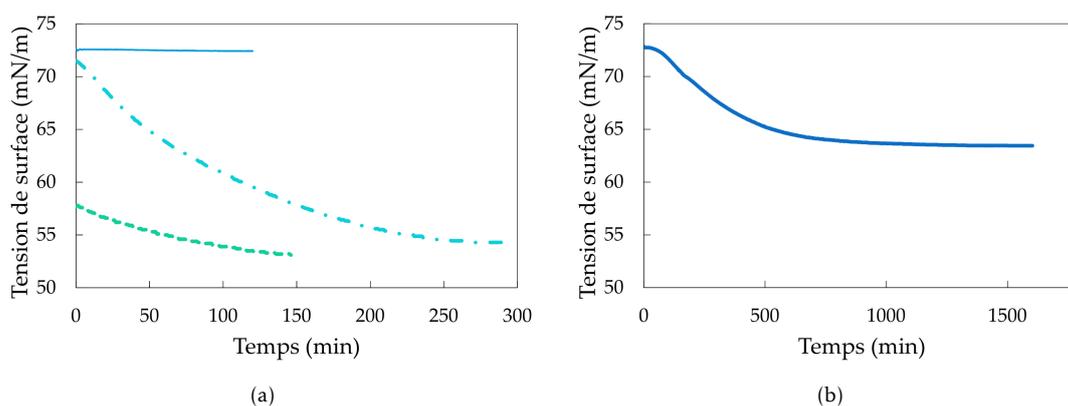


FIGURE III.27 – Mesures de tension de surface de solutions de saccharose à l'aide de la méthode d'arrachement de la lame de Wilhelmy. (a) Solutions avant moussage, — Eau pure, - - - Solution de saccharose à 60 mg/mL, -- Solution de saccharose à 60 mg/mL, et 0,3 M en NaCl, (b) — Solution de saccharose à 60 mg/mL, et 0,3 M en NaCl moussée.

Pour essayer de se débarrasser de cette impureté, la solution de saccharose est *moussée* : de l'azote est injecté par le bas de la solution, ce qui crée une mousse en surface (où seront *a priori* localisées les impuretés). Cette mousse est retirée par aspiration. La tension de surface de cette

solution moussée est également mesurée (cf FIGURE III.27(b)). La chute de tension est beaucoup plus lente mais on peut constater que le moussage n'a pas suffi à débarrasser le saccharose de ses impuretés, bien qu'une partie semble avoir été éliminée.

Nous pourrions envisager une recristallisation pour améliorer la pureté de notre saccharose, en identifiant la nature des impuretés et en choisissant un solvant dans lequel elles sont plus solubles que le saccharose.

Cependant, il nous semble peu probable que ces impuretés puissent être à l'origine du relargage incomplet obtenu pour notre système. En effet, malgré leur léger effet tensioactif, elles ne semblent pas du tout perturber le système lors de la formation des émulsions puisque des émulsions doubles très stables ont pu être obtenues. Il paraîtrait donc surprenant que leur présence affecte le système uniquement à l'étape du relargage.

Une autre hypothèse est la capacité du saccharose à former des liaisons hydrogènes<sup>38-40</sup> et à pouvoir se lier par ce biais au bloc PDMAEMA du copolymère de façon relativement forte, ce qui empêcherait sa réelle libération en solution. Des exemples de liaisons hydrogènes possibles entre le saccharose et le DMAEMA sont donnés à la FIGURE III.28.

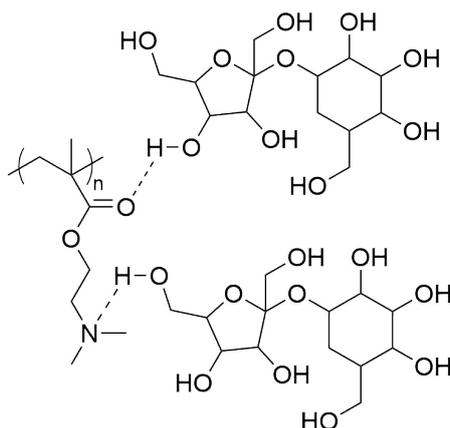


FIGURE III.28 – Exemples de formation de liaisons hydrogènes DMAEMA/saccharose.

La présence de ces interactions pourrait également expliquer la mauvaise stabilité des émulsions formées en présence de mannane. Le mannane, comme le saccharose, se fixe à la chaîne PDMAEMA par des liaisons hydrogènes à l'interface eau/huile. Du fait de ces liaisons avec un polymère, le bloc hydrophile du copolymère devient beaucoup plus volumineux en phase aqueuse, et la stabilisation d'interfaces tournées vers l'eau devient très défavorable, comme illustré de façon schématique à la FIGURE III.29. Les émulsions doubles évoluent donc vers des émulsions directes, probablement par coalescence des gouttelettes internes avec la phase aqueuse externe.

Pour essayer de caractériser ces éventuelles interactions, nous avons dissous un homopolymère de PDMAEMA dans des solutions aqueuses de saccharose à 60 mg/mL, 0,15 M en NaCl, et à différents pH : 1 et 3 ajustés par ajout d'HCl, 6 et 8 ajustés par un tampon phosphate. Les objets formés dans ces phases aqueuses sont suivis par DLS au cours du temps (Zetasizer Malvern Nano ZS utilisé en rétrodiffusion) et comparés à ceux obtenus pour les mêmes solutions en l'absence de saccharose. On peut supposer que si le saccharose peut se lier au polymère, cela aura un impact sur les objets formés, la taille des édifices "chaîne + saccharose" étant *a priori* plus élevée que

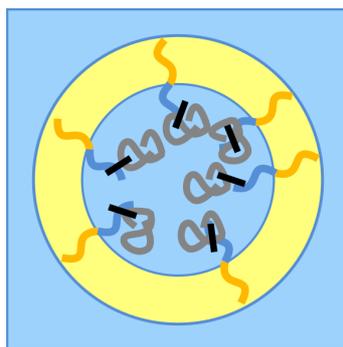


FIGURE III.29 – Schéma représentant les interactions copolymères/mannane de façon simplifiée, et leur incidence sur la conformation et la courbure spontanée du copolymère. Le mannane est représenté par des pelotes grises, et les liaisons hydrogènes par des rectangles noirs. Pour plus de lisibilité, le globule représenté ne contient qu'une seule goutte d'eau, et seul le copolymère à l'interface gouttelettes internes/huile a été représenté.

les chaînes seules. Les corrélogrammes obtenus sont cependant identiques, ce sur 20 jours, ne permettant donc pas de confirmer l'existence d'interactions saccharose/copolymère.

D'autres techniques de caractérisation pourraient être envisagées pour étudier ces interactions, comme par exemple la titration calorimétrique isotherme qui permet de détecter la formation de liaisons entre deux composés.

### III.3 Conclusions

Nous sommes capables de former des émulsions doubles chargées en saccharose stabilisées par le copolymère PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub> dans des conditions variées de pH et de concentrations en sel. Ces émulsions sont stables sur l'année durant laquelle elles ont été étudiées. Il est également possible de *laver* la phase aqueuse externe de l'émulsion double par dialyse, de façon à s'affranchir de la présence du saccharose à l'extérieur, ceci sans déstabilisation de l'émulsion ni modifications significatives de sa morphologie. Cette étape est nécessaire pour pouvoir dans un second temps suivre le relargage du saccharose lors de la déstabilisation de l'émulsion.

Les émulsions doubles ainsi lavées peuvent être déstabilisées par mise au contact avec une phase aqueuse à pH 1 pour donner une émulsion directe. Nous sommes ainsi capable de relarguer le saccharose de façon contrôlée sous l'action d'un *stimulus*. Cependant, les résultats obtenus pour le relargage montrent que la quantité de saccharose récupérée est faible et ne correspond qu'à 2% de la quantité initialement introduite. Le taux d'encapsulation de nos émulsions nous paraissant supérieur à 2%, nous pouvons supposer que le relargage n'est pas aussi efficace qu'il le pourrait, soit parce que l'émulsion s'est vidée du saccharose présent dans les gouttes internes lors des différentes étapes de lavages, soit parce qu'une certaine quantité de celui-ci est piégé à l'interface. Nous n'avons malheureusement pas été en mesure de confirmer avec certitude l'une ou l'autre de ces hypothèses, même s'il semble probable que le saccharose crée des liaisons hydrogènes avec le copolymère qui pourraient gêner sa libération.

Le saccharose étant une molécule modèle n'ayant pas de réel intérêt à être protégée dans une émulsion multiple, nous avons choisi de poursuivre le travail avec une molécule d'intérêt, la catéchine.

A RETENIR DE CE CHAPITRE :

- Des émulsions doubles E/H/E stables sur plus de deux ans ont été obtenues avec le Miglyol<sup>®</sup> 812 et le myristate d'isopropyle, sabilisées par le copolymère PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub>.
- Avec le Miglyol<sup>®</sup> 812, seules des émulsions doubles ont pu être stabilisées quel que soit le copolymère utilisé. L'architecture des copolymères a plus d'importance pour les émulsions formées avec le myristate d'isopropyle. Des interactions (par liaisons hydrogènes?) entre les blocs PDMAEMA et les huiles (acides gras libres?) pourraient être à l'origine de ces différences.
- Nos émulsions doubles peuvent être déstabilisées par diminution du pH, via la migration dans des micelles de copolymère de protons depuis la phase aqueuse externe ou d'eau depuis la phase aqueuse interne.
- Des émulsions doubles stables ont été obtenues en présence de saccharose pour toutes les concentrations en NaCl et en saccharose étudiées. Ces émulsions peuvent être lavées par dialyse pour s'affranchir de la présence du saccharose en phase aqueuse externe sans être déstabilisées.
- Il est possible de relarguer du saccharose encapsulé dans les émulsions après une diminution du pH. La quantité relarguée est faible, ce qui pourrait être expliqué par une fuite du saccharose vers la phase aqueuse externe lors des lavages ou par des interactions entre le bloc DMAEMA et le saccharose, probablement par des liaisons hydrogènes.

## Bibliographie

- [1] Protat, M. Formation d'émulsions multiples stimulables en une seule étape d'émulsification : effet du sel et évolution vers des architectures biocompatibles. Ph.D. thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, 2016.
- [2] Xin, W.; Hong, Y.; Huang, Z.; Liu, S. Moisturizer Suitable for Being Used on Oily Skin and Preparation Method Thereof - Brevet N°CN104997653 (A). 2015; Brevet n°CN104997653 (A).
- [3] Tang, Y.; Qian, B. Anti-Wrinkle Anti-Aging Eye Cream for Pregnant Women and Preparation Method Thereof - Brevet N°CN103006524 (A). 2013; Brevet n°CN103006524 (A).
- [4] Lv, N. Gentle Moisture Makeup Removing Lotion and Preparation Method Therefor - Brevet N°WO2016090647 (A1). 2016; Brevet n°WO2016090647 (A1).
- [5] Guo, X. Anti-Aging Moisturizer - Brevet N°CN106924136 (A). 2017; Brevet n°CN106924136 (A).
- [6] Chen, S.; Ni, Y.; Liu, J.; Li, X.; Wang, G. Skin Care Product for Preventing and Treating Striae Gravidarum and Preparation Method of Skin Care Product - Brevet N°CN106913485 (A). 2017; Brevet n°CN106913485 (A).
- [7] Lu, Y.; Wu, Y.; Wu, C.; Shen, H.; You, R.; Li, A. Preparation Method of Moistening Cream Containing *Dendrobium Officinale* - Brevet N°CN106420527 (A). 2017; Brevet n°CN106420527 (A).
- [8] Benichou, A.; Aserin, A.; Garti, N. Polyols, High Pressure, and Refractive Indices Equalization for Improved Stability of W/O Emulsions for Food Applications. *Journal of Dispersion Science and Technology* **2001**, *22*, 269–280.
- [9] Patel, N.; Schmid, U.; Lawrence, M. J. Phospholipid-Based Microemulsions Suitable for Use in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 7817–7824.
- [10] Chatzidaki, M. D.; Mitsou, E.; Yaghmur, A.; Xenakis, A.; Papadimitriou, V. Formulation and Characterization of Food-Grade Microemulsions as Carriers of Natural Phenolic Antioxidants. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **2015**, *483*, 130–136.
- [11] Li, Y.; Yokoyama, W.; Xu, S.; Zhu, S.; Ma, J.; Zhong, F. Formation and Stability of W/O Microemulsion Formed by Food Grade Ingredients and Its Oral Delivery of Insulin in Mice. *Journal of Functional Foods* **2017**, *30*, 134–141.
- [12] Besnard, L.; Protat, M.; Malloggi, F.; Daillant, J.; Cousin, F.; Pantoustier, N.; Guenoun, P.; Perrin, P. Breaking of the Bancroft Rule for Multiple Emulsions Stabilized by a Single Stimulable Polymer. *Soft Matter* **2014**, *10*, 7073–7087.
- [13] Besnard, L.; Marchal, F.; Paredes, J. F.; Daillant, J.; Pantoustier, N.; Perrin, P.; Guenoun, P. Multiple Emulsions Controlled by Stimuli-Responsive Polymers. *Advanced Materials* **2013**, *25*, 2844–2848.
- [14] Besnard, L. Mécanismes d'inversion Dans Les Émulsions Stimulables et Réversibles. Ph.D. thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 2013.
- [15] Adamson, A. *Physical Chemistry of Surfaces, Fifth Edition*; John Wiley & Sons, 1990; Vol. 110.
- [16] Viades-Trejo, J.; Gracia-Fadrique, J. Spinning Drop Method : From Young–Laplace to Vonnegut. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **2007**, *302*, 549–552.
- [17] Cayias, J. L.; Schechter, R. S.; Wade, W. H. The Measurement of Low Interfacial Tension via the Spinning Drop Technique. *ACS Symposium Series* **1975**, *8*, 234–247.
- [18] Danino, D.; Gupta, R.; Satyavolu, J.; Talmon, Y. Direct Cryogenic-Temperature Transmission Electron Microscopy Imaging of Phospholipid Aggregates in Soybean Oil. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, *249*, 180–186.
- [19] Miller, A. C.; Bershteyn, A.; Tan, W.; Hammond, P. T.; Cohen, R. E.; Irvine, D. J. Block Copolymer Micelles as Nanocontainers for Controlled Release of Proteins from Biocompatible Oil Phases. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 732–741.

- [20] Ben-Barak, I.; Talmon, Y. Direct-Imaging Cryo-SEM of Nanostructure Evolution in Didodecyltrimethylammonium Bromide-Based Microemulsions. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **2012**, *226*, 665–674.
- [21] Wolf, L.; Hoffmann, H.; Talmon, Y.; Teshigawara, T.; Watanabe, K. Cryo-TEM Imaging of a Novel Microemulsion System of Silicone Oil with an Anionic/Nonionic Surfactant Mixture. *Soft Matter* **2010**, *6*, 5367–5374.
- [22] Traul, K. A.; Driedger, A.; Ingle, D. L.; Nakhasi, D. Review of the Toxicologic Properties of Medium-Chain Triglycerides. *Food and Chemical Toxicology* **2000**, *38*, 79–98.
- [23] Feldmann, R. J.; Macek, T. J.; Shoop, C. E.; Pincus, I. D. Emollient Gel Comprising Lanolin Alcohol, Microcrystalline Wax and a Liquid Fatty Acid Ester - Brevet N°US3210248A. 1965; Brevet n°US3210248A.
- [24] Kabalnov, A.; Wennerström, H. Macroemulsion Stability : The Oriented Wedge Theory Revisited. *Langmuir* **1996**, *12*, 276–292.
- [25] Protat, M.; Bodin-Thomazo, N.; Malloggi, F.; Daillant, J.; Campbell, R. A.; Fragneto, G.; Watkins, E. B.; Perrin, P.; Pantoustier, N.; Guenoun, P. Neutron Reflectivity Measurements at the Oil/Water Interface for the Study of Stimuli-Responsive Emulsions\*. *The European Physical Journal E* **2018**, *41*, 85.
- [26] Plamper, F. A.; Ruppel, M.; Schmalz, A.; Borisov, O.; Ballauff, M.; Müller, A. H. E. Tuning the Thermoresponsive Properties of Weak Polyelectrolytes : Aqueous Solutions of Star-Shaped and Linear Poly(N,N-Dimethylaminoethyl Methacrylate). *Macromolecules* **2007**, *40*, 8361–8366.
- [27] Sedlak, M. Domain Structure of Polyelectrolyte Solutions : Is It Real? *Macromolecules* **1993**, *26*, 1158–1162.
- [28] Protat, M.; Bodin, N.; Gobeaux, F.; Malloggi, F.; Daillant, J.; Pantoustier, N.; Guenoun, P.; Perrin, P. Biocompatible Stimuli-Responsive W/O/W Multiple Emulsions Prepared by One-Step Mixing with a Single Diblock Copolymer Emulsifier. *Langmuir* **2016**, *32*, 10912–10919.
- [29] Slade, P. *Handbook of Fiber Finish Technology*; Routledge, 1998.
- [30] Feitosa, K.; Marze, S.; Saint-Jalmes, A.; Durian, D. J. Electrical Conductivity of Dispersions : From Dry Foams to Dilute Suspensions. *Journal of Physics : Condensed Matter* **2005**, *17*, 6301.
- [31] Docoslis, A.; Giese, R. F.; van Oss, C. J. Influence of the Water–air Interface on the Apparent Surface Tension of Aqueous Solutions of Hydrophilic Solutes. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **2000**, *19*, 147–162.
- [32] Bhattacharyya, L., Rohrer, J. S., Eds. *Applications of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Products*; Wiley-Blackwell, 2012; pp 455–456.
- [33] Bonnet, M.; Cansell, M.; Berkaoui, A.; Ropers, M. H.; Anton, M.; Leal-Calderon, F. Release Rate Profiles of Magnesium from Multiple W/O/W Emulsions. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 92–101.
- [34] Jiménez-Alvarado, R.; Beristain, C. I.; Medina-Torres, L.; Román-Guerrero, A.; Vernon-Carter, E. J. Ferrous Bisglycinate Content and Release in W1/O/W2 Multiple Emulsions Stabilized by Protein–polysaccharide Complexes. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 2425–2433.
- [35] Lutz, R.; Aserin, A.; Wicker, L.; Garti, N. Release of Electrolytes from W/O/W Double Emulsions Stabilized by a Soluble Complex of Modified Pectin and Whey Protein Isolate. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **2009**, *74*, 178–185.
- [36] Plata, M. R.; Koch, C.; Wechselberger, P.; Herwig, C.; Lendl, B. Determination of Carbohydrates Present in *Saccharomyces Cerevisiae* Using Mid-Infrared Spectroscopy and Partial Least Squares Regression. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405*, 8241–8250.
- [37] Wilhelmy, L. Über Die Abhängigkeit Der Capillaritäts-Constanten Des Alkohols von Substanz Und Gestalt Des Benetzten Festen Körpers. *Annalen der Physik* **1863**, *195*, 177–217.
- [38] Bock, K.; Lemieux, R. U. The Conformational Properties of Sucrose in Aqueous Solution : Intramolecular Hydrogen-Bonding. *Carbohydrate Research* **1982**, *100*, 63–74.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- [39] Allison, S. D. ; Chang, B. ; Randolph, T. W. ; Carpenter, J. F. Hydrogen Bonding between Sugar and Protein Is Responsible for Inhibition of Dehydration-Induced Protein Unfolding. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1999**, 365, 289–298.
- [40] Taylor, L. S. ; Zografi, G. Sugar–polymer Hydrogen Bond Interactions in Lyophilized Amorphous Mixtures. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2000**, 87, 1615–1621.

## Chapitre IV

# Encapsulation et relargage de (+)-catéchine dans des émulsions doubles stabilisées par des copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA

### Sommaire

---

<b>I</b>	<b>Étude bibliographique de la catéchine</b>	129
I.1	Propriétés thérapeutiques de la catéchine	129
I.1.a	Pouvoir antioxydant et propriétés anti-inflammatoires	129
I.1.b	Effets anticancérigènes	130
I.1.c	Propriétés antibactériennes et antivirales	131
I.1.d	Action contre l'obésité et le diabète	131
I.1.e	Conclusions	131
I.2	Stabilité de la catéchine	132
I.2.a	Sensibilité à la température	132
I.2.b	Sensibilité au pH	132
I.2.c	Formation de dimères et d'oligomères de catéchine	133
I.2.d	Conclusion	134
<b>II</b>	<b>Étude expérimentale de la stabilité de la catéchine</b>	134
II.1	Évolution de la couleur des solutions, spectroscopie UV	134
II.2	Étude par chromatographie liquide	136
II.2.a	Mode opératoire	136
II.2.b	Résultats	136
II.2.c	Conclusions	138
II.3	Étude par RMN	139
II.3.a	Mode opératoire	139
II.3.b	Résultats	139
II.3.c	Conclusions	140

II.4	Étude par chromatographie d'exclusion stérique . . . . .	140
II.5	Conclusion . . . . .	140
<b>III</b>	<b>Evolution du pouvoir antioxydant de la catéchine . . . . .</b>	<b>141</b>
III.1	Méthode de mesure du pouvoir antioxydant . . . . .	141
III.1.a	Protocole de mesures . . . . .	141
III.1.b	Analyse des données . . . . .	142
III.1.c	Réalisation d'une gamme d'étalonnage Trolox . . . . .	142
III.1.d	Mesure des échantillons de catéchine . . . . .	143
III.2	Mesure du pouvoir antioxydant de la catéchine à différents pH . . . . .	143
III.2.a	Échantillons de catéchine étudiés . . . . .	143
III.2.b	Résultats . . . . .	144
<b>IV</b>	<b>Formation d'émulsions chargées en catéchine à l'Ultra-Turrax® . . . . .</b>	<b>145</b>
IV.1	Préparation des échantillons . . . . .	145
IV.2	Émulsions formées en présence de catéchine . . . . .	146
IV.2.a	Formation d'émulsions chargées en catéchine au pH d'équilibre du copolymère . . . . .	146
	Avec le Miglyol® 812 . . . . .	146
	Avec le myristate d'isopropyle . . . . .	148
	Mesures de tensions interfaciales . . . . .	148
	Conclusions . . . . .	149
IV.2.b	Tentatives de formation d'émulsions chargées en catéchine à des pH inférieurs à 6 . . . . .	149
IV.2.c	Conclusions . . . . .	150
IV.3	Lavages par dialyse des émulsions chargées en catéchine, relargage . . . . .	150
IV.3.a	Lavage des émulsions à pH 8 et relargage de la catéchine . . . . .	150
IV.3.b	Lavages des émulsions à des pH intermédiaires . . . . .	154
IV.4	Évolution du pouvoir antioxydant au sein des gouttelettes internes des émulsions . . . . .	157
IV.4.a	Mode opératoire . . . . .	157
IV.4.b	Comportements attendus . . . . .	158
IV.4.c	Résultats . . . . .	158
IV.4.d	Conclusions . . . . .	160
<b>V</b>	<b>Résultats préliminaires de coencapsulation de catéchine et curcumine au sein des émulsions . . . . .</b>	<b>160</b>
V.1	Mesures de solubilité de la curcumine dans différentes huiles . . . . .	161
V.2	Coencapsulation de catéchine et curcumine . . . . .	162
V.2.a	Formation des émulsions chargées en curcumine avec le Miglyol® 812 . . . . .	163
V.2.b	Utilisation de la Maisine® CC . . . . .	163
V.2.c	Conclusion . . . . .	164

---



cycle **B** (cf FIGURE IV.1). Ceux-ci sont susceptibles de donner un  $H^\bullet$  pour neutraliser un radical, conduisant ainsi à la formation d'un radical particulièrement stable car fortement délocalisé sur tout le cycle **B**<sup>14,15</sup> (cf FIGURE IV.2).

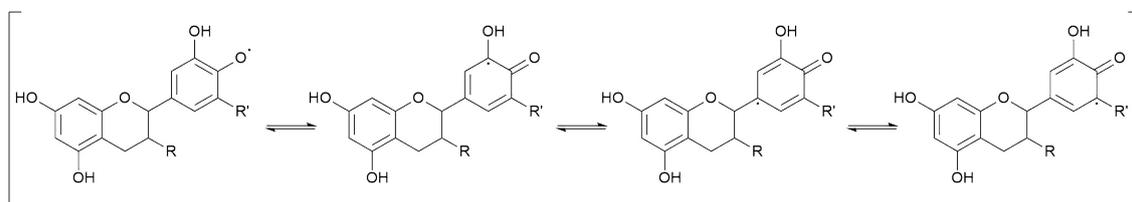


FIGURE IV.2 – Stabilisation par délocalisation du radical formé à partir des catéchines.

Ces molécules forment également, grâce aux deux groupes hydroxyles du cycle **B**, un ligand bidentate capable de chélater les ions métalliques qui catalysent la formation de radicaux libres, permettant de rendre ces ions inactifs<sup>16</sup>. Cette activité antioxydante des catéchines est cependant à nuancer par le fait que la catalyse métallique n'est pas le mécanisme principal à l'origine de la formation de radicaux *in vivo*. En effet les ions métalliques y sont le plus souvent liés à une protéine, ce qui les empêche d'agir en tant que catalyseur<sup>17,18</sup>.

De façon indirecte, les catéchines ont aussi une action inhibitrice sur l'activité de certains facteurs de transcription ou de certaines enzymes qui sont à l'origine de la formation de nombreux radicaux<sup>17,18</sup>.

Les propriétés anti-inflammatoires des catéchines sont corrélées à leurs qualités antioxydantes directes et indirectes. Tout d'abord, elles permettent d'inhiber l'action de certains facteurs de transcription qui induisent la production de radicaux lors d'une inflammation. De par leurs pouvoirs antioxydants, elles sont également à même de neutraliser ces radicaux une fois produits, permettant une diminution du stress oxydatif<sup>19</sup> qui fait suite à une inflammation.

### I.1.b Effets anticancérigènes

Il existe bon nombre de publications présentant les effets bénéfiques des catéchines sur les différents types de cancers<sup>20</sup> (peau<sup>21</sup>, foie<sup>22</sup>, poumon<sup>23</sup>, estomac<sup>24</sup>, pancréas<sup>25</sup>, sein<sup>26</sup>, vessie<sup>27</sup>, prostate<sup>28</sup>...). Les catéchines sont présentées comme ayant un effet préventif plutôt qu'un effet curatif, comme c'est souvent le cas pour les antioxydants. Les modes d'actions supposés sont nombreux, et peuvent différer suivant les cancers. Les catéchines, et surtout l'EGCG, inhibent notamment l'action de l'urokinase, une des enzymes qui permettent au cancer de se propager et de former des métastases. Des simulations ont permis de montrer que l'EGCG est capable de se lier à la protéine, bloquant deux des trois acides aminés de la triade catalytique (triplet d'acides aminés qui interviennent dans le site actif de l'enzyme) et la rendant ainsi inactive<sup>29</sup>. Les catéchines engendrent de plus l'apoptose (c'est-à-dire la mort cellulaire) des cellules cancéreuses, mais pas des cellules saines<sup>30</sup>, et inhibent le processus de formation de la tumeur en bloquant les signaux de transduction<sup>31</sup>.

### I.1.c Propriétés antibactériennes et antivirales

Les catéchines, en particulier l'EGCG, se sont également montrées efficaces contre la prolifération de bactéries. Ces molécules sont par exemple à l'origine de la perturbation de la composition en acides gras de la membrane des *Escherichia Coli* (bactéries normalement inoffensives dont certaines souches conduisent cependant à des infections urinaires<sup>32</sup>), ce qui engendre la mort cellulaire<sup>33</sup>. Elles peuvent aussi aider à prévenir la résistance aux antibiotiques développée par certaines bactéries, par exemple les staphylocoques dorés, à l'origine de la majorité des infections nosocomiales<sup>34</sup>. Enfin, l'EGCG pourrait avoir des propriétés de prévention contre le développement du virus du sida, de par sa capacité à se lier aux récepteurs auxquels le virus se fixe pour être répliqué, ainsi qu'à la membrane protéique du virus, inhibant donc dès le départ la propagation de l'infection<sup>35</sup>.

### I.1.d Action contre l'obésité et le diabète

Ces deux effets sont souvent présentés conjointement. Les catéchines auraient en effet une action préventive contre le diabète de type II, dont le déclenchement chez un patient est fortement corrélé à son environnement et à son mode de vie, le surpoids et l'obésité constituant des terrains particulièrement favorables à ce type de diabète.

L'administration de catéchines permet d'engendrer une perte de poids. Ainsi, une injection quotidienne de thé vert chez des rats à raison de 70 à 92 mg/kg conduit à une réduction du poids de 20 à 30% en 7 jours<sup>36</sup>. Ces résultats, qui paraissent étonnamment bons, sont cependant à nuancer. Cet effet est réversible : si le traitement est stoppé, le poids remonte rapidement. De plus, le corps "s'habitue" à la prise de catéchines et la dose nécessaire pour maintenir un poids stable augmente petit à petit. En outre, les effets observés par voie orale sont nettement moins spectaculaires, et c'est seulement sur le long terme que l'on peut observer une diminution légère du poids. Cette différence est due à la faible quantité de catéchines absorbée par l'organisme lors de l'administration par voie orale<sup>37</sup>.

Les raisons de cette baisse de poids sont multiples. Les catéchines modifient entre autres la façon dont sont émulsifiées les lipides, et diminuent leur digestibilité (la digestion des lipides étant réalisée par les protéines lipases, qui agissent à l'interface eau/lipide des gouttes d'émulsion)<sup>38</sup>. De plus, les catéchines semblent inhiber certains processus impliqués dans la formation du tissu adipeux<sup>39,40</sup>.

L'effet des catéchines sur le diabète est la combinaison de nombreuses actions différentes. On peut citer entre autres l'augmentation de l'activité des récepteurs à insuline<sup>41</sup> ainsi que de leur sensibilité<sup>42</sup>, et la diminution de production de glucose<sup>37</sup>.

### I.1.e Conclusions

Les propriétés qui vont particulièrement nous intéresser ici sont les pouvoirs antioxydant et anti-inflammatoire de la catéchine, pour le traitement des inflammations de l'intestin comme dans le cadre de la maladie de Crohn. Cette inflammation est liée à une surproduction de dérivés réactifs de l'oxygène (entre autres des radicaux libres) qui vont interagir avec la paroi intestinale et à terme la perméabiliser<sup>43</sup>. Malgré son hydrophilie, la catéchine est souvent mal absorbée par l'organisme. Lors de la digestion après ingestion, on la trouve cependant en concentration importante dans

l'intestin, où elle va pouvoir mettre à profit ses qualités de neutralisation et de prévention de la formation des radicaux<sup>43</sup> pour limiter l'inflammation et ses conséquences.

Cependant, la capacité des catéchines à réagir avec des espèces réactives dérivées de l'oxygène est aussi une de leurs principales faiblesses : elles sont très sensibles à l'oxydation et sont souvent vite dégradées quand elles se trouvent en solution aqueuse. L'encapsulation et la libération contrôlée de la catéchine au niveau de l'estomac permettraient de protéger la molécule pendant toute la durée du stockage, et ainsi de préserver ses propriétés antioxydantes. Une fois libérée, la catéchine pourrait alors agir au niveau de l'intestin pour en diminuer l'inflammation.

Dans la suite, nous allons nous intéresser aux différents mécanismes de déstabilisation de la catéchine.

## I.2 Stabilité de la catéchine

### I.2.a Sensibilité à la température

La stabilité des catéchines est souvent analysée dans le cadre de l'étude des propriétés du thé vert, c'est pourquoi beaucoup de groupes se sont intéressés à la dégradation des épicatechines à haute température. Tous rapportent que la dégradation des molécules est accentuée avec la température<sup>7</sup>. Ainsi, Chen et al.<sup>10</sup> évoquent une épimérisation (inversion de la configuration d'un des deux carbones asymétriques de la molécule) des *cis*-catéchines lorsqu'elles sont chauffées à 98°C, et Komatsu et al.<sup>44</sup> la transformation de l'EC en C à 121°C. De la même façon, Li et al.<sup>9</sup> rapportent que la quantité de catéchines *cis* présente en solution diminue de façon exponentielle au cours du temps lors d'un chauffage à 120°C, tandis que la quantité de composés *trans* augmente. La quantité de composés *trans* finit par se stabiliser, conduisant à un plateau dont l'existence est justifiée par les auteurs comme due à des réactions de dégradation, sans plus de précisions. La même équipe publie l'année suivante un article centré uniquement sur l'EGCG où ils démontrent que la dégradation à 80°C de cette molécule s'accompagne d'un brunissement de la solution, engendré par la formation de composés d'oxydation de poids moléculaires plus importants tels que les théaflavines, les théorubigines ou les théobrownines. L'épimérisation peut conduire à la formation de composés ayant un pouvoir antioxydant moins élevé (de façon générale les catéchines *cis* ont un meilleur pouvoir antioxydant que leur équivalents *trans*<sup>45</sup>), mais pas à la perte totale de cette propriété. En revanche, ce n'est pas forcément le cas si des oligomères sont formés.

### I.2.b Sensibilité au pH

Les catéchines sont décrites comme étant très instables à des pH supérieurs à 6<sup>1,7,46</sup>, et ce d'autant plus que la température est élevée<sup>10,44</sup>. Par exemple, Zhu et al.<sup>1</sup> observent une disparition complète des C ou EC présents en solution à pH 9 en seulement 4h ; tandis qu'à pH 7,4 20% de ces molécules subsistent au bout de 24 h, et la quasi totalité à des pH inférieurs ou égaux à 6. Chen et al.<sup>10</sup> constatent quant à eux qu'après 20 min en autoclave à 120°C, il ne reste que 20% de catéchines à pH 6, 55% à pH 5, et plus de 90% à pH inférieur ou égal à 4. Là encore, deux phénomènes de déstabilisation s'affrontent : l'épimérisation, qui conduit à de nouveaux composés de la même famille<sup>7,10</sup>, et la formation de composés de poids moléculaires plus importants (dimères ou plus)<sup>2</sup>.

### I.2.c Formation de dimères et d'oligomères de catéchine

L'épimérisation n'est pas vraiment un problème dans notre cas, puisque la propriété que nous recherchons avant tout dans la catéchine est son pouvoir antioxydant, qui existe pour toutes les molécules de la famille malgré des différences<sup>45</sup>. En revanche, la formation de dimères et/ou d'oligomères peut s'avérer problématique, c'est pourquoi nous allons nous intéresser un peu plus en détails à cette transformation.

Bailey et ses collaborateurs<sup>47</sup> sont les premiers à constater la formation de ces oligomères lorsqu'ils passent sur colonne une solution de thé noir. Ils récupèrent en fin de procédé une fraction de couleur marron qu'ils appellent *theafulvines*, dont le spectre RMN est semblable à celui d'un mélange de catéchines, mais avec des signaux beaucoup plus larges. Cet élargissement des signaux peut s'expliquer par la formation de théarubigines, c'est-à-dire des polymères formés par condensation d'EGC et d'EGCG. Pour Bailey, ceux-ci sont le résultat d'une réaction enzymatique se produisant lors de la fermentation du thé.

Roginsky et al.<sup>48</sup> remarquent que la quantité d'oxygène disponible au contact d'une solution de thé diminue très rapidement, ils en concluent que les catéchines en solution sont dégradées par oxydation. Ce phénomène a également été observé par Sang et al.<sup>49</sup> qui constatent que la formation de dimères d'EGC et d'EC est nettement ralentie lorsque les solutions sont conservées sous atmosphère inerte. Roginsky et al. proposent alors un schéma de dimérisation des catéchines *via* la formation d'un intermédiaire quinone, formé après oxydation de la catéchine (cf FIGURE IV.3). Cet intermédiaire très réactif est ensuite susceptible de s'oligomériser. Tanaka et ses collaborateurs<sup>50</sup> confirment le passage par des intermédiaires dimères quinones lors de la fermentation du thé en piégeant ces dérivés à l'aide de *o*-phénylènediamine, formant des phénazines stables et donc caractérisables. Zhu et al.<sup>1,2</sup> s'intéressent à la stabilité des dimères de C et EC et constatent que si ces molécules sont dans un premier temps dégradées en formant des dimères, ceux-ci sont également instables et ne restent que peu de temps dans le milieu réactionnel. Ils sont ensuite dégradés à leur tour pour former un produit qui n'est pas caractérisé mais que l'on peut supposer être un polymère.

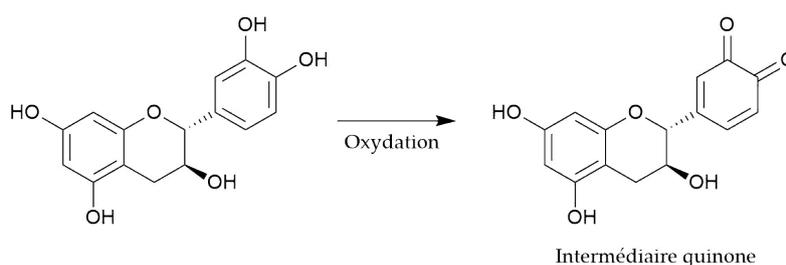


FIGURE IV.3 – Oxydation de la catéchine pour former un intermédiaire quinone, d'après Roginsky et al.<sup>48</sup>.

Les structures des dimères proposées par ces différents groupes sont en revanche différentes et sont présentées FIGURE IV.4.

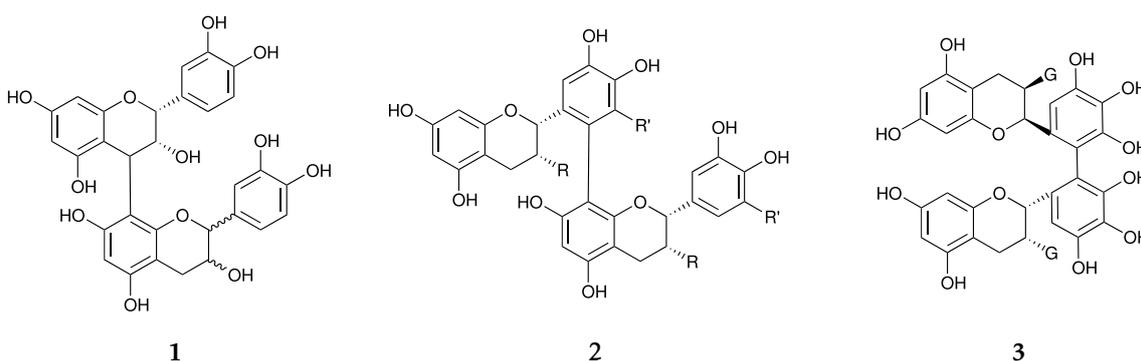


FIGURE IV.4 – Différentes structures de dimères de catéchine présentées dans la littérature. **1** : Structure présentée par Zhu et al.<sup>1,2</sup> et Roginsky et al.<sup>48</sup>, **2** : Structure présentée par Sang et al. en 2001<sup>52</sup>, **3** : Structure présentée par Sang et al. en 2005<sup>49</sup> et Tanaka et al.<sup>50</sup> pour l'EGCG.

#### I.2.d Conclusion

Les molécules de catéchine sont très sensibles à l'oxydation et sont d'autant plus dégradées que la température et le pH sont élevés. Les mécanismes de dégradation sont doubles : le premier consiste en l'épimérisation des molécules pour former des composés de la même famille mais avec une conformation différente. Ceci n'affecte pas *a priori* les propriétés antioxydantes qui sont conférées à toutes les catéchines. D'autre part, les catéchines semblent sujettes à une polymérisation en milieu alcalin, qui se produirait suite à l'oxydation des composés en dérivés de quinones, composés très réactifs. Ce deuxième mécanisme est susceptible d'altérer les propriétés antioxydantes de la molécule : nous devons le vérifier dans la suite.

## II Étude expérimentale de la stabilité de la catéchine

Pour toutes nos expériences, nous travaillons avec la molécule de (+)-catéchine, achetée sous forme hydratée. Cette molécule n'est pas celle qui présente les meilleures propriétés antioxydantes de la famille<sup>45</sup>, mais c'est en revanche la plus simple et la moins coûteuse, ce qui nous semblait le plus adéquat pour réaliser des premiers essais d'encapsulation.

La quantité d'eau présente dans le composé commercial a été déterminée par RMN <sup>1</sup>H. Nous avons trouvé qu'il contenait un équivalent molaire d'eau pour deux équivalents molaires de catéchine. La masse molaire de la (+)-catéchine étant de 290 g/mol contre 18 g/mol pour celle de l'eau, nous négligerons dans la suite la quantité d'eau présente dans le composé commercial utilisé, ce qui reviendra à une erreur de 3% en masse.

Dans toute la suite, nous travaillerons exclusivement avec la (+)-catéchine sous forme hydratée. Celle-ci sera à partir de maintenant appelée plus simplement catéchine.

### II.1 Évolution de la couleur des solutions, spectroscopie UV

Des solutions de 1 mg/mL de catéchine à pH 1 ; 4 ; 6 et 8 et 0,15 M en NaCl ont été préparées et stockées à température ambiante, sous atmosphère non contrôlée et à l'abri de la lumière pendant un mois. Les solutions à pH 1 et 4 sont obtenues par ajout d'acide chlorhydrique 1 M à de l'eau milli-Q. Les pH 6 et 8, qui sont très difficiles à ajuster précisément par ajout d'HCl ou de NaOH

car on est proche du  $pK_A$  de l'eau, sont obtenus grâce à des tampons phosphate de sodium. A intervalles réguliers ces solutions ont été observées et leur spectre UV/visible mesuré sur un appareil UV2550 de chez Shimadzu, après avoir été diluées à 5 mg/L dans l'eau pure.

Nous avons observé l'apparition d'une coloration des solutions de catéchine lors de leur vieillissement, comme les équipes de Li<sup>8</sup> et Sang<sup>49</sup>. La couleur apparaît en premier, au bout de quelques jours, pour l'échantillon à pH 8, comme illustré FIGURE IV.5(a). La solution à pH 4 brunit également rapidement, la coloration étant visible au bout de 3 jours, et à pH 6 la couleur apparaît au bout de 7 jours. La solution à pH 1 est restée incolore sur toute la durée de l'étude.

Parallèlement au suivi visuel de l'évolution des échantillons, des mesures de spectroscopie UV/visible ont été réalisées. L'évolution de la couleur se traduit par l'apparition d'une très large bande vers 400 nm (cf FIGURE IV.5(b)), dont l'intensité est d'autant plus importante que la couleur de la solution est intense. Le maximum d'intensité de cette bande semble se décaler vers les longueurs d'onde plus faibles au fur et à mesure de la dégradation.

On constate aussi qu'aux temps longs (1 mois), l'intensité augmente au maximum local de 280 nm. Pour quantifier la catéchine sur ces échelles de temps, il faudra par conséquent se concentrer sur le signal à 230 nm qui lui n'évolue pas.

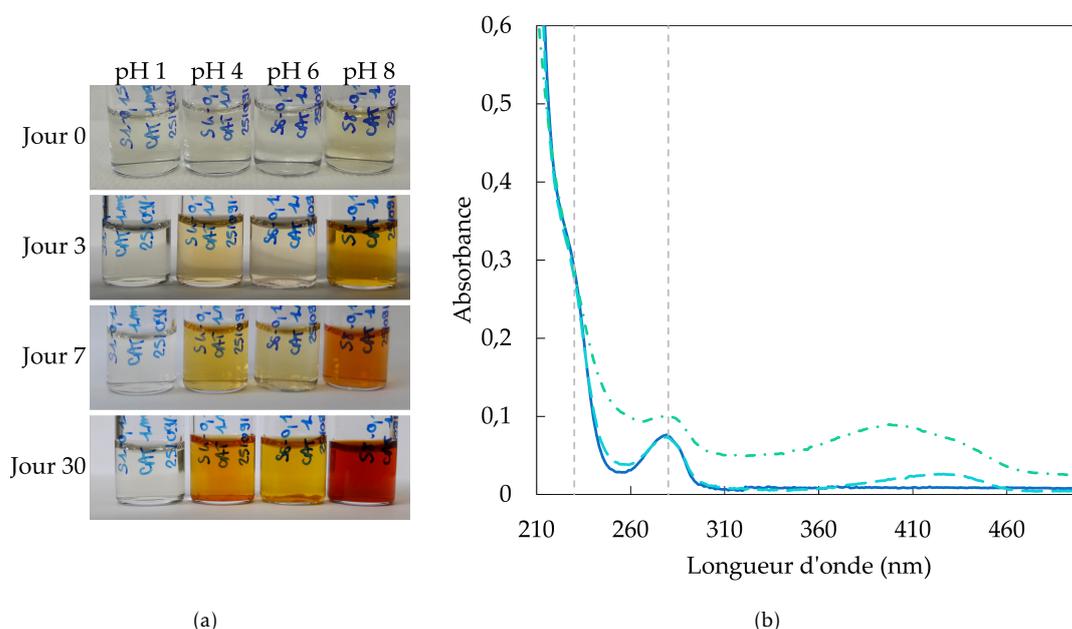


FIGURE IV.5 – (a) Évolution de la coloration de solutions de catéchine à différents pH, en présence de 0,15 M de NaCl, (b) Évolution du spectre UV/visible de la catéchine en solution dans un tampon phosphate à pH 8 : — jour 0, - - - jour 7, - · - · jour 30.

La littérature corrèle l'apparition de la coloration avec une dégradation de la molécule de catéchine, ce qui paraît cohérent à pH 8 pour lequel la catéchine est décrite comme instable<sup>1,7,46</sup>. En revanche l'apparition de la coloration à pH 4, pH pour lequel la catéchine est censée être relativement stable, est surprenante.

## II.2 Étude par chromatographie liquide

La méthode de choix pour étudier la dégradation des catéchines est la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry* ou LCMS). Celle-ci, si les paramètres d'élution sont bien ajustés, permettra en effet de séparer et d'identifier tous les composés de la famille qui seraient présents en solution. Cette méthode est en outre quantitative et permet de remonter à la concentration de chaque composé à partir de la mesure de l'aire du pic qui lui est associé.

### II.2.a Mode opératoire

Ces mesures ont été réalisées au Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO) de l'Institut des Sciences du vivant Frédéric Joliot au CEA Saclay, avec Sarah Brégant et Robert Thai. La colonne utilisée est une colonne C18 Waters XBridge BEH300, remplie par des particules de silice de 5  $\mu\text{m}$  greffées par des chaînes carbonées C18. L'éluant est un mélange acétonitrile à 0,09% en acide trifluoroacétique (TFA) (solvant A)/ eau à 0,1 % en TFA (solvant B). On élue suivant un gradient linéaire, de 0 à 100% de A en 20 min. Deux types de détection sont employés : la spectrométrie de masse, et la spectroscopie UV/visible à 230 et 280 nm (longueurs d'onde pour lesquelles sont observés respectivement un épaulement et un maximum local, cf FIGURE IV.5(b)). 20  $\mu\text{L}$  sont injectés pour chaque mesure. Un étalonnage est réalisé pour des quantités de catéchine injectées comprises entre 10 et 1000 pmol, en solution dans une solution d'HCl 0,1 M. Les différentes droites obtenues en fonction de la méthode de détection sont présentées à l'Annexe B.1.b. Cet étalonnage permet de déterminer la limite de détection de la molécule, qu'on fixe à 20 pmol.

Pour cette étude, nous avons travaillé aux quatre mêmes pH que pour les études de coloration : 1 ; 4 ; 6 et 8 ; sans sel ou avec 0,15 M de NaCl. La catéchine est dissoute dans ces différentes solutions à 1 mg/mL (soit 3,44 mM). Les huit échantillons sont laissés vieillir à température ambiante, sous atmosphère non contrôlée, et protégés de la lumière. Pour chaque mesure, 10  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon sont prélevés après agitation, et dilués dans 700  $\mu\text{L}$  d'eau pour obtenir des solutions à 50  $\mu\text{M}$  en catéchine, ce qui correspond à l'injection de 1 nmol de catéchine sur la colonne.

Il est préférable pour la colonne de chromatographie d'injecter des échantillons acides. Il est donc préalablement vérifié en injection directe (sans passer par la colonne de séparation) qu'un échantillon fraîchement préparé à pH 8 et dilué lors de l'injection dans une solution à pH 1 donne les mêmes signaux en spectrométrie de masse que le même échantillon dilué dans une solution à pH 8. Aucune différence n'étant observée, tous les échantillons injectés seront donc dilués dans une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 M.

### II.2.b Résultats

Quelle que soit la méthode de détection, un unique pic de chromatographie est obtenu pour les solutions injectées juste après préparation, comme on peut le voir sur la FIGURE IV.6. Il correspond bien à la catéchine (on vérifie en spectrométrie de masse que le pic principal correspond bien à la masse molaire de la catéchine  $\pm 1$ ).

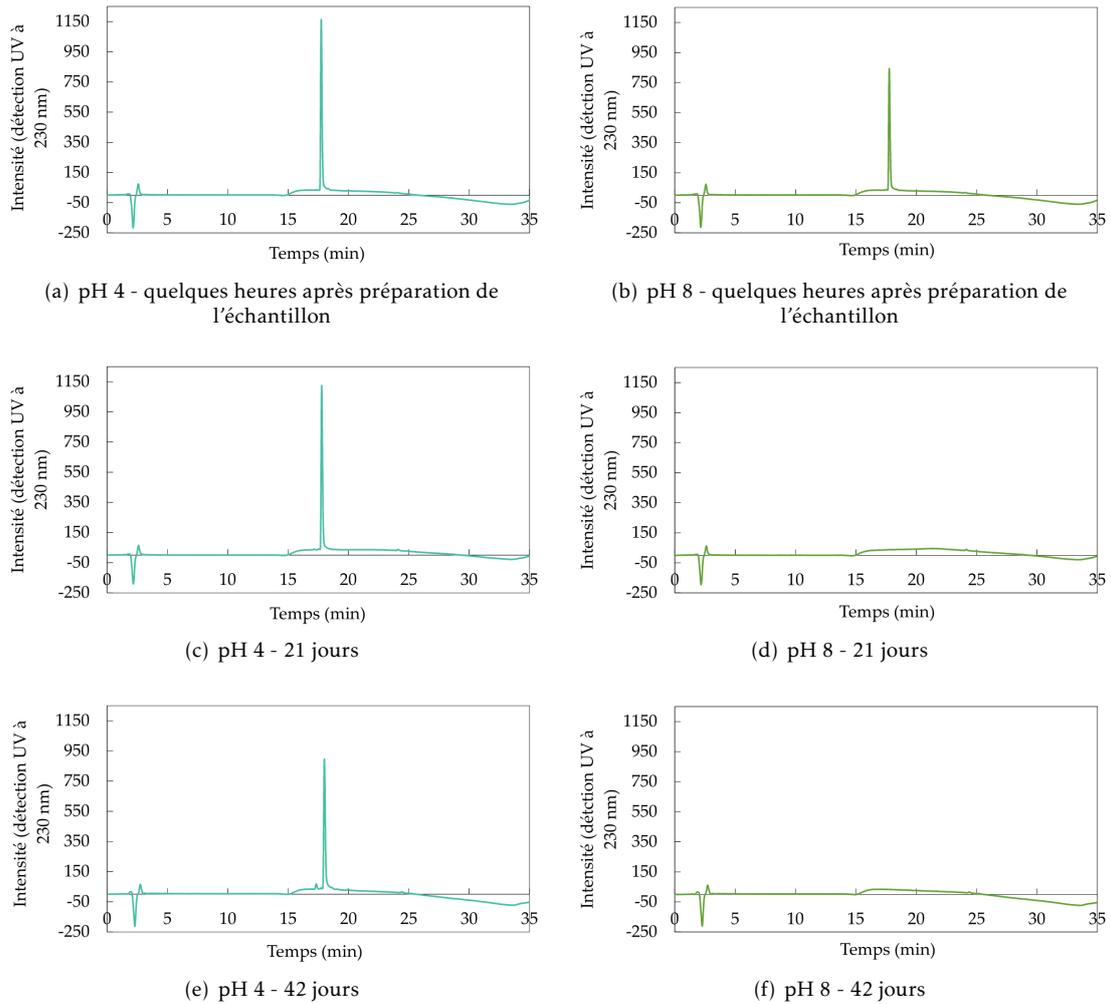


FIGURE IV.6 – Chromatogrammes obtenus aux jours 0; 21 et 42 pour les échantillons de catéchine préparés à pH 4 et pH 8 et en présence de 0,15 M en NaCl - détection UV à 230 nm.

La FIGURE IV.7 présente l'évolution de la quantité de catéchine détectée au cours du temps pour les échantillons contenant 0,15 M de NaCl, l'évolution générale observée étant la même en absence de sel. Les valeurs données correspondent à la moyenne des concentrations obtenues pour chacune des trois voies de détection (spectrométrie de masse, UV à 230 nm et UV à 280 nm.). Dans un souci d'alléger la figure, les barres d'erreur ne sont pas représentées. Nous avons estimé que les erreurs de mesures étaient inférieures à 20%, en se basant sur les valeurs supérieures à 100% obtenues pour la mesure au jour 0 pour trois des échantillons.

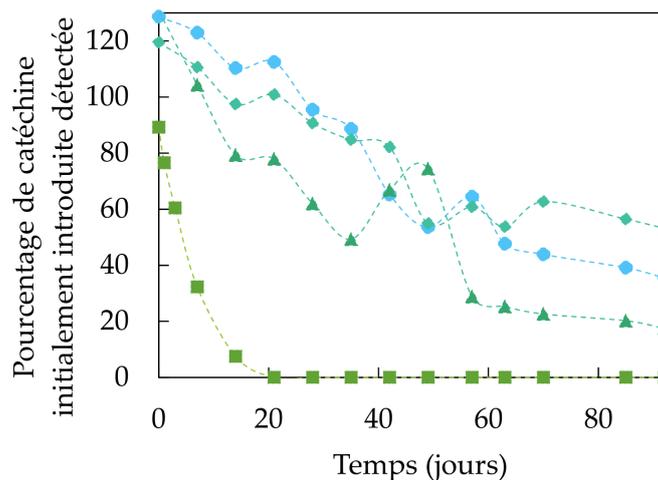


FIGURE IV.7 – Évolution du pourcentage de catéchine détecté en LCMS par rapport à la nanomole de catéchine introduite initialement, pour des solutions de catéchine à différents pH et en présence de 0,15 M de NaCl - ● = pH 1, ◆ = pH 4, ▲ = pH 6, ■ = pH 8.

On peut constater une tendance globale à la baisse de la quantité de catéchine détectée sur toute la durée de l'étude. La diminution est cependant nettement plus rapide à pH 8 puisque lors de la mesure au jour 0 seuls 90% de catéchine initialement introduite sont détectés, et au bout d'une vingtaine de jours le pic a complètement disparu. La stabilité est nettement meilleure aux pH 1 et surtout 4 pour lequel plus de la moitié de la catéchine initialement introduite est conservée après plus de 90 jours.

De façon surprenante, cette diminution du signal ne s'accompagne pas de la croissance d'un ou plusieurs autres pics (cf FIGURE IV.6), quel que soit le pH de la phase aqueuse considérée, et quelle que soit la longueur d'onde considérée pour la détection UV/visible, ce qui signifie que les composés formés lors de la dégradation de la catéchine ne sont pas détectés. En particulier, aucun pic n'est détecté en UV/visible à 400 nm, longueur d'onde à laquelle semblent émettre les produits de dégradation de la catéchine (cf paragraphe précédent).

### II.2.c Conclusions

Ces résultats montrent que les produits de dégradation obtenus ici aux différents pH ne sont pas dus à une simple épimérisation de la catéchine, qui conduirait à des produits quantifiables en LCMS, mais plutôt à une oligomérisation. La formation d'oligomères multiplie les interactions possibles entre une entité moléculaire et la colonne, puisque le volume de la molécule est plus

important, ce qui conduit *in fine* à une rétention irréversible des composés oligomérisés sur la colonne, composés qui n'apparaissent donc pas sur le chromatogramme. Des modifications des conditions d'élution ne permettent pas la récupération de ces composés adsorbés.

La dégradation est particulièrement prononcée à pH 8, et plus limitée aux autres pH. Le pH 4 semble le plus stable (cf FIGURE IV.7), contrairement à ce qu'aurait pu laisser penser l'étude visuelle des solutions aux différents pH. Cela est en accord avec les informations trouvées dans la littérature<sup>1,7,46</sup>.

## II.3 Étude par RMN

### II.3.a Mode opératoire

L'étude par RMN  $^1\text{H}$  est uniquement réalisée avec un échantillon à pH 8, sans sel. Le tampon phosphate à pH 8 est préparé en dissolvant les quantités nécessaires de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dans du  $\text{D}_2\text{O}$  (pH mesuré de 7,6 du fait des ions deutérium), puis la catéchine est ajoutée à une concentration de 1 mg/mL. Environ 600  $\mu\text{L}$  de cette solution sont introduits dans un tube RMN dont le contenu est étudié au cours du temps.

### II.3.b Résultats

Les spectres obtenus présentent un important signal pour l'eau à 4,8 ppm, provenant des molécules d'eau de la catéchine hydratée, des ions utilisés pour préparer le tampon, et de l'eau non deutérée qui peut polluer l'eau deutérée. Malheureusement il n'a pas été possible de s'affranchir de ce signal, même en passant par une étape de lyophilisation préalable.

De la même façon qu'en LCMS, l'intensité des signaux diminue au cours du temps, sans apparition de nouveaux pics, comme on peut le voir sur les FIGURES IV.8 et IV.9.

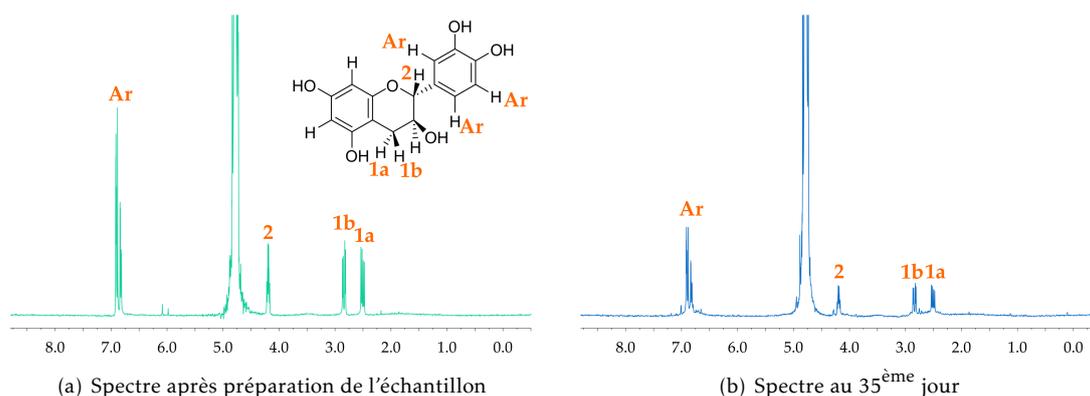


FIGURE IV.8 – Évolution du spectre RMN  $^1\text{H}$  de la catéchine en solution dans un tampon phosphate deutéré à pH 8. L'attribution des signaux est appuyée sur les travaux de Xu et al.<sup>53</sup>.

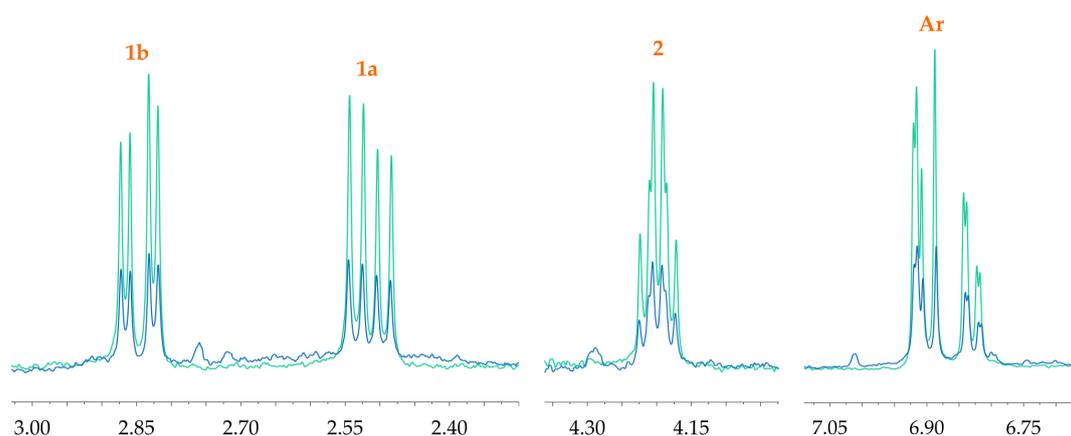


FIGURE IV.9 – Diminution des intensités des signaux du spectre RMN  $^1\text{H}$  de la catéchine en solution dans un tampon phosphate deutéré à pH8 - zoom sur les principaux signaux (— juste après préparation de l'échantillon, — à 35 jours).

### II.3.c Conclusions

Là encore la diminution des signaux sans apparition de nouveaux pics laisse penser à une oligomérisation de la catéchine, l'augmentation de la masse des molécules engendrant la diminution des temps de relaxation, ce qui conduit à une non-détection quand les temps sont trop faibles. Il pourrait être intéressant de réaliser des mesures en RMN DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*), qui pourrait nous donner des informations sur les coefficients de diffusion et donc la taille des composés détectés et ainsi nous permettre d'entrevoir peut être la formation de di- ou de trimères.

## II.4 Étude par chromatographie d'exclusion stérique

Pour essayer de détecter les produits de dégradation oligomériques, nous avons passé en chromatographie d'exclusion stérique (*Steric Exclusion Chromatography* ou SEC) une solution de catéchine concentrée à 4 mg/mL, préparée dans du tampon phosphate pH 8, vieillie durant 50 jours, puis lyophilisée et rediluée dans l'éluant de SEC ( $\text{H}_2\text{O}$  à 0,2 M en  $\text{NaNO}_3$ ). L'appareil utilisé pour la mesure est un appareil Viscotek GPC max VE 2001 équipé d'un triple détecteur TDA 302, utilisé en phase aqueuse avec une colonne en gel de poly(méthacrylate d'hydroxyéthyle) en lit mélangé (différentes tailles de pores).

Aucun oligomère ou polymère n'a pu être détecté par ce biais, la limite de détection de l'appareil correspondant à des assemblages de 6 ou 7 unités de catéchine. Comme dans le cas de la chromatographie liquide, on peut supposer que les oligomères formés lors de la dégradation adhèrent aux parois de la colonne et ne sont donc pas détectés.

## II.5 Conclusion

Conformément à la littérature, nous avons trouvé que la catéchine était rapidement dégradée aux pH supérieurs ou égaux à 6. Cette dégradation s'accompagne d'une diminution des signaux LCMS et RMN, sans apparition de nouveaux signaux. Comme les équipes de Li<sup>8</sup> et Sang<sup>49</sup>, nous observons un brunissement de la solution aux pH élevés.

Les produits de dégradation ne sont détectables ni en LCMS, ni en RMN, ni en chromatographie d'exclusion stérique. Comme évoqué dans la littérature, nous pouvons supposer que cette atténuation des signaux serait liée à la formation de polymères en solution<sup>47,48</sup>.

Cependant, la polymérisation de la molécule n'implique pas nécessairement la diminution de son pouvoir antioxydant, propriété qui nous intéresse ici. Pour l'évaluer, nous allons mesurer l'évolution du pouvoir antioxydant de différentes solutions de catéchine au cours du temps.

## III Evolution du pouvoir antioxydant de la catéchine

### III.1 Méthode de mesure du pouvoir antioxydant

Les mesures de pouvoir antioxydant sont réalisées avec la méthode ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*). Cette méthode fut développée par le groupe de Cao<sup>54</sup> dans les années 1990. Initialement, elle était basée sur l'utilisation de la protéine fluorescente B ou R-phycoérythrine. Le signal de fluorescence de cette molécule est très sensible aux changements de conformation et à l'intégrité chimique de la molécule : en présence de radicaux, la protéine est oxydée, ce qui conduit à une diminution progressive de l'intensité de sa fluorescence. Quand un antioxydant est ajouté dans le milieu, il neutralise les radicaux avant que ceux-ci ne puissent oxyder la phycoérythrine, ce qui permet de ralentir la diminution de fluorescence. La décroissance de l'intensité de fluorescence de la phycoérythrine est donc directement liée au pouvoir antioxydant de la molécule ajoutée : plus le pouvoir antioxydant est élevé, plus le piégeage des radicaux est efficace, plus la fluorescence de la protéine subsistera longtemps.

Une des originalités de cette méthode consiste à baser le calcul du pouvoir antioxydant sur la mesure de l'aire sous la courbe de décroissance de l'intensité de fluorescence de la phycoérythrine, à une longueur d'onde donnée et en fonction du temps. Plusieurs autres techniques précédemment utilisées se basent en effet sur la mesure de l'intensité de fluorescence à un instant donné, ce qui suppose que les cinétiques de réaction des antioxydants avec les radicaux libres sont identiques quels que soient les antioxydants, ce qui n'est évidemment pas le cas<sup>54,55</sup>.

Cette méthode a été améliorée en 2001 par l'équipe de Ou<sup>56</sup>. Ils choisissent d'utiliser la fluorescéine plutôt que la phycoérythrine qui présente plusieurs inconvénients : un manque de reproductibilité des mesures entre les différents lots, une diminution importante de la fluorescence au cours du temps lors de l'exposition à un rayonnement, même en l'absence de générateur de radicaux, ainsi que des interactions non spécifiques avec les polyphénols qui peuvent conduire à des mesures erronées. La fluorescéine évite ces effets parasites.

Les mesures de pouvoirs antioxydants ne sont pas des mesures absolues mais sont réalisées en comparaison avec les résultats obtenus pour un antioxydant de référence, le Trolox (acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique). Le pouvoir antioxydant d'une molécule s'exprime donc en "équivalent Trolox" ( $\mu\text{mol ET}/\mu\text{mol}$ ).

#### III.1.a Protocole de mesures

Les mesures de fluorescence sont réalisées sur un appareil Varian Cary Eclipse.

L'initiateur de radicaux utilisé pour ces expériences est le 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). Il est préparé en solution à 150 mM (soit 40,7 mg/mL) dans du tampon phosphate à pH 7,4.

Dans une cuve en quartz de 1 cm de côté sont introduits 1,2 mL de solution de fluorescéine à 40 nM (15 µg/L) préparée dans le tampon phosphate, et 200 µL de solution d'antioxydant diluée dans le tampon phosphate. L'utilisation du tampon permet de s'assurer que le pH est exactement le même pour toutes les mesures, ce qui est primordial car la fluorescence de la molécule de fluorescéine dépend de son pH.

L'échantillon est ensuite laissé à l'étuve à 37 °C durant 20 min, puis 200 µL de solution de AAPH sont ajoutés. Le fait que la solution soit à 37°C permet l'activation de l'AAPH et la formation de radicaux dès son ajout. La cuve est alors introduite dans le fluorimètre thermostaté à 33 °C pour commencer la mesure. La longueur d'onde du maximum d'excitation de la fluorescéine est déterminée à 492 nm. Le spectre d'émission de fluorescence de nos échantillons excité à cette longueur d'onde est mesuré entre 500 et 650 nm, toutes les minutes jusqu'à ce que l'intensité soit nulle.

### III.1.b Analyse des données

Pour chaque spectre mesuré, on relève la valeur de l'intensité au maximum d'émission, à 514 nm. L'aire sous la courbe normalisée (ASC) est alors calculée comme suit :

$$ASC = \frac{\Delta t}{I_0} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{I_k + I_{k+1}}{2}$$

où  $\Delta t$  représente l'intervalle de temps entre deux mesures (ici 1 min),  $I_k$  l'intensité de fluorescence à 514 nm pour la  $k$ -ième mesure (c'est-à-dire ici la  $k$ -ième minute), et  $n$  le nombre total de mesures. On en déduit ensuite l' $ASC_{nette}$  :

$$ASC_{nette} = ASC_{\text{échantillon}} - ASC_{\text{blanc}}$$

où  $ACS_{blanc}$  correspond à l'aire sous la courbe mesurée en l'absence d'antioxydant.

### III.1.c Réalisation d'une gamme d'étalonnage Trolox

Cinq solutions de Trolox (5 ; 10 ; 20 ; 40 et 80 µM) sont préparées dans le tampon phosphate, et la décroissance de l'intensité de fluorescence de la fluorescéine est mesurée pour chaque concentration. On peut déduire de ces mesures une courbe d'étalonnage (cf Figure IV.10) qui permettra de déduire comme suit la valeur du pouvoir antioxydant PA de la catéchine en équivalent Trolox (µmol ET/µmol) : et est calculé comme suit à partir de la droite d'étalonnage obtenue :

$$PA = \frac{ASC_{nette}[\text{échantillon}]}{0,36 \times C_{\text{antioxydant}}}$$

où  $ASC_{nette}[\text{échantillon}]$  représente l'aire sous la courbe mesurée pour un échantillon donné,  $C_{\text{antioxydant}}$  est la concentration en antioxydant dans l'échantillon (en µM) et 0,36 est le coefficient directeur de la droite d'étalonnage.

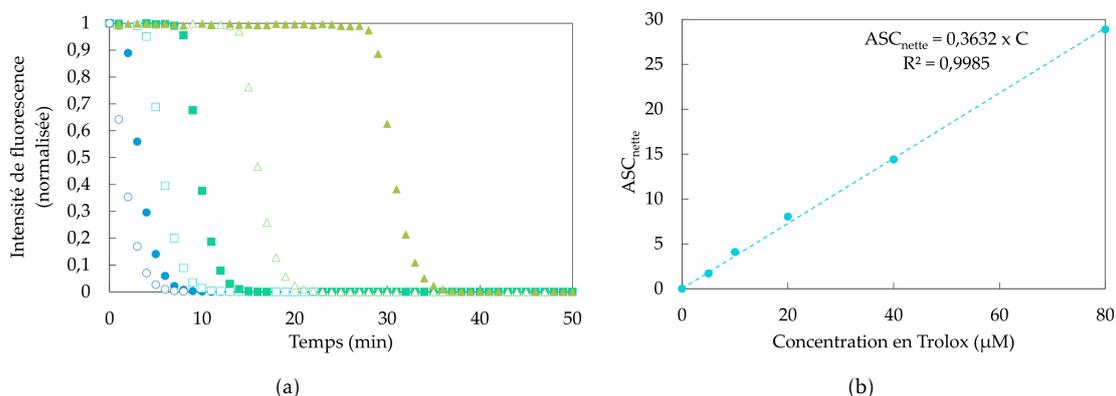


FIGURE IV.10 – (a) Évolution de l'intensité de la fluorescence de la fluorescéine à 514 nm, en présence de radicaux et de Trolox à différentes concentrations :  $\circ = 0 \mu\text{M}$ ,  $\bullet = 5 \mu\text{M}$ ,  $\square = 10 \mu\text{M}$ ,  $\blacksquare = 20 \mu\text{M}$ ,  $\triangle = 40 \mu\text{M}$ ,  $\blacktriangle = 80 \mu\text{M}$  - (b) Droite d'étalonnage construite à partir des aires sous les courbes de (a).

#### III.1.d Mesure des échantillons de catéchine

Les échantillons de catéchine étudiés sont préparés à 1 mg/mL et dilués à 1 μM dans du tampon phosphate à pH 7,4 pour faire la mesure.

### III.2 Mesure du pouvoir antioxydant de la catéchine en solution aqueuse à différents pH

#### III.2.a Échantillons de catéchine étudiés

L'évolution du pouvoir antioxydant de la catéchine est mesuré dans différentes conditions : dans une phase aqueuse seule, dans une phase aqueuse surmontée d'une phase huile sans polymère, et dans une phase aqueuse surmontée d'une phase huile contenant 5 mg/mL de PDMS<sub>60</sub>-b-PDMAEMA<sub>50</sub>, éventuellement en présence d'un antioxydant en phase huile. Notre but en ajoutant un antioxydant hydrophobe en phase huile est de voir s'il peut aider à préserver la catéchine de l'oxydation. Les antioxydants utilisés sont la curcumine (que nous souhaitons à terme coencapsuler avec la catéchine) ou l'hydroxytoluène butylé (BHT), tous deux dissous à 1 mg/mL en phase huile. Pour ces mesures l'huile utilisée est le Miglyol<sup>®</sup> 812. Les volumes d'huile et d'eau sont identiques. Dans tous les cas, plusieurs pH sont testés : pH 1 ; 4 ; 6 et 8 pour les échantillons uniquement aqueux et pH initiaux de 1 ; 3 et 8 pour les autres. Les pH 6 et 8 sont obtenus grâce à un tampon phosphate, les autres pH sont ajustés par dilution de HCl 1M. Toutes les phases aqueuses contiennent également 0,15 M de NaCl.

Les différents échantillons étudiés sont représentés sur la FIGURE IV.11.

Ces échantillons sont stockés pendant toute la durée de l'étude à température ambiante, sous atmosphère non contrôlée, et à l'abri de la lumière. Nous n'avons pas étudié l'évolution du pouvoir antioxydant de la catéchine en phase aqueuse sous atmosphère inerte. Il est probable que les propriétés antioxydantes seraient préservées plus longtemps<sup>49</sup>, mais nous avons souhaité rester au plus proche des conditions de conservation que l'on aurait pour un produit réel utilisant nos émulsions.

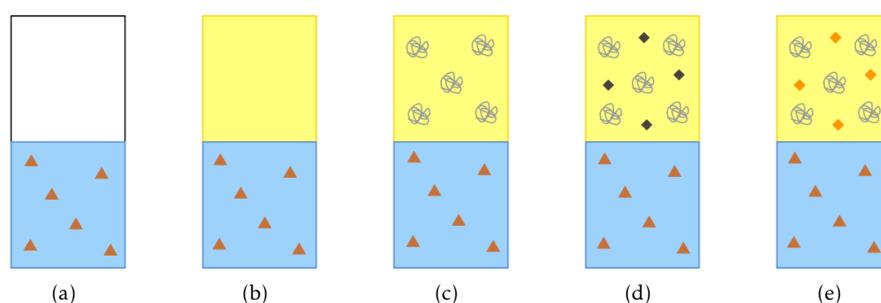


FIGURE IV.11 – Différents échantillons pour lesquels le pouvoir antioxydant de la catéchine a été mesuré au cours du temps : (a) Phases aqueuses seules, (b) phases aqueuses surmontées d'une phase Miglyol<sup>®</sup> 812, (c) phases aqueuses surmontées d'une phase Miglyol<sup>®</sup> 812 contenant le copolymère à 5 mg/mL, (d) phases aqueuses surmontées d'une phase Miglyol<sup>®</sup> 812 contenant le copolymère à 5 mg/mL et l'antioxydant BHT à 1 mg/mL, (e) phases aqueuses surmontées d'une phase Miglyol<sup>®</sup> 812 contenant le copolymère à 5 mg/mL et l'antioxydant curcumine à 1 mg/mL. Les pelotes grises représentent le polymère, ▲ la catéchine, ◆ le BHT et ◆ la curcumine.

### III.2.b Résultats

Les résultats sont présentés sur la FIGURE IV.12. Nous avons choisi de ne présenter ici que les courbes obtenues pour les phases aqueuses seules (FIGURE IV.12(a), échantillon présenté sur la FIGURE IV.11(a)), les phases aqueuses surmontées d'huile contenant le polymère (FIGURE IV.12(b), échantillon présenté sur la FIGURE IV.11(c)), ainsi que les solutions à  $\text{pH}_{\text{initial}}$  8 surmontées d'une phase huile contenant le polymère et un antioxydant (FIGURE IV.12(c), échantillons présentés sur les FIGURE IV.11(a), (d) et (e), à pH 8). Les conclusions générales sont en effet les mêmes pour les autres échantillons étudiés.

Dans un souci d'alléger la figure, nous n'avons pas représenté les barres d'erreur sur ces graphes. L'erreur peut cependant être estimée en comparant les valeurs obtenues pour des échantillons identiques comme étant inférieure à 15%.

On rappelle qu'en présence de copolymère en phase huile, le pH initial de 3 évolue pour atteindre 8. Les pH initiaux de 1 et 8 restent inchangés.

On constate que le pouvoir antioxydant diminue très rapidement à pH 8, atteignant une valeur proche de zéro en une vingtaine de jours, et diminue beaucoup plus lentement aux autres pH, ce quel que soit le type d'échantillon. Cela rejoint les études réalisées en LCMS, et démontre malheureusement que la polymérisation de la catéchine s'accompagne également d'une diminution de son pouvoir antioxydant. De plus, la présence d'un autre antioxydant en phase huile ne semble pas protéger la molécule puisque le pouvoir antioxydant diminue de la même façon.

Cependant, ces conditions sont très différentes de la formulation sur laquelle nous souhaitons travailler, avec la catéchine encapsulée au sein des gouttelettes d'eau internes d'une émulsion double. Dans l'émulsion, des gouttes d'eau de petit volume seront complètement isolés du milieu extérieur par une couche d'huile, il est possible que cela constitue une barrière suffisante et préserve au moins en partie la catéchine.

Nous étudierons dans la partie à suivre la formation d'émulsions en présence de catéchine, puis le pouvoir antioxydant de la molécule protégée au sein de cette structure.

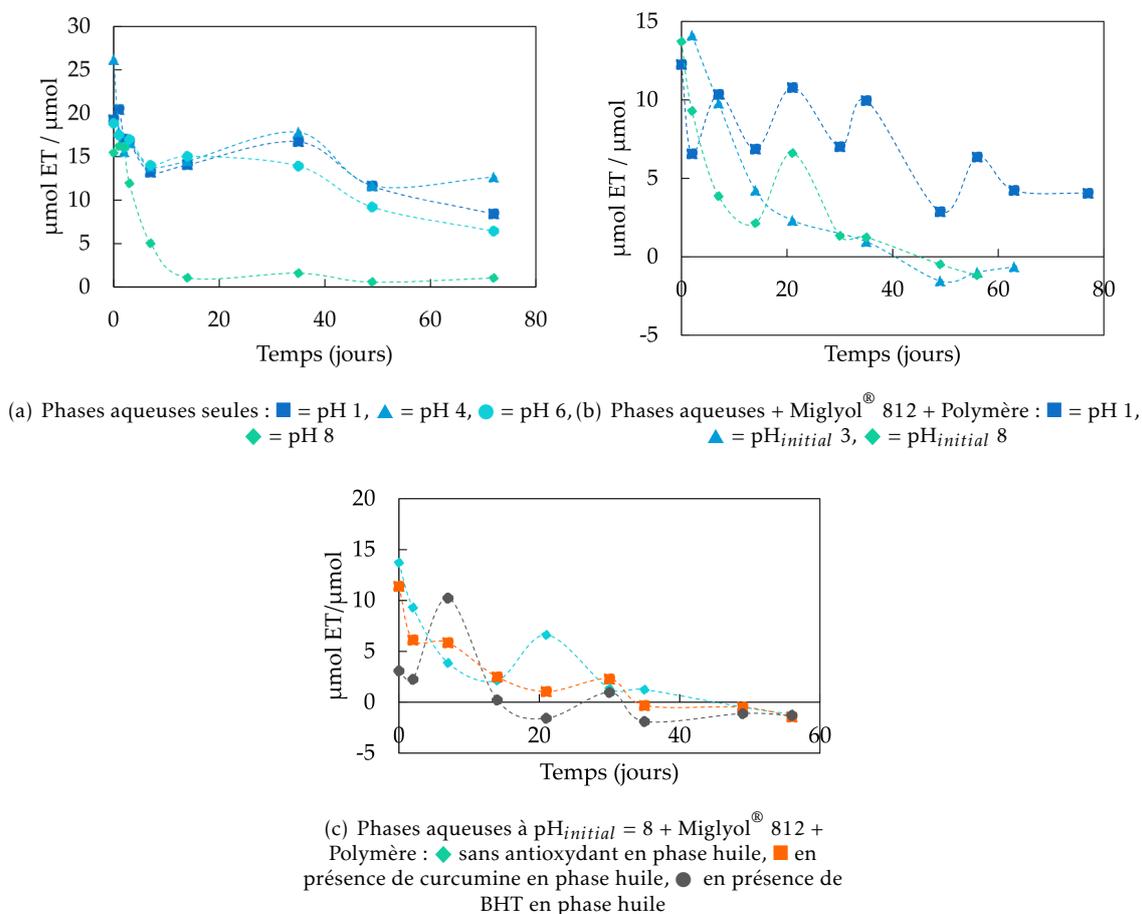


FIGURE IV.12 – Évolution du pouvoir antioxydant de la catéchine en fonction du pH dans différentes conditions.

## IV Formation d'émulsions chargées en catéchine à l'Ultra-Turrax®

Dans toute cette partie, nous travaillerons avec le polymère PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub> pour stabiliser nos émulsions.

Différentes conditions de pH et de concentrations en NaCl ont été testées pour la formation d'émulsions doubles chargées en catéchine. Ici, nous nous concentrerons spécifiquement sur ce type d'émulsions car notre but est d'encapsuler la molécule de catéchine, et nous étudierons donc des émulsions formées à des pH autour de 8 pour des concentrations en NaCl comprises entre 0,15 et 1 M. Ce pH de 8 auquel nos émulsions sont typiquement formées n'est *a priori* pas favorable pour la conservation de la catéchine. Nous verrons dans la partie IV.2.b comment nous pouvons essayer d'y remédier.

### IV.1 Préparation des échantillons

Les émulsions sont formées à l'Ultra-Turrax® de la même manière que décrit au chapitre précédent. La catéchine est d'abord dissoute à 1 mg/mL dans 3 mL de phase aqueuse au pH et à la concentration en NaCl souhaités. Dès que le solide est dissous (après une trentaine de minutes

sous agitation magnétique à température ambiante), la phase aqueuse est délicatement mise en contact avec 3 mL de phase huile contenant le copolymère PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub> à 5 mg/mL. Nous avons travaillé avec deux huiles : le Miglyol<sup>®</sup> 812 et le myristate d'isopropyle. Après 24 h de contact, les deux phases sont émulsifiées durant 40 s, après ajout de Rouge Nil en phase huile.

Les émulsions sont observées juste après formation et à intervalles réguliers en microscopie confocale.

## IV.2 Émulsions formées en présence de catéchine

### IV.2.a Formation d'émulsions chargées en catéchine au pH d'équilibre du copolymère

Comme pour le saccharose, nous nous sommes concentrés sur l'exploration des diagrammes d'émulsions dans la zone où des émulsions multiples sont obtenues sans catéchine, c'est-à-dire pour des phases aqueuses contenant du NaCl (entre 0,15 et 1 M) et au pH initial de 3 ou 6, évoluant à 8 à l'issue des 24h de mise en contact.

**Avec le Miglyol<sup>®</sup> 812** Les émulsions observées sont présentée dans le TABLEAU IV.1 Toutes les émulsions obtenues sont doubles E/H/E, comme sans cargo dans les mêmes conditions physico-chimiques. Le sel semble avoir un effet sur la stabilité des émulsions : celles-ci sont en effet d'autant moins stables que la concentration en sel est élevée. Ainsi, l'émulsion formée à 1 M en NaCl est déstabilisée en quelques jours tandis que les émulsions formées avec une quantité de sel moins importante ne démixent pas sur une année.

En revanche les globules d'huile grossissent au cours du temps, et les gouttelettes internes les plus grosses semblent coalescer avec la phase aqueuse externe, conduisant à une diminution importante du diamètre moyen des gouttelettes. Ce phénomène est d'autant plus prononcé que la concentration en sel est élevée.

La catéchine affecte donc de façon plus importante que le saccharose la stabilité des émulsions.

IV. FORMATION D'ÉMULSIONS CHARGÉES EN CATÉCHINE À L'ULTRA-TURRAX®

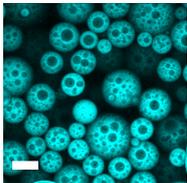
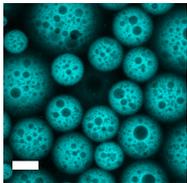
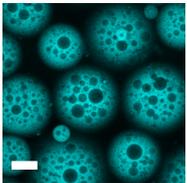
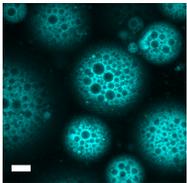
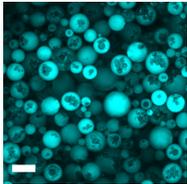
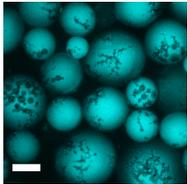
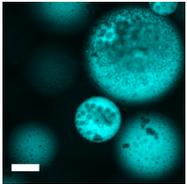
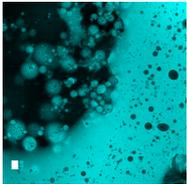
Concentration en NaCl	0,15 M	0,3 M	0,6 M	1 M
<i>Émulsions après formation</i>				
Microscopie confocale				
$D_{huile}$ (µm)	$21,8 \pm 3,6$	$34,4 \pm 6,5$	$43,3 \pm 8,2$	$70,9 \pm 22,9$
$D_{eau}$ (µm)	$3,1 \pm 1,2$	$3,1 \pm 1,5$	$3,0 \pm 1,5$	$3,2 \pm 1,4$
<i>Émulsions 1 an après formation</i>			<i>Émulsion après 3 jours</i>	
Microscopie confocale				
$D_{huile}$ (µm)	$12,7 \pm 3,3$	$44,8 \pm 13,9$	$65,3 \pm 21,4$	/
$D_{eau}$ (µm)	$2,6 \pm 1,3$	$1,7 \pm 0,8$	$1,5 \pm 0,6$	/

TABLEAU IV.1 – Émulsions obtenues avec le Miglyol® 812 en présence de catéchine et pour différentes concentrations de NaCl en phase aqueuse, juste après formation et après vieillissement à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les phases aqueuses des émulsions sont toutes à pH 8 et contiennent 1 mg/mL de catéchine.  $D_{huile}$  et  $D_{eau}$  représentent respectivement les diamètres moyens des globules d'huile et des gouttelettes d'eau internes pour chaque émulsion. Les écarts au diamètre moyen représentent la polydispersité de l'émulsion et non l'erreur sur la mesure. Les barres d'échelle représentent 30 µm.

**Avec le myristate d'isopropyle** Dans le myristate d'isopropyle au contraire, seules des émulsions inverses stables sont obtenues sur toute la gamme de sel étudiée, comme présenté dans le TABLEAU IV.2.

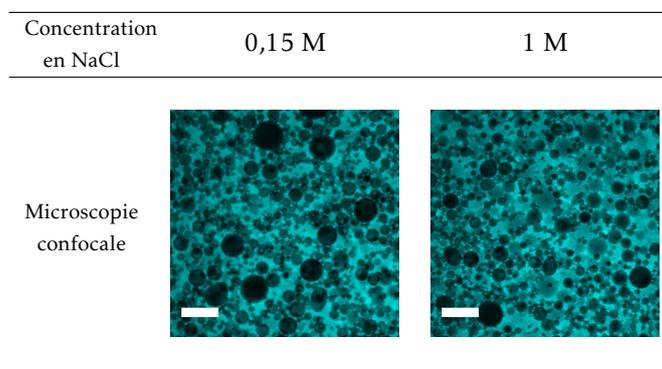


TABLEAU IV.2 – Émulsions obtenues avec le myristate d'isopropyle en présence de catéchine et pour différentes concentrations de NaCl en phase aqueuse juste après formation. Les phases aqueuses des émulsions sont à pH 8 et contiennent 1 mg/mL de catéchine. Les écarts au diamètre moyen représentent la polydispersité de l'émulsion et non l'erreur sur la mesure. Les barres d'échelle représentent 30  $\mu\text{m}$ .

**Mesures de tensions interfaciales** Afin d'essayer de rationaliser la différence de comportement observée entre les deux huiles en présence de catéchine, nous avons étudié l'influence de la molécule sur la tension interfaciale entre l'eau et chacune des huiles contenant le copolymère à 5 mg/mL. Nous espérons détecter une variation qui pourrait permettre d'expliquer le changement de type d'émulsions formées avec le myristate d'isopropyle. Si la molécule de catéchine a une interaction particulière avec le polymère, et donc avec l'interface, ces expériences devraient permettre de la déceler.

Les mesures ont été effectuées par tensiométrie à goutte tournante en suivant le même protocole que page 80, en dissolvant simplement 1 mg/mL de catéchine en phase aqueuse préalablement à la mise au contact des deux phases. Nous travaillons à deux concentrations en NaCl : 0,15 et 1 M (pH 8 lors de la mesure).

Les résultats sont présentés dans le TABLEAU IV.3.

Huile	[NaCl]	Tension interfaciale sans catéchine	Tension interfaciale avec catéchine
Miglyol <sup>®</sup> 812	0,15 M	1,0 $\pm$ 0,05 mN/m	0,96 $\pm$ 0,1 mN/m
Miglyol <sup>®</sup> 812	1 M	1,2 $\pm$ 0,1 mN/m	0,97 $\pm$ 0,09 mN/m
Myristate d'isopropyle	0,15 M	0,20 $\pm$ 0,1 mN/m	0,19 $\pm$ 0,1 mN/m
Myristate d'isopropyle	1 M	0,45 $\pm$ 0,05 mN/m	0,39 $\pm$ 0,1 mN/m

TABLEAU IV.3 – Mesures de tensions interfaciales eau/huile en présence de PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub>, avec ou sans catéchine en phase aqueuse.

On constate que les valeurs de tensions avec et sans catéchine sont très proches, ce pour les

deux huiles et les deux concentrations en NaCl étudiées. Les différences de conformation du copolymère en présence de catéchine n'engendrent donc pas de modification sensible de la tension interfaciale. Les tensions interfaciales obtenues pour les émulsions inverses en l'absence de cargo sont cependant du même ordre de grandeur que celles mesurées pour les émulsions multiples en l'absence de cargo (cf 91), ce qui peut expliquer que le changement de conformation du copolymère n'ait pas d'effet visible sur les tensions interfaciales.

**Conclusions** Nous avons réussi à former des émulsions doubles en présence de catéchine avec le Miglyol® 812 pour des concentrations en NaCl inférieures ou égales à 0,6 M. Au delà, des émulsions instables sont obtenues. Avec le myristate d'isopropyle, des émulsions inverses stables ont été obtenues.

On peut supposer que comme le saccharose, la catéchine interagit avec le copolymère, probablement par liaisons hydrogènes puisqu'il a été établi qu'elle était capable d'en former<sup>57,58</sup>.

Dans le cas d'une phase aqueuse très salée, toutes les charges portées par le copolymère sont écartées, la catéchine peut donc interagir de façon importante avec la chaîne PDMAEMA. Ces interactions conduisent à une modification profonde de la conformation du copolymère à l'interface, le rendant inapte à stabiliser des émulsions. La catéchine est moins hydrophile que le saccharose, donc son impact sur l'hydrophilie de la chaîne DMAEMA est plus grand, ce qui peut expliquer que des émulsions instables puissent être obtenues en présence de cette molécule alors que toutes sont stables avec le saccharose.

La formation d'émulsions inverses avec le myristate peut s'expliquer par des mécanismes similaires : la création d'une liaison hydrogène copolymère/catéchine signifie la destruction d'une liaison hydrogène copolymère/eau. La catéchine étant capable de déshydrater le PDMAEMA, la chaîne polymère devient donc de plus en plus hydrophobe et finalement la conformation du copolymère à l'interface ne permet plus la formation d'émulsions doubles. Cela n'est observé que pour le myristate d'isopropyle, mais nous avons vu dans le Chapitre III que des émulsions inverses pouvaient être stabilisées avec le myristate d'isopropyle (avec le COPO 104b89), au contraire du Miglyol® 812 où seules des émulsions doubles ont pu être stabilisées.

Le but de cette étude étant l'encapsulation de la molécule de catéchine au sein des gouttelettes internes d'une émulsion multiple, nous nous sommes exclusivement concentrés dans la suite sur la formation d'émulsions à base de Miglyol® 812.

#### IV.2.b Tentatives de formation d'émulsions chargées en catéchine à des pH inférieurs à 6

Les émulsions doubles obtenues dans le Miglyol® 812 l'ont été à pH 8, qui est le pH d'équilibre imposé par le polymère. Or, nous avons vu précédemment qu'à ce pH, la catéchine se dégradait rapidement, son pouvoir antioxydant approchant 0 en une vingtaine de jours.

Nous avons donc cherché des moyens de former des émulsions E/H/E stabilisées par le PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub> à des pH intermédiaires. Ces essais ont d'abord été réalisés en l'absence de catéchine car celle-ci n'a pas semblé avoir d'influence sur les valeurs de pH obtenues à l'issue des 24 h de mise au contact des deux phases.

Nous avons commencé par jouer sur la concentration en sel et le pH de départ de la phase aqueuse. L'équilibre du pH est en effet atteint plus lentement en l'absence de sel, ou bien lorsque

le pH de départ est inférieur à 3. Nous avons essayé différentes concentrations en sel et différents pH de départ, sans succès : 24 h après émulsification, le pH est toujours remonté à 8.

Nous avons également essayé de varier la concentration en copolymère : celui-ci étant à l'origine du saut de pH, diminuer sa concentration pourrait conduire à une diminution du saut de pH. Nous avons essayé de former des émulsions en présence de 1 et 3 mg/mL de copolymère en phase huile. Les émulsions et les valeurs de pH pour 3 mg/mL de copolymère étaient semblables à celles obtenues avec la concentration habituellement utilisée de 5 mg/mL. Cela n'est pas vraiment surprenant étant donné que le pH varie en échelle logarithmique, dans l'idéal il faudrait pouvoir diminuer la quantité de polymère d'un facteur 10. Cependant, les émulsions formées en présence de 1 mg/mL de polymère sont instables, il n'est donc pas possible de descendre à des concentrations vraiment faibles en copolymère tout en continuant à stabiliser les interfaces.

Enfin, nous avons utilisé comme phases aqueuses des solutions tampons : un tampon acétate à pH 4,7 ; et un tampon phosphate à pH 6, additionnés de 0,15 M de NaCl. Le saut de pH est bien supprimé, mais les émulsions obtenues démixent en quelques heures. En revanche, avec un tampon phosphate à pH 8 additionné de 0,15 M de NaCl, il est possible de former des émulsions E/H/E stables. La valeur d'équilibre du pH semble donc être un paramètre crucial pour l'obtention d'émulsions stables avec notre copolymère. Nous avons aussi réalisé des tests en présence de catéchine avec des tampons citrates/phosphates et des pH de 4,7 et 5,4 avec le même résultat : il a été impossible de stabiliser une émulsion.

Nous n'avons donc pas pu former des émulsions multiples à un pH d'équilibre inférieur à 6 avec le Miglyol<sup>®</sup> 812. Il semble que le pH soit un critère très important pour l'obtention d'émulsions multiples stables avec notre copolymère.

Nous poursuivrons donc nos études avec les émulsions doubles obtenues à pH 8, tout en gardant à l'esprit que ce pH n'est *a priori* pas favorable à la conservation de la catéchine, même si son encapsulation au sein des globules d'huile peut améliorer sa stabilité.

#### IV.2.c Conclusions

Nous allons dans la suite utiliser les émulsions doubles chargées en catéchine, formées dans le Miglyol<sup>®</sup> 812 à pH 8 et à faible concentration en NaCl, qui sont celles qui ont conduit à la meilleure stabilité. Dans la partie IV.4 ce chapitre, nous chercherons à savoir si les propriétés antioxydantes de la catéchine encapsulée au coeur des émulsions multiples sont conservées malgré la valeur de pH élevée. Avant cela, nous allons faire des essais de lavage de nos émulsions et de relargage de la catéchine.

### IV.3 Lavages par dialyse des émulsions chargées en catéchine, relargage de la molécule

#### IV.3.a Lavage des émulsions à pH 8 et relargage de la catéchine

Comme pour les émulsions chargées en saccharose présentées au chapitre précédent, il est nécessaire, pour suivre le relargage de la catéchine après déstabilisation de l'émulsion, de laver la phase aqueuse externe de l'émulsion, de façon à ce qu'elle ne contienne plus de catéchine. Nous procédons de la même façon que pour le saccharose, par étapes de dialyses successives dans des

phases aqueuses dépourvues de catéchine (cf page 113). Dans tous les cas, l'émulsion est mise à dialyser juste après formation, la molécule de catéchine n'est donc pas ou peu dégradée.

Les premiers essais de dialyse ont été réalisés avec une émulsion formée à partir d'une phase aqueuse à 0,15 M en NaCl. Cependant, au cours des lavages avec une eau à 0,15 M en NaCl, les globules d'huile se vident petit à petit de leurs gouttelettes internes. Il en est de même avec les émulsions contenant 0,3 M de NaCl dialysées avec une eau de même concentration en sel, comme présenté dans le TABLEAU IV.4. On constate une nette diminution du diamètre des gouttelettes d'eau interne (de plus d'un facteur 2, soit une diminution du volume d'eau interne de près d'un facteur 10). Cette diminution s'accompagne d'une diminution de la taille des globules d'huile, qui, vidés de leurs gouttes internes, ont nécessairement un diamètre moins important.

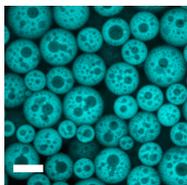
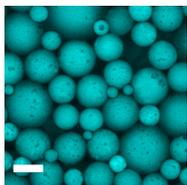
	Juste après formation	Après dialyse 4
Microscopie confocale		
$D_{huile}$ (µm)	$22,3 \pm 4,8$	$15,5 \pm 3,2$
$D_{eau}$ (µm)	$3,1 \pm 1,4$	$1,4 \pm 0,5$

TABLEAU IV.4 – Émulsions à pH 8 ; 0,3 M en NaCl et contenant 1 mg/mL de catéchine, juste après formation, et après la dernière étape de dialyse avec une eau à 0,3 M en NaCl.  $D_{huile}$  et  $D_{eau}$  représentent respectivement les diamètres moyens des globules d'huile et des gouttelettes d'eau internes pour chaque émulsion. Les écarts au diamètre moyen représentent la polydispersité de l'émulsion et non l'erreur sur la mesure. Les barres d'échelle représentent 30 µm.

De façon à éviter ce phénomène, nous avons induit un déséquilibre osmotique favorisant le gonflement des gouttelettes en dialysant une émulsion contenant 0,3 M en NaCl avec des phases aqueuses qui en contiennent 0,15 M. De cette façon, l'émulsion conserve sa structure multiple au cours des lavages comme présenté dans le TABLEAU IV.5. On constate un léger gonflement des gouttes internes (et donc des globules d'huile) lors des deux premières étapes de lavage, puis la taille des gouttelettes commence à légèrement diminuer. Nous pouvons supposer que l'équilibre osmotique est atteint à ce stade, et que le gonflement des gouttelettes n'est plus favorable. Pour assurer une taille constante des gouttes internes, une solution pourrait être de diminuer de façon plus progressive la concentration en sel à l'extérieur de la membrane de dialyse, de façon à ce que l'équilibre des concentrations en NaCl ne soit jamais atteint entre les phases internes et externes à la membrane de dialyse. Cependant pour plus de simplicité nous avons choisi pour la suite de suivre le protocole présenté au TABLEAU IV.5, c'est-à-dire des lavages avec des phases aqueuses à 0,15 M en NaCl.

L'évolution de la concentration en catéchine en phase aqueuse externe est suivi par spectroscopie UV/visible en relevant la valeur de l'absorbance à 230 nm. Les spectres UV/visible correspondants sont présentés à la FIGURE IV.13.

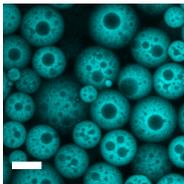
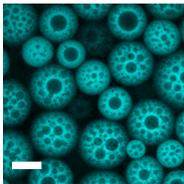
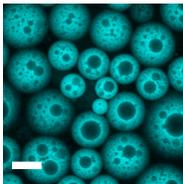
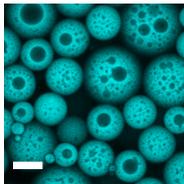
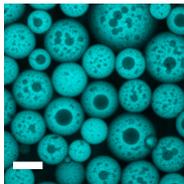
	Juste après formation	Après dialyse 1	Après dialyse 2	Après dialyse 3	Après dialyse 4
Microscopie confocale					
$D_{huile}$ ( $\mu\text{m}$ )	$26,2 \pm 4,8$	$31,4 \pm 5,4$	$29,3 \pm 5,2$	$28,0 \pm 4,8$	$27,4 \pm 4,7$
$D_{eau}$ ( $\mu\text{m}$ )	$3,2 \pm 1,6$	$3,4 \pm 1,8$	$3,5 \pm 1,9$	$2,6 \pm 1,4$	$2,8 \pm 1,6$

TABLEAU IV.5 – Émulsions à pH 8 et 0,3 M en NaCl, contenant 1 mg/mL de catéchine juste après formation et après les différentes étapes de dialyse avec une eau à 0,15 M en NaCl.  $D_{huile}$  et  $D_{eau}$  représentent respectivement les diamètres moyens des globules d'huile et des gouttelettes d'eau internes pour chaque émulsion. Les écarts au diamètre moyen représentent la polydispersité de l'émulsion et non l'erreur sur la mesure. Les barres d'échelle représentent 30  $\mu\text{m}$ .

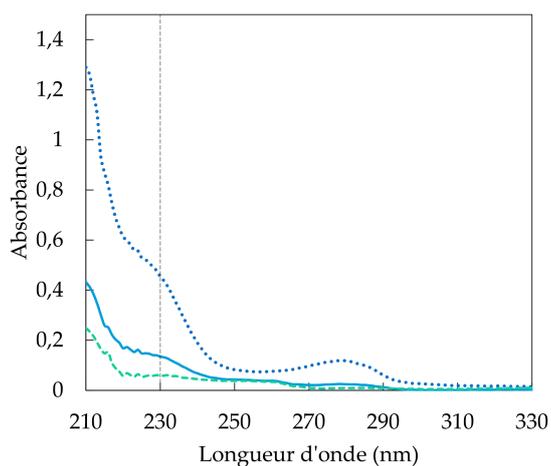


FIGURE IV.13 – Spectres UV/visible réalisés sur les phases aqueuses de dialyse successives.  $\cdots$  Dialyse 1,  $\text{—}$  Dialyse 2,  $\text{---}$  Dialyse 3.

Les concentrations de catéchine mesurées après chaque étape sont présentées au TABLEAU IV.6. Trois étapes de dialyse dans 200 mL de phase aqueuse sont généralement suffisantes pour laver l'émulsion. Pour rappel, la masse totale de catéchine introduite dans l'émulsion est de 3 mg. 2,4 mg ont été récupérés à l'issue des lavages.

Étape considérée	Concentration mesurée en phase aqueuse externe	Masse de catéchine correspondante
Dialyse 1	8,3 µg/mL	1,7 mg
Dialyse 2	2,5 µg/mL	0,5 mg
Dialyse 3	1,1 µg/mL	0,2 mg

TABLEAU IV.6 – Concentrations de catéchine mesurées à l'issue des différentes étapes de dialyse, et masse de catéchine effective correspondante.

Après lavage de la phase aqueuse externe de l'émulsion chargée en catéchine, celle-ci est dialysée avec 90 mL de phase aqueuse à pH 1 et 0,15 M en NaCl. Il en résulte une déstabilisation de l'émulsion qui devient directe en quelques minutes, de même que l'émulsion sans cargo. La quantité de catéchine présente en phase aqueuse externe à la membrane de dialyse après déstabilisation est mesurée par spectroscopie UV/visible. Cependant, le spectre obtenu représenté à la FIGURE IV.14 ne correspond pas tout à fait au spectre de la catéchine, ni à celui de la catéchine dégradée présenté FIGURE IV.5(b) à la page 135. Le pic à 280 nm disparaît en effet complètement, tandis que l'épaulement à 230 nm est grandement déformé.

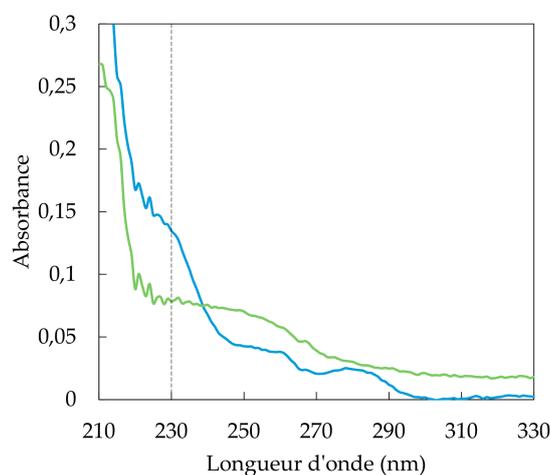


FIGURE IV.14 – Comparaison des spectres UV/visible de la catéchine — au cours des lavages, et — après déstabilisation à pH 1 et obtention d'une émulsion directe.

Cette modification empêche la mesure exacte de catéchine relarguée. Cependant, l'intensité du signal est faible. La valeur d'absorbance à 230 nm correspondrait ainsi à une concentration de 1,3 mg/mL, soit une masse de 0,13 mg. Par rapport aux 3 mg de catéchine introduits initialement dans l'émulsion, cela représente un taux d'encapsulation de 3,9%. La répétition de cette expérience a conduit à la libération de 0,1 mg soit 3,2% d'encapsulation. Une mesure grossière du taux

d'encapsulation réalisée sur les images des émulsions (cf paragraphe III.2.c page 115) donne une valeur de 7%, probablement sous-estimée. Une nouvelle fois, la masse de catéchine relarguée semble plus faible qu'attendue (bien qu'ici elle n'ait pas pu être précisément estimée). De plus, on ne récupérerait que 2,5 mg de catéchine au total, soit 84% de la catéchine initialement introduite. Bien que les valeurs à l'issue du relargage ne puissent pas être considérées comme valides du fait de la modification du spectre obtenu, cela donne quand même une information sur l'ordre de grandeur des concentrations libérées.

Cette faible quantité relarguée couplée à la modification du spectre confirment qu'il existe une interaction entre la catéchine et le polymère, probablement basée sur la création de liaisons hydrogènes, comme représenté à la FIGURE IV.15. La modification du spectre pourrait s'expliquer par la formation et la détection de complexes copolymère/catéchine lors du relargage.

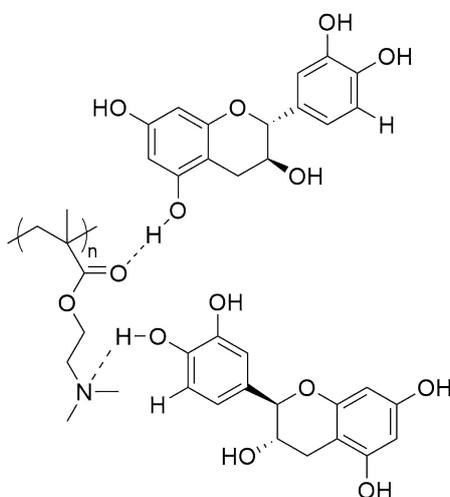


FIGURE IV.15 – Exemples de formation de liaisons hydrogènes DMAEMA/catéchine.

Il serait très intéressant de pouvoir caractériser plus en détails ces interactions. Nous avons cherché à réaliser des expériences de ce type qui ont conduit à de premiers résultats pour l'instant peu compris. Ces expériences sont décrites en Annexe C.

### IV.3.b Lavages des émulsions à des pH intermédiaires

Pour espérer mieux préserver la catéchine, nous avons tenté de laver les émulsions formées à 0,3 M de NaCl et pH 8 avec une phase aqueuse à 0,15 M en NaCl et à pH 4 ou 5 plutôt qu'à pH 8. L'équilibre des pH devrait permettre d'atteindre un pH autour de 4 ou 5 dans les gouttes internes à l'issue des étapes de dialyse et offrir ainsi la possibilité de stocker les émulsions sur le long terme dans des conditions favorables à la catéchine. Malheureusement, nous avons observé au cours des différentes étapes de lavage que les gouttes d'eau internes ont tendance à se vider dans la phase aqueuse externe, conduisant petit à petit à une émulsion directe, comme présenté sur les FIGURES IV.16(c) et IV.17(c). Cela confirme que le paramètre du pH est critique pour la stabilité de nos émulsions : un pH trop bas conduit à des émulsions multiples instables.

Cette déstabilisation des émulsions E/H/E en émulsions directes au cours du temps est probablement liée à une conformation défavorable du copolymère à l'interface à ces pH. Lors de la mise en contact de l'émulsion à pH 8 avec des phases aqueuses à pH 4 et 5, un déséquilibre

est créé entre les concentrations en protons à l'extérieur et à l'intérieur. Cependant, cet écart de concentration est négligeable devant la concentration en NaCl. Cette dernière est deux fois plus importante en phase aqueuse interne qu'en phase aqueuse externe, il n'est donc pas favorable que l'eau interne fuie pour aller diluer les protons présents en quantité plus importante en phase aqueuse externe. Ce sont donc les protons qui traversent la phase huile pour atteindre la phase aqueuse interne et équilibrer les pH. La conformation du copolymère est modifiée en leur présence et les interfaces, instables, coalescent avec la phase extérieure. Malgré nos efforts il aura donc été impossible d'abaisser le pH des émulsions chargées en catéchine.

En outre, la même modification du spectre est obtenue après l'étape de déstabilisation à pH 1 pour ces émulsions lavées à pH 4 ou 5 (cf FIGURES IV.16(a) et IV.17(a)). La quantification précise du taux d'encapsulation est donc toujours impossible.

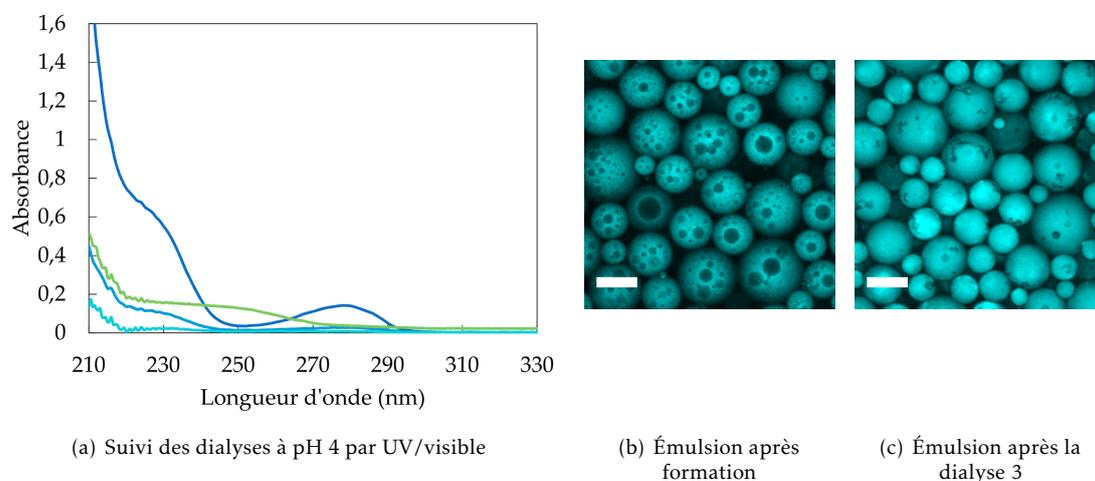


FIGURE IV.16 – (a) : Spectres UV/visibles obtenus aux différentes étapes de lavage d’une émulsion à pH 8 et 0,3 M en NaCl, chargée en catéchine à 1 mg/mL, avec une phase aqueuse à pH 4 et 0,15 M en NaCl (— après dialyse 1, — après dialyse 2, — après dialyse 3), puis à l’issue de sa déstabilisation par dialyse avec une phase aqueuse à pH 1 et 0,15 M en NaCl (—). (b) et (c) : images en microscopie confocale des émulsions après formation et à l’issue de la dernière étape de lavage. Les barres d’échelle représentent 30  $\mu\text{m}$ .

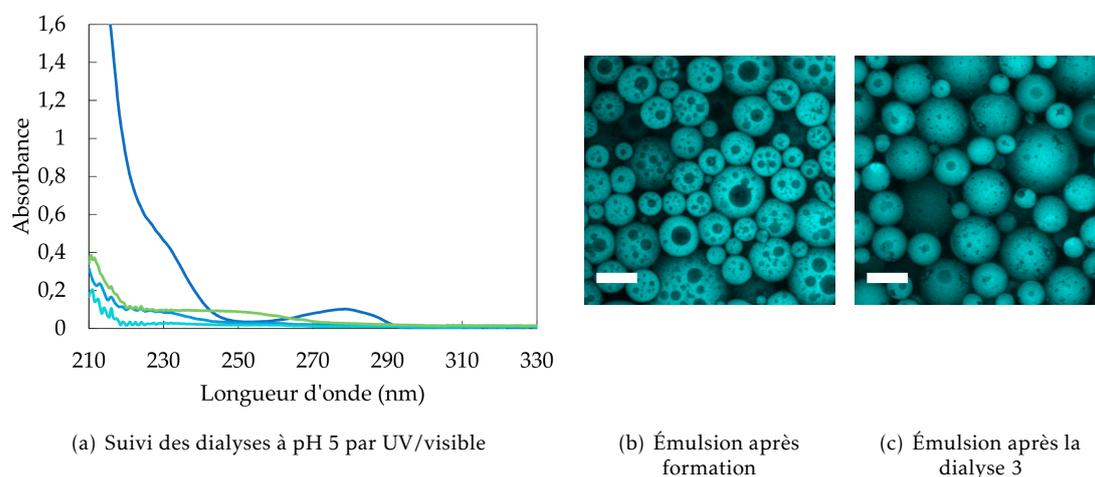


FIGURE IV.17 – (a) : Spectres UV/visibles obtenus aux différentes étapes de lavage d’une émulsion à pH 8 et 0,3 M en NaCl, chargée en catéchine à 1 mg/mL, avec une phase aqueuse à pH 5 et 0,15 M en NaCl (— après dialyse 1, — après dialyse 2, — après dialyse 3), puis à l’issue de sa déstabilisation par dialyse avec une phase aqueuse à pH 1 et 0,15 M en NaCl (—). (b) et (c) : images en microscopie confocale des émulsions après formation et à l’issue de la dernière étape de lavage. Les barres d’échelle représentent 30  $\mu\text{m}$ .

#### IV.4 Évolution du pouvoir antioxydant au sein des gouttelettes internes des émulsions

Les mesures de pouvoir antioxydant présentées plus haut ont été réalisées sur les phases huileuses et eau utilisées pour former nos émulsions, mais non émulsifiées. Or, il est possible que la structure multiple puisse tout de même préserver les propriétés de la molécule de catéchine, même si le pH au sein des gouttelettes internes est élevé. Pour le vérifier, nous avons comparé l'évolution du pouvoir antioxydant de la catéchine contenue dans la phase aqueuse externe à celle de la phase aqueuse interne libérée après déstabilisation de l'émulsion par diminution du pH.

##### IV.4.a Mode opératoire

Plusieurs émulsions à pH 8 et 0,3 M en NaCl, chargées en catéchine à 1 mg/mL, sont réalisées à partir de 3 mL de phase aqueuse et de phase huileuse suivant le protocole décrit page 145. Chaque émulsion est ensuite divisée en 2 (2x2,8 mL). Chacun de ces échantillons contient donc 1,4 mL de chaque phase.

À différents temps, répartis sur 6 semaines, les pouvoirs antioxydants des phases aqueuses internes et externes sont mesurés comme suit : la phase aqueuse externe sous-nageante avant déstabilisation est d'abord prélevée à la seringue (environ 700  $\mu$ L) et remplacée par le même volume de phase aqueuse à pH 1 et 0,3 M en NaCl. Attention, il faut bien noter que la phase aqueuse sous-nageante prélevée ici ne constitue pas la totalité de la phase aqueuse externe puisqu'une partie se trouve dans la phase émulsion crémée. Après agitation manuelle, une émulsion directe est obtenue. Cette émulsion est laissée crêmer, puis la phase aqueuse sous-nageante après déstabilisation est prélevée. Les pouvoirs antioxydants des deux phases aqueuses (avant et après déstabilisation) sont mesurés comme décrit au paragraphe III.1 à la page 141. Ces différentes étapes sont schématisées à la FIGURE IV.18.

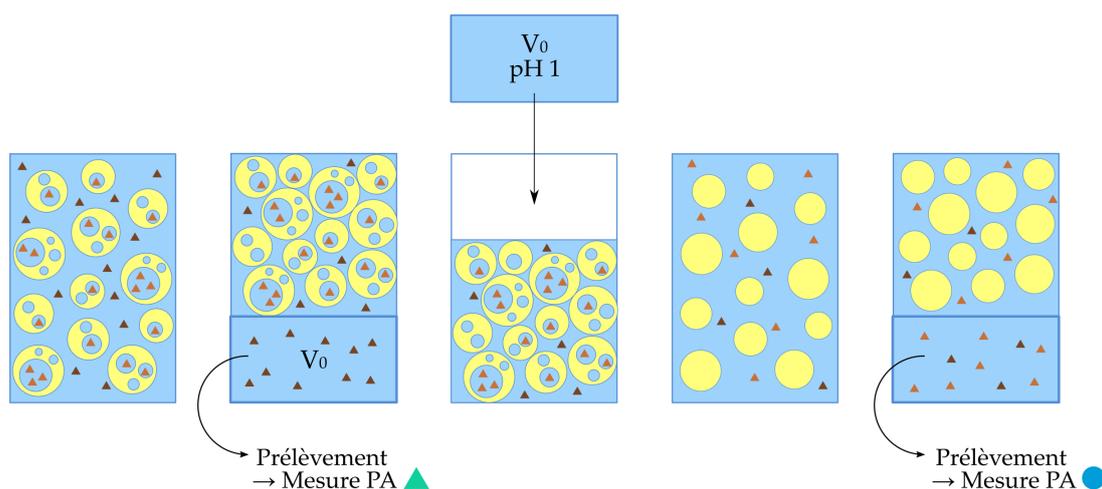


FIGURE IV.18 – Représentation schématique des étapes suivies pour les mesures de pouvoir antioxydant (PA) sur les émulsions. ▲ représente la catéchine encapsulée en phase aqueuse interne, ▲ celle contenue en phase aqueuse externe. Les symboles ▲ et ● renvoient au graphe de la FIGURE IV.19 page 159.

La concentration exacte en catéchine dans la phase aqueuse prélevée avant déstabilisation est  $a$

*priori* parfaitement connue puisqu'elle correspond à la concentration initialement introduite de 1 mg/mL. Cette solution est diluée pour mesurer du pouvoir antioxydant de façon à obtenir une concentration de 5  $\mu$ M (17,25 mg/L). Les mêmes taux de dilution sont appliqués pour la mesure du pouvoir antioxydant après déstabilisation. Dans ce cas, la phase aqueuse interne libérée en phase aqueuse externe et la phase aqueuse externe n'ayant pas été prélevée lors de la première étape (environ 700  $\mu$ L au total) sont diluées avec 700  $\mu$ L de phase aqueuse à pH 1 ne contenant pas de catéchine. La concentration en catéchine dans cet échantillon devrait donc être de 0,50 mg/mL, et donc de 2,5  $\mu$ M après dilution pour la mesure du pouvoir antioxydant.

On rappelle que la valeur du pouvoir antioxydant est exprimée en  $\mu$ mol ET/ $\mu$ mol, donc elle est normalisée par la concentration en catéchine de la solution mesurée. Si la concentration réelle est différente de la concentration qu'on suppose avoir en solution, alors la valeur de pouvoir antioxydant sera faussée.

#### IV.4.b Comportements attendus

Si on suppose que l'encapsulation dans les gouttelettes internes permet la protection de la catéchine et la préservation de ses propriétés antioxydantes, et que la catéchine est correctement relarguée après la diminution du pH, on s'attend à observer les évolutions suivantes :

- le pouvoir antioxydant mesuré en phase aqueuse externe avant déstabilisation devrait baisser car toute la catéchine présente dans cette phase va être dégradée au cours du temps ;
- le pouvoir antioxydant mesuré après déstabilisation, prenant en compte la catéchine stockée en phase aqueuse interne mais aussi une partie de celle présente en phase externe, devrait lui aussi diminuer. La diminution devrait cependant être plus lente car seul le pouvoir antioxydant de la catéchine de la phase externe diminue, celui de la catéchine issue de la phase aqueuse interne restant constant.

Le pouvoir antioxydant devrait donc initialement être identique pour les deux solutions, puis l'écart devrait augmenter, le pouvoir antioxydant obtenu avant libération diminuant plus rapidement.

#### IV.4.c Résultats

Les pouvoirs antioxydants obtenus avant et après déstabilisation sont représentés à la FIGURE IV.19.

La valeur du pouvoir antioxydant est toujours plus élevée après déstabilisation. Or, au moins au jour 0, pour lequel aucune dégradation n'a eu lieu, cette valeur devrait être similaire. Ceci peut être expliqué par deux hypothèses :

- Dans l'émulsion double, une bonne partie de la catéchine présente en phase aqueuse externe est liée au polymère, *a priori* par des liaisons hydrogènes, et cette interaction est rompue lors de la diminution du pH du fait de la création de charges sur le polymère. Cela conduit à la libération conjointe de la catéchine des gouttes internes et de la catéchine de la phase aqueuse externe présente aux interfaces ;
- La catéchine se lie au copolymère à bas pH pour former une structure qui a un pouvoir antioxydant plus élevé que la catéchine seule.

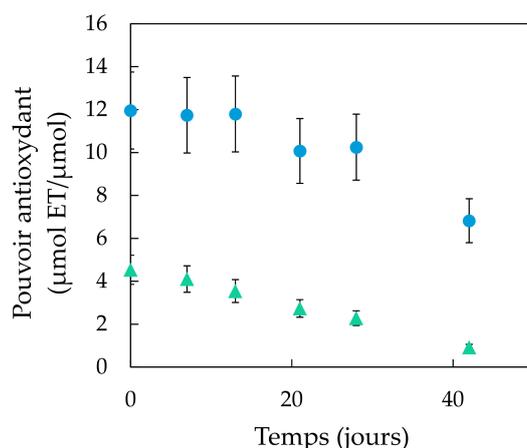


FIGURE IV.19 – Evolution des pouvoirs antioxydants de la catéchine mesurés : ▲ en phase aqueuse externe avant déstabilisation, ● en phase aqueuse après déstabilisation.

La première hypothèse semble la plus cohérente. Elle permettrait notamment d'interpréter la faible valeur de pouvoir antioxydant obtenue avant déstabilisation, très inférieure aux valeurs mesurées pour la catéchine libre en solution aqueuse qui sont plutôt autour de 10-15 au jour 0 (cf paragraphe III.2.b page 144). L'écart entre les valeurs de pouvoir antioxydant s'expliquerait alors par une erreur commise sur les concentrations en catéchine utilisées pour la normalisation dans le calcul du pouvoir antioxydant : la concentration serait sur-estimée lors de la mesure avant déstabilisation (puisque une partie de la catéchine n'est pas vraiment libre), et sous-estimée lors de la mesure après déstabilisation (la catéchine liée au copolymère en phase aqueuse externe étant libérée conjointement à la catéchine encapsulée au sein des gouttelettes internes), faussant les valeurs obtenues.

Malgré tout, l'écart entre les deux valeurs est très élevé, et ne semble pas cohérent avec les quantités de catéchine mesurées lors des différentes étapes de dialyse. En effet, 2,4 mg de catéchine sont récupérés à l'issue des trois étapes de lavage, soit 80% de la catéchine initialement introduite. Si on suppose que 10% de la catéchine restante est encapsulée dans les gouttelettes internes, et que les 10% restants sont liés au copolymère en phase aqueuse externe, on trouve un pouvoir antioxydant d'environ 5 avant déstabilisation et 10 après déstabilisation, en ayant modifié en conséquence les concentrations de normalisation utilisées lors des calculs de pouvoir antioxydant. L'écart entre les deux pouvoirs antioxydants serait donc réduit, mais resterait encore important : cette hypothèse à elle seule ne suffit pas à expliquer les résultats obtenus.

Pour en apprendre plus, il faudrait mesurer la concentration en catéchine dans les phases aqueuses avant et après déstabilisation par spectroscopie UV/visible. Il est probable que le spectre soit modifié après déstabilisation, comme observé lors des expériences de relargage par dialyse, mais la valeur obtenue avant déstabilisation donnera une indication de la quantité de catéchine restant dans l'émulsion lorsque celle-ci est déstabilisée.

Des mesures sur des phases aqueuses contenant un homopolymère de PDMAEMA soluble dans l'eau ainsi que de la catéchine pourraient également nous fournir des renseignements intéressants sur l'impact des interactions catéchine/copolymère sur la valeur du pouvoir antioxydant. Ces mesures sont cependant complexes à réaliser comme en attestent les résultats présentés en Annexe C.

Malgré notre difficulté à interpréter les résultats obtenus lors de ces expériences, ceux-ci sont très positifs car la valeur de pouvoir antioxydant après déstabilisation reste élevée pendant de nombreuses semaines. Il est tout à fait possible que l'adsorption de la catéchine sur la chaîne polymère rende la molécule moins disponible pour se dégrader. Elle conserverait alors une partie de ses propriétés antioxydantes, même dans la phase aqueuse externe. Ce phénomène a été observé par exemple par Yoshida et al.<sup>64</sup> avec l'adsorption de la vitamine A sur les argiles stabilisant leurs émulsions doubles.

#### IV.4.d Conclusions

Bien que les résultats obtenus soient difficiles à rationaliser, ces expériences de mesure de pouvoir antioxydant directement sur les émulsions nous permettent d'être plutôt optimistes quant à la protection qu'offrent ces édifices à la catéchine, ce malgré la valeur de pH élevée à laquelle sont formées nos émulsions.

## V Résultats préliminaires de coencapsulation de catéchine et curcumine au sein des émulsions

Comme nous l'avons vu en partie introductive, l'objectif ultime de ce travail de thèse est l'encapsulation conjointe de deux molécules au sein des émulsions doubles. Nous avons choisi de nous intéresser à la coencapsulation de la catéchine en phase aqueuse et de la curcumine en phase huile, deux molécules connues pour avoir un effet synergique lorsque libérées ensemble<sup>59,60</sup>. La molécule de curcumine est représentée à la FIGURE IV.20.

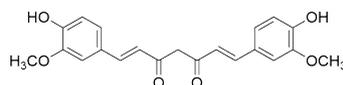


FIGURE IV.20 – Représentation de la molécule de curcumine.

La curcumine est une molécule hydrophobe, mais malgré tout assez peu soluble en phase huile. Pawar et al. ont réalisé une étude de solubilité de cette molécule dans différentes huiles<sup>61</sup>. Les meilleures solubilités sont obtenues pour la Maisine<sup>®</sup> (monolinoléate de glycérol), où l'on peut dissoudre jusqu'à 2,83mg/mL de curcumine, et le Peceol<sup>™</sup> (mono-oléate de glycérol), dans lequel 2,17 mg/mL de curcumine peuvent être dissous. L'huile de coco est aussi indiquée comme un bon solubilisant de la curcumine, avec 1,35 mg dissous par millilitre. Malheureusement, le Peceol<sup>™</sup> et l'huile de coco ne sont pas liquides à température ambiante, ce qui empêche de les envisager comme phase huile pour formuler nos émulsions. La Maisine<sup>®</sup> CC (constituée de mono, di et triglycérides d'acide linoléique représentés FIGURE IV.21) est liquide à température ambiante, son utilisation pour la formulation des émulsions chargées en curcumine peut donc être intéressante, à condition qu'elle soit capable de conduire à la formation d'émulsions stables.

L'huile de coco est constituée de triglycérides de tailles moyennes (*Medium Chains Triglycerides* ou MCT)<sup>62,63</sup>, de même que le Miglyol<sup>®</sup> 812 utilisé pour formuler nos émulsions, non testé par l'équipe de Pawar. Cette huile pourrait donc également constituer un bon candidat pour la formulation d'émulsions co-chargées en catéchine et curcumine.

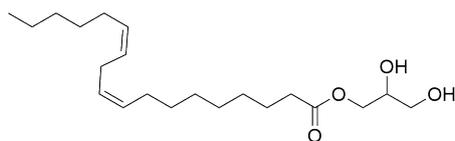


FIGURE IV.21 – Représentation du monolinoléate de glycérol, monoglycéride constituant la Maisine CC.

En revanche, la solubilité dans le myristate d'isopropyle est assez mauvaise, avec 0,77 mg/mL. Ajouté au fait que les émulsions stabilisées par cette huile en présence de catéchine sont inverses et non multiples, cela en fait un mauvais candidat pour la formulation de nos émulsions co-chargées.

### V.1 Mesures de solubilité de la curcumine dans différentes huiles

Pour vérifier les limites de solubilité données par Pawar et al., une étude a été menée avec la Maisine<sup>®</sup> CC, le Miglyol<sup>®</sup> 812 et le myristate d'isopropyle. Pour cela, la curcumine à une concentration bien inférieure à la limite de solubilité donnée par Pawar est dissoute dans chaque huile (0,3 mg/mL) à 50°C sous agitation. La solution est laissée revenir à température ambiante puis une droite d'étalonnage est réalisée en spectroscopie UV/visible à partir de cette solution, en relevant l'absorbance au maximum d'absorption, à 418 nm, pour des concentrations variant entre 3 et 24 mg/L. Ces droites d'étalonnage sont données en Annexe B.2.

Un volume d'huile contenant une concentration en curcumine supérieure à la limite de solubilité est ensuite préparée (2 mg/mL pour le Miglyol<sup>®</sup> 812 et le myristate d'isopropyle, et 4 mg/mL pour la Maisine<sup>®</sup> CC). Cette solution est laissée agiter durant 72 h, en chauffant à 50°C pour améliorer la solubilisation. Les solutions sont ensuite laissées revenir à température ambiante, puis un petit volume est prélevé et centrifugé pour permettre la sédimentation de la curcumine non solubilisée. Le surnageant est ensuite dilué 500 fois dans l'huile pour la mesure d'absorbance. La concentration de curcumine dans le surnageant donne accès à la limite de solubilité.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Huile	Solubilité
Maisine <sup>®</sup> CC	1,3 mg/mL
Miglyol <sup>®</sup> 812	1,5 mg/mL
Myristate d'isopropyle	0,50 mg/mL

Les valeurs obtenues pour le myristate d'isopropyle mais surtout pour la Maisine<sup>®</sup> CC sont inférieures à celles obtenues par l'équipe de Pawar. Cependant, dans cette publication, les solubilités de la curcumine sont mesurées pour des huiles solides à température ambiante (environ 20°C), on peut donc supposer que les mesures effectuées par les auteurs sont en fait réalisées à des températures supérieures à 25°C, ce qui expliquerait les valeurs de solubilité plus élevées qu'ils obtiennent.

La solubilité dans le Miglyol<sup>®</sup> 812, huile non étudiée par les auteurs, est une bonne surprise puisqu'elle est assez élevée. Il est donc envisageable de coencapsuler la catéchine et la curcumine au sein de nos émulsions doubles formées avec cette huile.

## V.2 Coencapsulation de catéchine et curcumine

La curcumine est une molécule fluorescente. Excitée par le LASER multi-argon utilisé pour nos observations en microscopie confocale, elle est détectée, ce qui permet sa localisation au sein des émulsions, ainsi que la détermination de la structure des émulsions, sans qu'il soit nécessaire d'ajouter du Rouge Nil en phase huile. Sur les images à suivre, la curcumine apparaîtra en bleu.

Les émulsions sont formées suivant le protocole décrit page 145. La phase huile est préparée comme suit : 1 mg/mL de curcumine sont dissous dans le Miglyol<sup>®</sup> 812, à 50°C sous agitation. Quand la curcumine est dissoute (plus de solide visible à l'œil nu), le PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub> est ajouté à la solution à une concentration de 5 mg/mL, et dissous à température ambiante dans la phase huile chargée en curcumine.

Les solutions de curcumine dans toutes les huiles sont de couleur jaune vif et limpides. De façon étonnante, quand la phase huile contenant le polymère est mise au contact de la phase aqueuse, la phase huile prend après 24 h une teinte orange foncé et opaque comme illustré sur la FIGURE IV.22(a). Cette solution a pourtant exactement le même spectre UV/visible que la solution de curcumine en l'absence de polymère, comme l'atteste la FIGURE IV.22(b). Ce phénomène se produit également en l'absence de catéchine en phase aqueuse. L'apparition de la coloration est donc liée au couple copolymère/curcumine, dissous en phase huile Miglyol<sup>®</sup> 812 au contact avec une phase aqueuse.

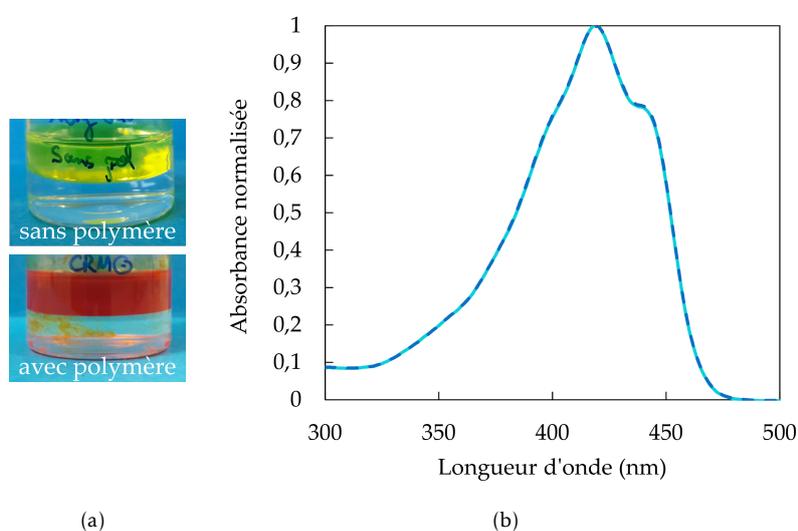


FIGURE IV.22 – Changement de coloration de la phase huile mise au contact avec l'eau en présence de curcumine et de copolymère. (a) Images des phases Miglyol<sup>®</sup> 812 + curcumine au contact d'une phase aqueuse, avec et sans polymère; (b) Spectre UV/visible de la curcumine en solution dans le Miglyol<sup>®</sup> 812 --- en l'absence de copolymère, — en présence de copolymère.

Ce changement de coloration suggère une interaction entre la curcumine et le copolymère en phase huile, en présence d'eau, conduisant probablement à la formation d'un précipité solide qui expliquerait d'une part l'opacité de la phase huile, mais aussi les spectres UV/visibles identiques, la mesure ne prenant en compte que la curcumine réellement dissoute en phase huile.

### V.2.a Formation des émulsions chargées en curcumine avec le Miglyol<sup>®</sup> 812

Lorsque le Miglyol<sup>®</sup> 812 contenant la curcumine est émulsifié avec une phase aqueuse contenant la catéchine, des émulsions doubles peuvent être obtenues. Le taux d'encapsulation de celles-ci semble en revanche bien plus faible que les émulsions chargées en catéchine uniquement (cf FIGURE IV.23(a)). La curcumine est en outre répartie de façon très inhomogène en phase huile : elle forme des agrégats, qui semblent majoritairement se trouver en phase aqueuse (cf FIGURE IV.23(b)). Le même type de comportement est observé en l'absence de catéchine en phase aqueuse. Ceci confirme qu'il doit exister des interactions curcumine/copolymère/Miglyol<sup>®</sup> 812 lorsque la phase huile est mise au contact avec de l'eau, qui conduisent à la formation d'agrégats lors de l'émulsification. Cela confirme la possible précipitation de la curcumine au contact avec la phase aqueuse, conduisant à la modification de la couleur de la phase huile.

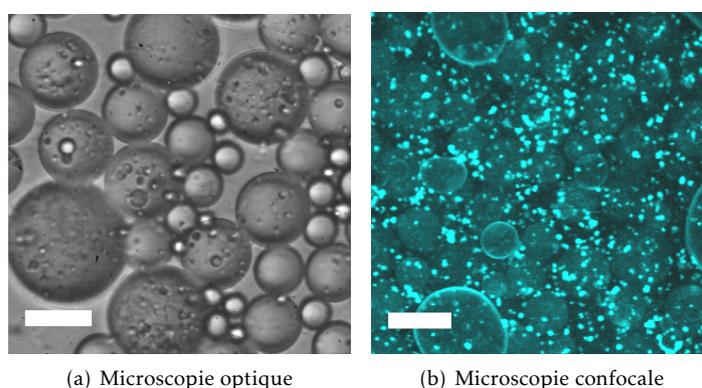


FIGURE IV.23 – Images en microscopies (a) optique et (b) confocale d'une émulsion chargée en catéchine et curcumine, formée à pH 8 et 1 M en NaCl et avec le Miglyol<sup>®</sup> 812. La curcumine, fluorescente, apparaît en bleu sur l'image (b), sous forme d'agrégats. Les barres d'échelle représentent 30  $\mu\text{m}$ .

### V.2.b Utilisation de la Maisine<sup>®</sup> CC

Pour résoudre ce problème de formation d'agrégats, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de la Maisine<sup>®</sup> CC pour la formation de nos émulsions, afin de voir si la solubilité de la curcumine dans cette huile pouvait être améliorée, et si des multiples pouvaient être stabilisées avec cette huile. Nous nous sommes ici restreints à l'étude d'émulsions chargées uniquement en curcumine, de façon à simplifier le système. Le protocole de préparation de la phase huile est le même que celui décrit au paragraphe V.2. Plusieurs conditions de pH et de concentrations en NaCl sont étudiées. La solution de curcumine dans la Maisine<sup>®</sup> CC reste jaune et transparente à l'issue des 24 h de mise au contact des phases eau et huile. C'est donc bien le triptyque curcumine/copolymère/Miglyol<sup>®</sup> 812 qui pose problème. L'eau est relativement soluble dans le Miglyol<sup>®</sup> 812. La teneur en eau de cette huile est indiquée par le fabricant comme étant autour de 10 mg/L. Les mesures de DLS ont en outre permis de constater que de gros objets gonflés par l'eau étaient formés en phase huile, probablement par un phénomène d'émulsification spontanée. L'eau semble avoir une affinité moins bonne pour la Maisine<sup>®</sup> CC (sa teneur en eau est deux fois plus faible). Ce paramètre, ainsi que les différences structurelles des deux huiles, pourraient expliquer pourquoi la curcumine forme des agrégats avec le Miglyol<sup>®</sup> 812 mais pas la Maisine<sup>®</sup> CC.

Nous n'avons réussi à obtenir que des émulsions inverses pour des émulsions eau / Maisine<sup>®</sup> CC / PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub>. Cependant, la curcumine semble cette fois-ci dissoute de façon homogène en phase huile, ce qui est un progrès par rapport aux résultats obtenus avec le Miglyol<sup>®</sup> 812. Un exemple de ces émulsions inverses est présenté à la FIGURE IV.24(a).

Des mélanges Miglyol<sup>®</sup> 812 / Maisine<sup>®</sup> CC apparaissent alors comme une bonne alternative pour former des émulsions doubles dans lesquelles la curcumine est correctement dissoute. Des tests préliminaires ont été effectués pour des émulsions formées à partir d'une phase aqueuse à pH 8 et 1 M en NaCl, pour des mélanges Maisine<sup>®</sup> CC / Miglyol<sup>®</sup> 812 en proportion 75/25, 50/50 et 25/75 en volume. Tous ces mélanges permettent une solubilisation correcte de la curcumine, et aucun changement de couleur de la phase huile n'est observé durant les 24 h de mise au contact des deux phases. Le meilleur résultat a été obtenu pour un mélange d'huile de 75% de Maisine<sup>®</sup> CC et 25% de Miglyol<sup>®</sup> 812 (cf FIGURE IV.24(b)) pour lequel une émulsion E/H/E avec un taux d'encapsulation correct est formée. Malheureusement cette émulsion est devenue directe 24 h après émulsification, comme présenté à la FIGURE IV.24(c). Pour les autres proportions testées, des émulsions doubles sont également obtenues mais encapsulant peu d'eau, dans des gouttelettes de petite taille. Elles deviennent rapidement directes également.

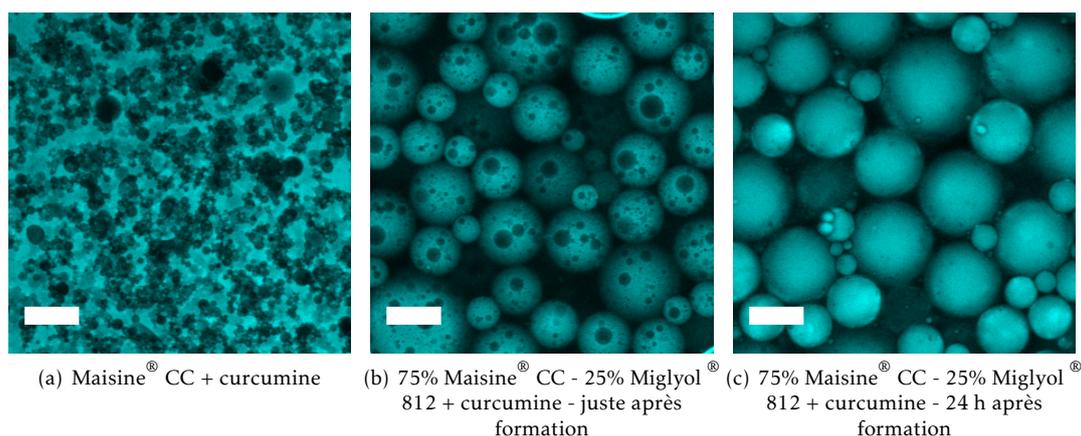


FIGURE IV.24 – Émulsions formées à partir de Maisine<sup>®</sup> CC et en présence de curcumine. (a) Exemple d'émulsion inverse obtenue avec 100% de Maisine<sup>®</sup> CC en phase huile, (b) Émulsion E/H/E formée à partir d'un mélange Maisine<sup>®</sup> CC / Miglyol<sup>®</sup> 812 et d'une phase aqueuse à pH 8 et une concentration en NaCl de 1 M, en présence de curcumine en phase huile, (c) Émulsion (b) 24 h après émulsification, l'émulsion est devenue directe. Les barres d'échelle représentent 30  $\mu$ m.

### V.2.c Conclusion

Nous n'avons pas réussi à obtenir d'émulsions doubles stables dans laquelle la curcumine est correctement solubilisée. Cependant, l'utilisation d'un mélange Maisine<sup>®</sup> CC / Miglyol<sup>®</sup> 812 permet d'obtenir une phase huile où la curcumine est solubilisée de façon homogène, et des émulsions multiples ont pu être observées même si les gouttes internes coalescent rapidement avec la phase aqueuse externe. Ce travail seulement préliminaire est à poursuivre, notamment pour explorer d'autres conditions de pH et de concentrations en NaCl, et d'autres proportions de mélange entre les deux huiles. L'objectif sera d'obtenir des émulsions doubles stables dans lesquelles la curcumine est correctement solubilisée, le but *in fine* étant d'ajouter la catéchine en

phase aqueuse afin d'avoir une émulsion co-chargée.

De plus, il a été observé dans la littérature par Yoshida et al.<sup>64</sup> que l'ajout d'un antioxydant en phase huile permettait d'aider à préserver le pouvoir antioxydant d'une molécule fragile encapsulée en phase aqueuse interne. Nous n'avons pas observé cet effet sur les mesures de pouvoir antioxydant sur les phases non émulsifiées présentées au paragraphe III.2.b page 144, mais nous avons pu voir que la formulation en émulsions conduit à des résultats différents des mesures en volume, probablement du fait de la quantité d'interface beaucoup plus grande. La curcumine pourrait donc aider à préserver l'intégrité de la catéchine, la coencapsulation présentant alors un double avantage.

A RETENIR DE CE CHAPITRE :

- La catéchine est un antioxydant fragile, son oxydation conduit à son oligomérisation et à la dégradation de ses propriétés antioxydantes. La catéchine libre présente une stabilité optimale pour des pH autour de 4.
- Le copolymère PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub> est capable de stabiliser des émulsions doubles E/H/E avec le Miglyol<sup>®</sup> 812 en présence de catéchine si la concentration en sel est suffisamment faible. Il a cependant été impossible de stabiliser des émulsions à des pH inférieurs à 8. Avec le myristate d'isopropyle, des émulsions inverses sont obtenues.
- Il est possible de laver la phase aqueuse des émulsions chargées en catéchine sans les déstabiliser. Le relargage d'une certaine quantité de catéchine a été observé après déstabilisation à pH 1. Le spectre UV/visible de la molécule relarguée est modifié, ce qui empêche la quantification précise du taux d'encapsulation, mais il semble faible.
- La formulation en émulsion permet de préserver le pouvoir antioxydant de la catéchine sur plusieurs semaines, même à pH 8, les mécanismes de cette stabilisation étant cependant encore mal compris.
- Les phénomènes observés (relargage incomplet, modification du spectre UV/visible, pouvoir antioxydant élevé) sont probablement liés à la formation de liaisons hydrogènes copolymère/catéchine.
- La formulation d'émulsions cochargées catéchine/curcumine pose des problèmes de solubilisation de la curcumine en phase huile. Un mélange d'huiles pourrait permettre de résoudre ce problème mais aucune émulsion double stable n'a pour l'instant été obtenue.

## Bibliographie

- [1] Zhu, Q. Y.; Holt, R. R.; Lazarus, S. A.; Ensunsa, J. L.; Hammerstone, J. F.; Schmitz, H. H.; Keen, C. L. Stability of the Flavan-3-Ols Epicatechin and Catechin and Related Dimeric Procyanidins Derived from Cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 1700–1705.
- [2] Zhu, Q. Y.; Hammerstone, J. F.; Lazarus, S. A.; Schmitz, H. H.; Keen, C. L. Stabilizing Effect of Ascorbic Acid on Flavan-3-Ols and Dimeric Procyanidins from Cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 828–833.
- [3] Kofink, M.; Papagiannopoulos, M.; Galensa, R. (-)-Catechin in Cocoa and Chocolate : Occurrence and Analysis of an Atypical Flavan-3-Ol Enantiomer. *Molecules* **2007**, *12*, 1274–1288.
- [4] Gu, L.; House, S. E.; Wu, X.; Ou, B.; Prior, R. L. Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 4057–4061.
- [5] Charouf, Z.; Guillaume, D. Phenols and Polyphenols from *Argania Spinosa*. *American Journal of Food Technology* **2007**, *2*, 679–683.
- [6] Cheng, G. W.; Crisosto, C. H. Browning Potential, Phenolic Composition, and Polyphenoloxidase Activity of Buffer Extracts of Peach and Nectarine Skin Tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **1995**, *120*, 835–838.
- [7] Ananingsih, V. K.; Sharma, A.; Zhou, W. Green Tea Catechins during Food Processing and Storage : A Review on Stability and Detection. *Food Research International* **2013**, *50*, 469–479.
- [8] Li, N.; Taylor, L. S.; Ferruzzi, M. G.; Mauer, L. J. Color and Chemical Stability of Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate in Solution and Solid States. *Food Research International* **2013**, *53*, 909–921.
- [9] Li, N.; Taylor, L. S.; Ferruzzi, M. G.; Mauer, L. J. Kinetic Study of Catechin Stability : Effects of pH, Concentration, and Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 12531–12539.
- [10] Chen, Z.-Y.; Zhu, Q. Y.; Tsang, D.; Huang, Y. Degradation of Green Tea Catechins in Tea Drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 477–482.
- [11] Nakagawa, T.; Yokozawa, T. Direct Scavenging of Nitric Oxide and Superoxide by Green Tea. *Food and Chemical Toxicology* **2002**, *40*, 1745–1750.
- [12] Guo, Q.; Zhao, B.; Shen, S.; Hou, J.; Hu, J.; Xin, W. ESR Study on the Structure–antioxidant Activity Relationship of Tea Catechins and Their Epimers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1999**, *1427*, 13–23.
- [13] Paquay, J. B. G.; Haenen, G. R. M. M.; Stender, G.; Wiseman, S. A.; Tijburg, L. B. M.; Bast, A. Protection against Nitric Oxide Toxicity by Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 5768–5772.
- [14] Salah, N.; Miller, N. J.; Paganga, G.; Tijburg, L.; Bolwell, G. P.; Riceevans, C. Polyphenolic Flavanols as Scavengers of Aqueous Phase Radicals and as Chain-Breaking Antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1995**, *322*, 339–346.
- [15] Zaveri, N. T. Green Tea and Its Polyphenolic Catechins : Medicinal Uses in Cancer and Noncancer Applications. *Life Sciences* **2006**, *78*, 2073–2080.
- [16] Fraga, C. G.; Galleano, M.; Verstraeten, S. V.; Oteiza, P. I. Basic Biochemical Mechanisms behind the Health Benefits of Polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine* **2010**, *31*, 435–445.
- [17] Frei, B.; Higdon, J. V. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo : Evidence from Animal Studies. *The Journal of Nutrition* **2003**, *133*, 3275S–3284S.
- [18] Bernatoniene, J.; Kopustinskiene, D. M. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules* **2018**, *23*, 965.
- [19] Tipoe, G. L.; Leung, T.-M.; Hung, M.-W.; Fung, M.-L. Green Tea Polyphenols as an Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Agent for Cardiovascular Protection. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/chddt/2007/00000007/00000002/art00008>, 2007.

- [20] Khan, N.; Mukhtar, H. Tea Polyphenols for Health Promotion. *Life Sciences* **2007**, *81*, 519–533.
- [21] Hakim, I. A.; Harris, R. B. Joint Effects of Citrus Peel Use and Black Tea Intake on the Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Skin. *BMC Dermatology* **2001**, *1*, 3.
- [22] Mu, L. N.; Zhou, X. F.; Ding, B. G.; Wang, R. H.; Zhang, Z. F.; Chen, C. W.; Wei, G. R.; Zhou, X. M.; Jiang, Q. W.; Yu, S. Z. [A case-control study on drinking green tea and decreasing risk of cancers in the alimentary canal among cigarette smokers and alcohol drinkers]. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi* **2003**, *24*, 192–195.
- [23] Kubík, A. K.; Zatloukal, P.; Tomášek, L.; Pauk, N.; Havel, L.; Křepela, E.; Petruželka, L. Dietary Habits and Lung Cancer Risk among Non-Smoking Women. *European Journal of Cancer Prevention* **2004**, *13*, 471–480.
- [24] Wang, M.; Guo, C.; Li, M. A Case-Control Study on the Dietary Risk Factors of Upper Digestive Tract Cancer. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi* **1999**, *20*, 95–97.
- [25] Ji, B.-T.; Chow, W.-H.; Hsing, A. W.; McLaughlin, J. K.; Dai, Q.; Gao, Y.-T.; Blot, W. J.; Fraumeni, J. F. Green Tea Consumption and the Risk of Pancreatic and Colorectal Cancers. *International Journal of Cancer* **1997**, *70*, 255–258.
- [26] Sun, C.-L.; Yuan, J.-M.; Koh, W.-P.; Yu, M. C. Green Tea, Black Tea and Breast Cancer Risk : A Meta-Analysis of Epidemiological Studies. *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 1310–1315.
- [27] Lambert, J. D.; Yang, C. S. Cancer Chemopreventive Activity and Bioavailability of Tea and Tea Polyphenols. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2003**, *523-524*, 201–208.
- [28] Baliga, M. S.; Meleth, S.; Katiyar, S. K. Growth Inhibitory and Antimetastatic Effect of Green Tea Polyphenols on Metastasis-Specific Mouse Mammary Carcinoma 4T1 Cells In Vitro and In Vivo Systems. *Clinical Cancer Research* **2005**, *11*, 1918–1927.
- [29] Jankun, J.; Selman, S. H.; Swiercz, R.; Skrzypczak-Jankun, E. Why Drinking Green Tea Could Prevent Cancer. *Nature* **1997**, *387*, 561.
- [30] Ahmad, N.; Feyes, D. K.; Nieminen, A. L.; Agarwal, R.; Mukhtar, H. Green Tea Constituent Epigallocatechin-3-Gallate and Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Carcinoma Cells. *Journal of the National Cancer Institute* **1997**, *89*, 1881–1886.
- [31] Mukhtar, H.; Ahmad, N. Tea Polyphenols : Prevention of Cancer and Optimizing Health. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2000**, *71*, 1698S–1702S.
- [32] Noormandi, A.; Dabaghzadeh, F. Effects of Green Tea on Escherichia Coli as a Uropathogen. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **2014**, *5*, 15–20.
- [33] Cho, Y. S.; Schiller, N. L.; Kahng, H. Y.; Oh, K. H. Cellular Responses and Proteomic Analysis of Escherichia Coli Exposed to Green Tea Polyphenols. *Current Microbiology* **2007**, *55*, 501–506.
- [34] Stapleton, P. D.; Shah, S.; Anderson, J. C.; Hara, Y.; Hamilton-Miller, J. M. T.; Taylor, P. W. Modulation of  $\beta$ -Lactam Resistance in Staphylococcus Aureus by Catechins and Gallates. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2004**, *23*, 462–467.
- [35] Kawai, K.; Tsuno, N. H.; Kitayama, J.; Okaji, Y.; Yazawa, K.; Asakage, M.; Hori, N.; Watanabe, T.; Takahashi, K.; Nagawa, H. Epigallocatechin Gallate, the Main Component of Tea Polyphenol, Binds to CD4 and Interferes with Gp120 Binding. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2003**, *112*, 951–957.
- [36] Kao, Y.-H.; Hiipakka, R. A.; Liao, S. Modulation of Endocrine Systems and Food Intake by Green Tea Epigallocatechin Gallate. *Endocrinology* **2000**, *141*, 980–987.
- [37] Kao, Y.-H.; Chang, H.-H.; Lee, M.-J.; Chen, C.-L. Tea, Obesity, and Diabetes. *Molecular Nutrition & Food Research* **2006**, *50*, 188–210.
- [38] Juhel, C.; Armand, M.; Pafumi, Y.; Rosier, C.; Vandermader, J.; Lairon, D. Green Tea Extract (AR25®) Inhibits Lipolysis of Triglycerides in Gastric and Duodenal Medium in Vitro. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2000**, *11*, 45–51.

- [39] Crespy, V.; Williamson, G. A Review of the Health Effects of Green Tea Catechins in In Vivo Animal Models. *The Journal of Nutrition* **2004**, *134*, 3431S–3440S.
- [40] Kao, Y.-h.; Hiipakka, R. A.; Liao, S. Modulation of Obesity by a Green Tea Catechin. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2000**, *72*, 1232–1233.
- [41] Waltner-Law, M. E.; Wang, X. L.; Law, B. K.; Hall, R. K.; Nawano, M.; Granner, D. K. Epigallocatechin Gallate, a Constituent of Green Tea, Represses Hepatic Glucose Production. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 34933–34940.
- [42] Anderson, R. A.; Polansky, M. M. Tea Enhances Insulin Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 7182–7186.
- [43] Fan, F.-Y.; Sang, L.-X.; Jiang, M. Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease. *Molecules* **2017**, *22*, 484.
- [44] Komatsu, Y.; Suematsu, S.; Hisanobu, Y.; Saigo, H.; Matsuda, R.; Hara, K. Effects of pH and Temperature on Reaction Kinetics of Catechins in Green Tea Infusion. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1993**, *57*, 907–910.
- [45] Xu, J. Z.; Yeung, S. Y. V.; Chang, Q.; Huang, Y.; Chen, Z.-Y. Comparison of Antioxidant Activity and Bioavailability of Tea Epicatechins with Their Epimers. *British Journal of Nutrition* **2004**, *91*, 873–881.
- [46] Zhu, Q. Y.; Zhang, A.; Tsang, D.; Huang, Y.; Chen, Z.-Y. Stability of Green Tea Catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 4624–4628.
- [47] Bailey, R. G.; Nursten, H. E.; McDowell, I. Isolation and Analysis of a Polymeric Thearubigin Fraction from Tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1992**, *59*, 365–375.
- [48] Roginsky, V.; Alegria, A. E. Oxidation of Tea Extracts and Tea Catechins by Molecular Oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 4529–4535.
- [49] Sang, S.; Lee, M.-J.; Hou, Z.; Ho, C.-T.; Yang, C. S. Stability of Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate and Formation of Dimers and Epimers under Common Experimental Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 9478–9484.
- [50] Tanaka, T.; Mine, C.; Watarumi, S.; Fujioka, T.; Mihashi, K.; Zhang, Y.-J.; Kouno, I. Accumulation of Epigallocatechin Quinone Dimers during Tea Fermentation and Formation of Theasinensins. *Journal of Natural Products* **2002**, *65*, 1582–1587.
- [51] Roberts, E. a. H.; Myers, M. The Phenolic Substances of Manufactured Tea. IV.—Enzymic Oxidations of Individual Substrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1959**, *10*, 167–172.
- [52] Sang, S.; Cheng, X.; Stark, R. E.; Rosen, R. T.; Yang, C. S.; Ho, C.-T. Chemical Studies on Antioxidant Mechanism of Tea Catechins: Analysis of Radical Reaction Products of Catechin and Epicatechin with 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, *10*, 2233–2237.
- [53] Xu, J.; Tan, T.; Kenne, L.; Sandström, C. The Use of Diffusion-Ordered Spectroscopy and Complexation Agents to Analyze Mixtures of Catechins. *New Journal of Chemistry* **2009**, *33*, 1057–1063.
- [54] Cao, G.; Prior, R. L. [5]Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity in Biological Samples. *Methods in Enzymology* **1999**, *299*, 50–62.
- [55] Van Der Werf, R. Evaluation Du Pouvoir Antioxydant Des Aliments. Recherche de Leur Effets Modulateurs Sur Le Stress Oxydant Dans Le Cas Du Diabète. Ph.D. thesis, Université de Strasbourg, 2013.
- [56] Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 4619–4626.
- [57] Li, J.; Zhu, B.; He, Y.; Inoue, Y. Thermal and Infrared Spectroscopic Studies on Hydrogen-Bonding Interaction between Poly(3-Hydroxybutyrate) and Catechin. *Polymer Journal* **2003**, *35*, 384–392.

- 
- [58] Zhu, B.; Li, J.; He, Y.; Yamane, H.; Kimura, Y.; Nishida, H.; Inoue, Y. Effect of Steric Hindrance on Hydrogen-Bonding Interaction between Polyesters and Natural Polyphenol Catechin. *Journal of Applied Polymer Science* **2004**, *91*, 3565–3573.
- [59] Manikandan, R.; Beulaja, M.; Arulvasu, C.; Sellamuthu, S.; Dinesh, D.; Prabhu, D.; Babu, G.; Vaseeharan, B.; Prabhu, N. M. Synergistic Anticancer Activity of Curcumin and Catechin : An in Vitro Study Using Human Cancer Cell Lines. *Microscopy Research and Technique* **2012**, *75*, 112–116.
- [60] Betts, J. W.; Wareham, D. W. In Vitro Activity of Curcumin in Combination with Epigallocatechin Gallate (EGCG) versus Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*. *BMC Microbiology* **2014**, *14*, 172.
- [61] Pawar, Y. B.; Purohit, H.; Valicherla, G. R.; Munjal, B.; Lale, S. V.; Patel, S. B.; Bansal, A. K. Novel Lipid Based Oral Formulation of Curcumin : Development and Optimization by Design of Experiments Approach. *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, *436*, 617–623.
- [62] Kuksis, A.; McCarthy, M. J.; Beveridge, J. M. R. Triglyceride Composition of Native and Rearranged Butter and Coconut Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1964**, *41*, 201–205.
- [63] Bezard, J.; Bugaut, M.; Clement, G. Triglyceride Composition of Coconut Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1971**, *48*, 134–139.
- [64] Yoshida, K.; Sekine, T.; Matsuzaki, F.; Yanaki, T.; Yamaguchi, M. Stability of Vitamin A in Oil-in-Water-in-Oil-Type Multiple Emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1999**, *76*, 1–6.



# Chapitre V

## Formation d'émulsions E/H/E par voie microfluidique, encapsulation de catéchine

### Sommaire

---

<b>I</b>	<b>La microfluidique et son utilisation pour la génération de gouttes</b>	<b>173</b>
I.1	Principes généraux de la microfluidique	173
	Des écoulements dominés par des forces inhabituelles	173
	Microfluidique et écoulements laminaires	173
	Avantages et applications de la microfluidique	173
I.2	Matériaux utilisés pour former les puces microfluidiques	174
I.2.a	Verre et silicium	174
I.2.b	Polymères	174
I.2.c	Autres matériaux	176
I.3	Génération de gouttes en microfluidique	176
I.3.a	Différentes géométries permettant la formation de gouttes simples	178
	Le co-écoulement	178
	Les jonctions en T	178
	La focalisation de flux	179
I.3.b	Adaptation à la formation de doubles émulsions	179
I.3.c	Concilier des mouillabilités opposées sur la même puce	181
	Activation des surfaces et greffage/adsorption de molécules	181
	Via un traitement de surface local	181
	Sans traitement de surface	181
<b>II</b>	<b>Mise au point d'une technique permettant la formation de gouttes multiples au sein de la même puce microfluidique</b>	<b>183</b>
II.1	Mode opératoire	183
	Fabrication des moules	183
	Fabrication des puces	184
	Fermeture des puces	184

II.2	Caractérisation des surfaces protégées par le marqueur . . . . .	185
II.2.a	Mesures d'angles de contact . . . . .	185
II.2.b	Utilisation d'un marquage fluorescent . . . . .	186
II.2.c	Conclusion . . . . .	187
II.3	Formation de doubles émulsions E/H/E avec des tensioactifs modèles . . .	187
II.4	Conclusions . . . . .	188
<b>III</b>	<b>Formation d'émulsions stabilisées par des copolymères PDMS-<i>b</i>-PDMAEMA par voie microfluidique . . . . .</b>	<b>190</b>
III.1	Formation d'émulsions simples . . . . .	190
III.1.a	Émulsions directes . . . . .	191
	Émulsions obtenues et stabilité . . . . .	192
III.1.b	Émulsions inverses . . . . .	194
	Émulsions obtenues et stabilité . . . . .	194
III.1.c	Conclusions . . . . .	194
III.2	Formation d'émulsions doubles en microfluidique . . . . .	196
III.2.a	Optimisation de la géométrie de la puce . . . . .	196
III.2.b	Influence des paramètres physico-chimiques . . . . .	197
	Mesures de tensions interfaciales . . . . .	199
	Mesures de viscosité . . . . .	200
	Mesures d'angles de contact . . . . .	200
	Conclusions . . . . .	202
III.2.c	Formation et récolte d'émulsions doubles . . . . .	203
	Conclusions . . . . .	204
III.2.d	Formation d'émulsions doubles chargées en catéchine . . . . .	204
	Préparation des échantillons . . . . .	204
	Résultats obtenus . . . . .	204
	Relargage de la catéchine . . . . .	205
	Conclusions . . . . .	209

---

# I La microfluidique et son utilisation pour la génération de gouttes

## I.1 Principes généraux de la microfluidique

**Des écoulements dominés par des forces inhabituelles** La microfluidique est la science de la manipulation de fluides à l'échelle micrométrique. Se placer à cette échelle permet d'obtenir des comportements différents de ceux observés habituellement à l'échelle macroscopique. En effet, les différentes forces s'appliquant sur les particules fluides ne vont pas avoir la même importance selon que l'on se place à l'échelle du micromètre ou du mètre. Pour un système de dimension caractéristique  $L$ , une force variant en  $L^\alpha$  aura d'autant plus d'influence que l'exposant  $\alpha$  sera grand si on se place à l'échelle macroscopique. A l'inverse, à l'échelle microscopique où les tailles varient entre  $10^{-6}$  et  $10^{-4}$  m, les forces seront d'autant plus importantes que l'exposant  $\alpha$  sera petit. Par exemple, le poids, qui varie en  $L^3$ , sera négligeable à l'échelle microscopique devant les forces capillaires qui varient en  $L$ , ou devant les forces de tension interfaciale qui varient en  $L^2$ .

**Microfluidique et écoulements laminaires** Le nombre de Reynolds  $Re$  est un nombre sans dimension utilisé couramment en fluidique pour prédire le régime d'un écoulement. Il compare l'importance relative des forces d'inertie et des forces d'origine visqueuse et s'exprime en fonction de la dimension caractéristique du système,  $\ell$ , de la vitesse de l'écoulement  $U$  et de la viscosité cinématique du fluide  $\nu$  :

$$Re = \frac{\ell U}{\nu}$$

A bas nombre de Reynolds ( $<1$ ), l'écoulement sera dit *laminaire*, c'est-à-dire que toutes les particules fluides suivent la même trajectoire rectiligne, tandis qu'à haut nombre de Reynolds on parle d'écoulements *turbulents*, avec apparition de tourbillons. Dans le cadre de la microfluidique, les tailles sont de l'ordre de la dizaine à la centaine de micromètres, et les vitesses de l'ordre du cm/s. Le nombre de Reynolds est donc dans la très grande majorité des cas compris entre 0,1 et 1 ; c'est-à-dire que l'écoulement sera laminaire et donc mieux maîtrisé. On peut ainsi envisager d'avoir un co-écoulement de deux liquides miscibles dans le même canal sans véritable mélange entre eux, le seul moteur du mélange étant alors la diffusion<sup>1,2</sup>.

**Avantages et applications de la microfluidique** Un système microfluidique est classiquement appelé une *puce* (*chip* en anglais), par analogie avec les semi-conducteurs, les canaux remplaçant ici les transistors. Elle est constituée d'un assemblage de petits canaux circulaires ou rectangulaires de taille comprise entre 10  $\mu\text{m}$  et 1 mm. Les liquides sont injectés dans ces canaux par des seringues dont on contrôle le débit, ou bien par des dispositifs permettant d'injecter les liquides à une pression donnée. Au sein de ces puces peuvent être réalisées diverses opérations comme la formation de gouttes ou le mélange de plusieurs fluides.

La microfluidique a ouvert la porte à de nouvelles façons d'envisager la chimie ou la biologie. Travailler sur des systèmes de quelques centimètres, avec des volumes du pico au nanolitre, permet d'envisager de nombreuses applications impensables jusqu'alors. En chimie, on peut créer des microréacteurs dans des gouttelettes et cribler rapidement des dizaines de molécules pour comparer leur réactivité, tout en utilisant très peu de réactifs<sup>3,4</sup>. Il est aussi possible de miniaturiser sur des puces les techniques classiques de séparation et d'analyse<sup>5-8</sup>, permettant de créer des laboratoires sur puce (*lab-on-a-chip*) qui sont facilement transportables, et nécessitent des

volumes extrêmement faibles de substance à analyser. En biologie, ces microcanaux permettent de réaliser rapidement des immunoessais<sup>9,10</sup>, par exemple en injectant des anticorps dans un canal greffé d'antigènes, ou encore de cultiver et transporter des cellules<sup>11,12</sup>.

## I.2 Matériaux utilisés pour former les puces microfluidiques

### I.2.a Verre et silicium

La technologie de la microfluidique est directement inspirée de la microélectronique. Les premières puces ont donc été créées avec des techniques analogues à celles existant déjà dans ce domaine. Elles étaient souvent constituées d'un substrat de verre ou de silicium, sur lesquels les canaux étaient gravés de façon mécanique ou chimique<sup>13</sup>. Ces techniques sont contraignantes car elles nécessitent du matériel coûteux qui n'est pas forcément accessible pour tous les laboratoires, et sont longues à mettre en œuvre. De plus, il faut trouver un moyen de fermer les canaux après la gravure. Cela implique un chauffage à très haute température (>600°C) ou bien l'ajout d'un "adhésif" susceptible de venir polluer les canaux. Enfin, dans le cas du silicium, l'intérieur des canaux n'est plus visible en microscopie optique, ce qui pose des problèmes pour contrôler ce qui s'y passe. Malgré tout, ces matériaux présentent l'intérêt d'être compatibles avec une grande diversité de solvants organiques.

Le verre est également utilisé sous la forme de canaux circulaires ou carrés directement assemblés les uns aux autres<sup>14-16</sup>. Dans ce cas, on s'affranchit de l'étape de fermeture des canaux, mais il est difficile d'obtenir un bon alignement des différents canaux à des échelles aussi petites, nécessaires pour obtenir des gouttes régulières. La FIGURE V.1 présente un exemple de ce type de systèmes.

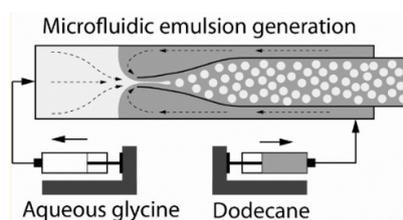


FIGURE V.1 – Exemple de formation de gouttes dans des capillaires en verre insérés l'un dans l'autre (extrait de Toldy et al.<sup>16</sup>). La formation de gouttes régulières nécessite que le canal interne soit parfaitement centré par rapport au canal externe.

### I.2.b Polymères

Les polymères sont des matériaux de choix pour la microfluidique, le plus largement utilisé étant le PDMS. George Whitesides a développé à la fin des années 1990 la technique dite de "lithographie molle" (plus couramment désignée par sa dénomination anglaise *soft-lithography*)<sup>17</sup>, en opposition à la lithographie "dure" utilisée en microélectronique et aux débuts de la microfluidique. Les différentes étapes de formation d'une puce par la méthode de *soft-lithography* sont représentées à la FIGURE V.2.

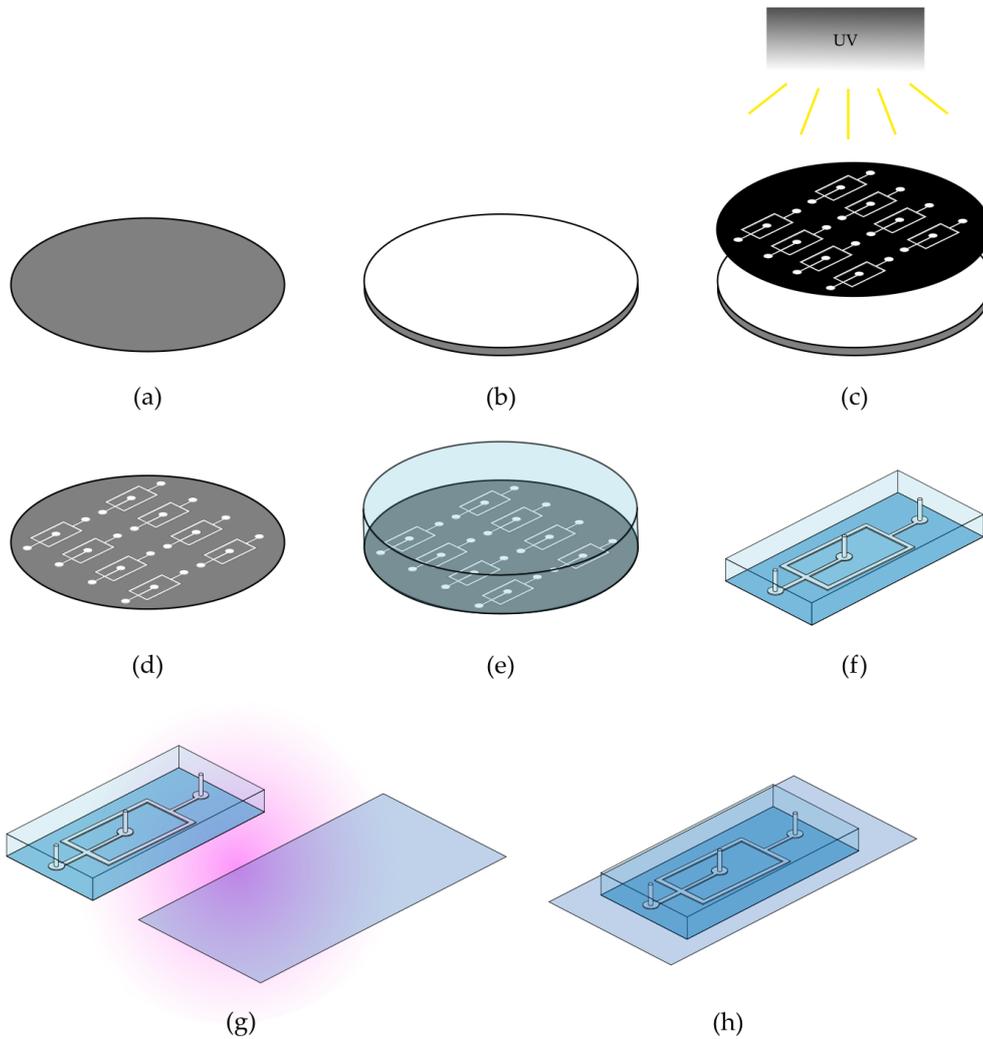


FIGURE V.2 – Schéma présentant les différentes étapes de formation d'une puce microfluidique par la technique de soft-lithography : (a) Wafer de silicium - (b) Dépôt de résine photosensible par enduction centrifuge - (c) Exposition de la résine à un rayonnement UV sous un masque, réticulation de la résine dans les parties non masquées - (d) Dissolution de la résine non réticulée pour laisser apparaître les motifs en positif (en relief) - (e) Dépôt de PDMS non réticulé et de son agent réticulant sur le moule ainsi créé - (f) Découpage et démoulage de la puce en PDMS, perçage des orifices qui permettront l'injection des liquides à l'aide d'un poinçon - (g) Exposition de la puce et de son substrat au plasma - (h) Collage de la puce sur son substrat par simple contact.

Cette technique présente plusieurs avantages, et en particulier sa simplicité de mise en place au regard des autres techniques. Un moule de la puce est d'abord créé sur un wafer de silicium : une résine photosensible est déposée en film fin par enduction centrifuge sur le wafer (FIGURE V.2(b)), réticulée sous un masque qui représente les circuits que l'on souhaite reproduire (c), puis les parties non réticulées sont dissoutes, permettant d'obtenir les canaux en positifs (c'est-à-dire en relief) (d). Le PDMS non réticulé, sous forme de liquide visqueux, est ensuite coulé dans ce moule avec son agent réticulant (e). Après réticulation, on obtient un solide souple qu'on peut démouler, avec les canaux en négatifs (c'est-à-dire en creux) mais ouverts (f). Pour les fermer, la puce en PDMS est "collée" sur un substrat de verre ou de PDMS grâce à l'action d'un plasma à oxygène (g). Les ions oxygènes générés oxydent la surface pour former en surface des groupements -OH susceptibles de créer par simple contact des ponts Si-O-Si avec le substrat, et lier de façon covalente la puce à son substrat. On peut ainsi facilement et rapidement reproduire des puces à l'identique.

L'inconvénient du PDMS est sa mauvaise résistance aux solvants : en présence de la plupart des solvants organiques, le matériau gonfle<sup>18</sup>, rendant la puce inutilisable. Avec cette technique il faut donc privilégier les huiles végétales ou minérales, ainsi que les huiles fluorées. De plus, la surface exposée au plasma est très fragile et doit absolument rester propre pour permettre le collage : il est donc critique d'être vigilant lors de la manipulation des puces en sortie de plasma et avant collage.

Pour pallier ces inconvénients, et notamment celui de la mauvaise résistance aux solvants, d'autres polymères ont été utilisés en microfluidique, comme le polyméthacrylate de méthyle<sup>19</sup> ou le polycarbonate<sup>20</sup>, ou plus récemment les copolymères cyclooléfinés<sup>21</sup>. Ces thermoplastiques sont moulés par embossage ou thermoformage, puis les canaux sont fermés avec des techniques similaires ou en utilisant des vapeurs de solvant qui vont venir dissoudre localement le matériau en surface.

### I.2.c Autres matériaux

Des matériaux plus exotiques sont parfois utilisés. En particulier, George Whitesides a pour ambition de développer les puces en papier pour réaliser des systèmes à très bas coûts accessibles en particulier aux pays en voie de développement<sup>22</sup>. Ces systèmes sont basés sur l'utilisation de papier sur lequel des motifs sont dessinés grâce à l'utilisation d'une résine photosensible. Les fluides s'y déplacent par capillarité. Ces systèmes sont très faciles à transporter car très légers, et ne nécessitent pas d'environnement particulier pour leur manipulation comme des seringues pour injecter les liquides. Malgré tous ces avantages, toutes les applications de la microfluidique ne sont pas réalisables avec ce type de systèmes : il n'est pas exemple par possible d'y former des gouttes et de les récolter.

## I.3 Génération de gouttes en microfluidique

Les premiers systèmes microfluidiques ont été conçus pour réaliser des analyses habituellement conduites à l'échelle macroscopique, le but étant simplement de diminuer les échelles afin de limiter les temps d'analyse et les volumes nécessaires pour les réaliser<sup>23</sup>. Dans cette optique, de simples écoulements parallèles au sein de canaux droits étaient utilisés. Cette approche n'est cependant pas pleinement satisfaisante. L'existence d'effets de bord, non négligeables à d'aussi

petites échelles, peut poser des problèmes liés au profil de vitesse parabolique qui régit les écoulements dans les canaux : les particules fluides au centre des canaux auront une vitesse plus importante que celles des bords, ce qui conduit à une répartition inhomogène des molécules ou des particules transportées par le liquide. En outre, le mélange entre les liquides dans le cas d'un co-écoulement parallèle est uniquement diffusif, du fait du régime d'écoulement laminaire. Le mécanisme de mélange est donc très peu efficace, ce qui a conduit au développement de géométries spécifiquement dédiées au mélange de liquides pour certaines applications<sup>24-26</sup>.

Rapidement se sont développés des systèmes alternatifs à base de bulles (cf FIGURE V.3(a)) ou de gouttes (cf FIGURE V.3(b))<sup>23,27</sup>, permettant d'avoir des compartiments liquides isolés les uns des autres, au sein desquels le mélange est plus efficace car à la diffusion s'ajoute une composante convective<sup>28</sup>. Les effets de bords sont également limités de par la petite taille des compartiments et l'impossibilité d'échange entre eux. Les systèmes basés sur l'utilisation de bulles présentent malgré tout un risque d'obstruction des canaux en cas de réaction chimique rapide au sein des compartiments liquides. Les compartiments étant en contact direct avec les parois des canaux, les réactions qui conduisent à des produits solides, très visqueux, ou sous forme de gel bouchent le canal et bloquent l'écoulement. Les gouttes, qu'on peut à l'inverse calibrer de façon à ce qu'elles ne soient pas en contact avec les parois en cas de formation de produits solides, permettent d'envisager des applications variées et leur utilisation est à la base d'une grande quantité de systèmes microfluidiques.

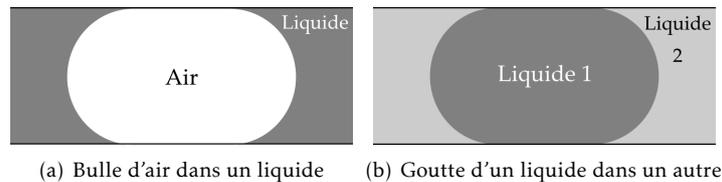


FIGURE V.3 – Deux méthodes d'obtention de compartiments isolés en microfluidique - le liquide d'intérêt apparaît en gris foncé.

La microfluidique offre la possibilité de former des gouttes avec une dispersité de tailles très faible, de 1 à 3 % en moyenne<sup>29</sup>. De nombreuses applications microfluidiques, comme par exemple le criblage de molécules susceptibles de présenter des propriétés chimiques ou biologiques intéressantes<sup>30,31</sup>, sont basées sur la génération de gouttes. Le possibilité de former des gouttes monodisperses est également un atout majeur pour les émulsions. Cela permet d'avoir un contrôle précis de la morphologie des émulsions formées, mais aussi d'envisager la formation de structures plus complexes comme des émulsions multiples<sup>32</sup>. La stabilité des gouttes est en outre accrue<sup>33</sup> car le mûrissement d'Ostwald est limité.

Un paramètre très important à prendre en compte pour la formation de gouttes en microfluidique est la mouillabilité du canal dans lequel elles sont formées. En effet, il faut que les canaux soient mouillés préférentiellement par la phase continue, de façon à ce que celle-ci forme un film de liquide dispersant isolant les gouttes des parois du canal. Si la phase dispersée a une bonne affinité pour les canaux, les gouttes risquent de se coller aux parois et d'être détruites<sup>34</sup>. Il faut donc dans certains cas envisager des traitements de surface qui seront détaillés dans la suite.

### I.3.a Différentes géométries permettant la formation de gouttes simples

La formation de gouttes une à une à l'échelle micrométrique est rendue possible par des agencements particuliers des canaux. Il existe trois principales géométries permettant de former des gouttes de façon *passive* en microfluidique, c'est-à-dire sous l'action des cisaillements induits par les écoulements<sup>29</sup> :

- Le co-écoulement (*co-flowing*);
- Les jonctions en T (*T-junctions*);
- La focalisation de flux (*flow-focusing*).

Ces différentes géométries seront décrites dans la suite. Il existe également des techniques de formation de gouttes dites *actives* faisant intervenir par exemple des gradients de tension ou de température<sup>35</sup>, que nous ne décrivons pas ici.

**Le co-écoulement** Pour former des gouttes par co-écoulement, on utilise un canal inséré dans un autre. Généralement, le liquide circulant dans le canal interne constitue la phase dispersée tandis que celui circulant dans le canal externe est la phase continue. La formation des gouttes a lieu à l'extrémité du canal interne (cf FIGURE V.4).

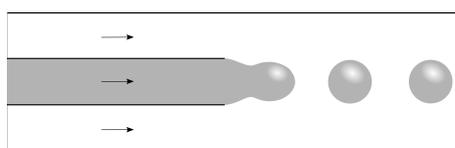


FIGURE V.4 – Formation de gouttes par co-écoulement. Le liquide dispersé est représenté en gris, le liquide dispersant en blanc.

Cette configuration nécessite le plus souvent l'utilisation de capillaires en verre imbriqués les uns dans les autres. Umbanhoar et al.<sup>14</sup> furent les premiers à développer des systèmes microfluidiques de ce type en 1999, en imbriquant un capillaire circulaire au centre d'un capillaire carré.

Deux régimes de formation des gouttelettes sont observés avec cette géométrie<sup>36</sup> :

- le *dripping* (goutte-à-goutte), où les gouttes se forment juste en sortie du capillaire interne;
- le *jetting* (écoulement en jet), où on a formation d'un jet à la sortie du capillaire interne, qui se rompt en gouttelettes à distance de l'orifice.

Le *jetting* est favorisé par une augmentation du débit de la phase interne ou de sa viscosité, ou bien encore par une diminution de la tension interfaciale entre les deux liquides qui rend la formation d'une longue colonne de liquide moins coûteuse en énergie.

**Les jonctions en T** L'équipe de Thorsen fut la première en 2001 à développer cette géométrie<sup>37</sup>. Deux canaux perpendiculaires sont utilisés, la phase continue arrivant dans un canal et la phase dispersée dans un autre. La contrainte normale appliquée par le fluide dispersant sur le fluide dispersé conduit à la formation d'une goutte à la jonction entre les deux canaux, comme on peut le voir sur la FIGURE V.5.

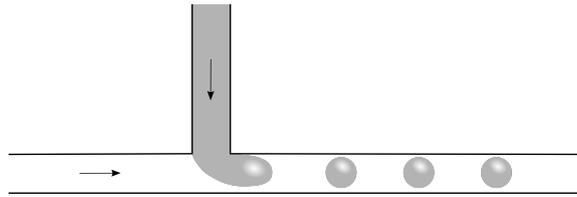
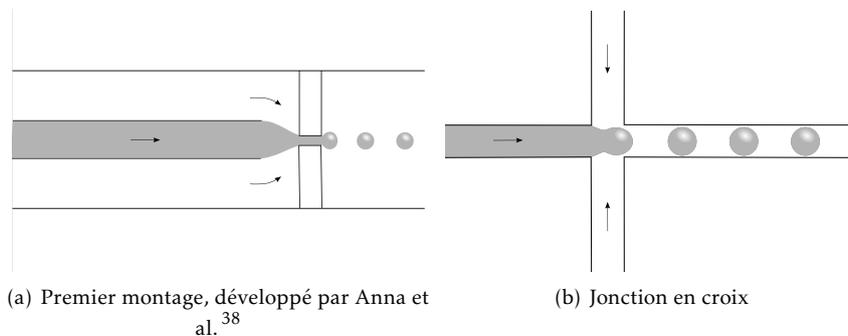


FIGURE V.5 – Formation de gouttes à une jonction T. Le liquide dispersé est représenté en gris, le liquide dispersant en blanc.

Pour être capable de former des gouttes dans cette configuration, il faut que les débits des phases continues et dispersées soient du même ordre de grandeur<sup>29</sup>. Là encore on distingue deux régimes : le régime *confiné*, dans lequel la goutte qui se forme grossit suffisamment pour emplir le canal en étant contrainte de se déformer à cause de ses parois, et le régime *non confiné* où la goutte formée a un diamètre inférieur au canal, comme c'est le cas sur la représentation de la FIGURE V.5. Plus le canal où sont formées les gouttes est grand, et plus le débit de la phase dispersé est faible, plus le régime non confiné est favorisé.

**La focalisation de flux** Plusieurs géométries différentes sont basées sur ce principe, qui consiste à former des gouttes par focalisation du flux de phase dispersée entre deux langues de phase continue. Le premier système de ce type fut développé par Anna et al.<sup>38</sup> en 2003 (voir FIGURE V.6(a)). Ce système se rapproche de la géométrie du co-écoulement, mais le liquide dispersé est dans ce cas contraint de passer par une constriction, ce qui conduit à la formation des gouttes. On retrouve aussi dans cette catégorie les systèmes les plus classiques<sup>39-41</sup>, présentant une jonction en croix qui permet de par sa symétrie de focaliser le flux (voir FIGURE V.6(b)).



(a) Premier montage, développé par Anna et al.<sup>38</sup>

(b) Jonction en croix

FIGURE V.6 – Formation de gouttes par focalisation de flux. Le liquide dispersé est représenté en gris, le liquide dispersant en blanc.

On retrouve ici les deux régimes de formation de gouttes observés en co-écoulement : le *dripping* et le *jetting*. Dans le cadre du *jetting*, les gouttes sont souvent plus grosses et moins uniformes que pour le *dripping*, car la rupture du jet en gouttelettes a lieu de façon moins régulière<sup>15</sup>.

### I.3.b Adaptation à la formation de doubles émulsions

Les trois géométries détaillées au paragraphe précédent peuvent être adaptées pour former des doubles émulsions.

La géométrie la plus simple et la plus couramment utilisée est la succession de deux jonctions en croix. Cette géométrie se prête en effet très bien à la fabrication des puces par *soft-lithography*, et a permis la génération d'émulsions doubles ou d'ordre plus élevé<sup>32,40-42</sup>.

On trouve malgré tout dans la littérature des exemples d'émulsions doubles générées en *co-flowing*<sup>43</sup> (cf FIGURE V.7(a)) ou bien en focalisation de flux, avec notamment le célèbre montage développé par l'équipe de Weitz<sup>15</sup> (cf FIGURE V.7(b)) à base de capillaires en verre imbriqués les uns dans les autres.

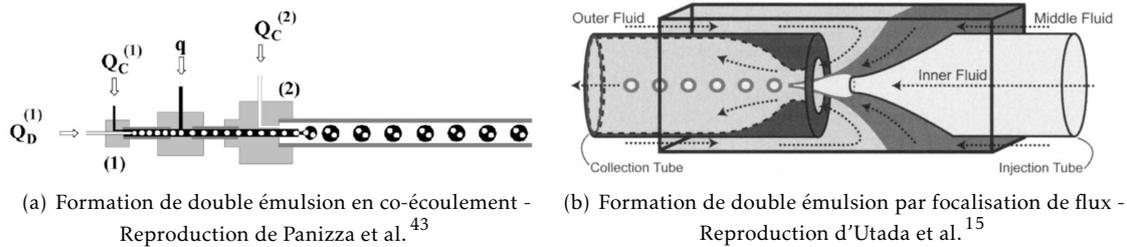


FIGURE V.7 – Montages permettant la formation d'émulsions doubles en microfluidique.

Okushima et al.<sup>44</sup> ont également développé un système à base de deux jonctions T successives gravées dans le quartz ou le pyrex. Ils comparent les émulsions obtenues en travaillant avec les deux jonctions implémentées au sein de la même puce, et celles obtenues avec deux puces distinctes mises en série. Dans le premier cas, les gouttes formées à la première jonction circulent au sein de la puce dans un canal de quelques dizaines de microns pour atteindre la seconde jonction, tandis que dans le second cas elles sont transportées au sein d'un capillaire de diamètre interne de 500  $\mu\text{m}$  qui relie la sortie de la première puce à l'entrée de la seconde puce. Ils concluent que la maîtrise de la taille des gouttes est meilleure dans le cas d'une puce unique, malgré la complexité accrue et le manque de souplesse imposés par ce choix.

Pour nos expériences, nous utiliserons des puces en PDMS fabriquées par *soft-lithography* et fermées par traitement plasma. Les gouttes seront générées à des jonctions en croix, les émulsions doubles étant formées au sein de la même puce présentant deux jonctions en croix successives.

Le paramètre qui rend complexe la formation d'émulsions multiples en microfluidique est la mouillabilité. Comme mentionné plus haut, il est nécessaire que la phase continue ait une meilleure affinité pour les canaux que la phase dispersée pour être capable de former des gouttelettes. Or, pour une émulsion multiple, on forme successivement des gouttes de liquides différents, alternativement hydrophiles et hydrophobes. Par exemple, dans le cas d'une émulsion E/H/E, des gouttes d'eau dans l'huile sont formées dans un premier temps : il faut donc être dans un canal hydrophobe. Ensuite, on forme des gouttes d'eau dans l'huile dans l'eau, et on a besoin de parois hydrophiles. Il faut donc être capable, au sein de la même puce, de concilier des canaux de mouillabilités opposées. Quand on travaille avec des capillaires en verre imbriqués les uns dans les autres, ou avec plusieurs puces en séries, chaque élément peut subir un traitement différent avant assemblage. Ce n'est en revanche plus le cas lorsque l'on travaille avec du PDMS sur une puce unique. Différentes méthodes ont donc été développées pour pouvoir obtenir ce résultat. Elles seront détaillées dans le prochain paragraphe.

### I.3.c Modification de la surface du PDMS pour concilier des mouillabilités opposées sur la même puce

**Activation des surfaces et greffage/adsorption de molécules** Le PDMS est un matériau intrinsèquement hydrophobe. Quand il est exposé à un traitement plasma, pour le "collage" de la puce, l'oxydation induit la formation de silanols de surface et rend le matériau hydrophile<sup>17</sup>. Cependant, cette hydrophilie ne dure que quelques heures. En effet, les chaînes non réticulées et les oligomères ont tendance à migrer petit à petit vers la surface, rendant au PDMS ses propriétés hydrophobes<sup>45</sup>. L'exposition au plasma est également un moyen d'activer temporairement la surface des canaux. Les groupements silanols ainsi créés sont susceptibles de se lier de façon ionique ou covalente avec une molécule neutre ou chargée positivement. Pour rendre pérenne l'hydrophilie du PDMS, ou pour améliorer son hydrophobie, on peut ainsi greffer ou adsorber sur les parois des molécules, comme des silanes, ou des polymères, hydrophiles ou hydrophobes suivant l'effet recherché, après activation des surfaces par traitement plasma. Il est aussi possible d'adsorber des tensioactifs hydrophiles à la surface du PDMS<sup>46</sup>.

Ces méthodes sont efficaces, cependant elles ne sont pas facilement transposables pour la formation d'émulsions doubles au sein d'une unique puce microfluidique, puisqu'il est difficile de réaliser un traitement local de la puce.

**Développement de techniques permettant de réaliser un traitement de surface local** Des techniques plus complexes ont été mises au point pour permettre de concilier deux mouillabilités opposées sur la même puce. Dans chaque cas, les parties hydrophiles sont obtenues par greffage ou adsorption de molécules hydrophiles après une exposition au plasma, et dans un second temps les parties non traitées de la puce sont laissées redevenir hydrophobes par migration des espèces de faible poids moléculaire au sein du PDMS.

Hu et al.<sup>47</sup> font polymériser de l'acide acrylique à la surface des canaux après adsorption d'un photoinitiateur, la benzophénone, sur les parois. La polymérisation radicalaire est déclenchée par une exposition à des rayonnements UV. Dans le cas de la formation d'une double émulsion, la polymérisation est réalisée de façon sélective dans les canaux devant être hydrophiles à l'aide d'un masque apposé lors de l'exposition aux UV. Dans le même esprit, l'équipe de Weitz<sup>32,39</sup> greffe des silanes photoinitiateurs à la surface des canaux avant de réaliser la polymérisation d'acide acrylique par activation UV, toujours en utilisant un masque.

Bauer et ses collaborateurs<sup>41</sup> proposent de réaliser une adsorption successive de polyélectrolytes cationiques et anioniques à la surface des canaux activée par exposition au plasma, en s'inspirant de la méthode *layer-by-layer* développée par Decher<sup>48</sup> à la fin des années 90. L'alternance de couches permet d'obtenir un revêtement à la fois plus durable et plus homogène. Pour permettre la formation d'émulsions doubles, l'adsorption des polymères doit être limitée aux canaux devant être hydrophiles. Les canaux à garder hydrophobes sont donc protégés par un flux d'air lors de l'injection des solutions de polyélectrolytes.

Ces techniques sont efficaces, mais sont souvent complexes à réaliser, coûteuses en temps, et nécessitent l'introduction de réactifs et de solvants au sein de la puce avant son utilisation, ce qui risque de la polluer et augmente la probabilité d'introduire des poussières pouvant la boucher.

**Coexistence des deux mouillabilités sans traitement de surface** Il est également possible de former des émulsions doubles dans une unique puce microfluidique sans utiliser de traitement de

surface.

L'utilisation de puces en trois dimensions permet d'obtenir ce résultat. Le principe est le suivant : l'émulsion primaire est formée dans des canaux très fins mouillables par la phase intermédiaire. Dans un second temps, l'émulsion double est formée à la seconde jonction dans des canaux qui s'élargissent brusquement, en largeur mais aussi en hauteur<sup>49,50</sup>. Cet élargissement en trois dimensions permet d'éviter que la goutte formée à la seconde jonction n'entre en contact avec les parois de même mouillabilité (cf FIGURE V.8(a)). La formation de ces puces est relativement complexe puisqu'elle nécessite deux étapes successives de *soft-lithography* pour former des moules présentant deux épaisseurs différentes, puis l'assemblage par plasma de deux demi-puces créées à partir de ce moule. Il faut prendre soin d'aligner parfaitement les canaux des deux moitiés de puces, ce qui est une étape délicate compte tenu de leur petite taille (cf FIGURE V.8(b)). L'alignement est souvent facilité par la présence de petits crans sur chaque demi puce, qui doivent être emboîtés.

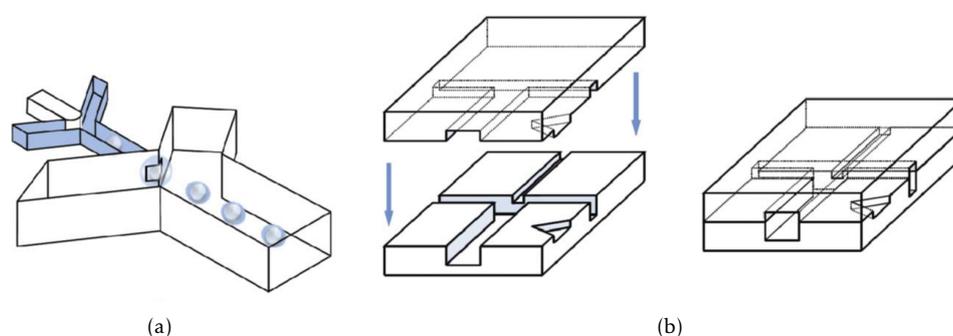


FIGURE V.8 – Formation d'une émulsion double dans une puce en trois dimensions (reproduction de Rotem et al.<sup>50</sup>) : (a) Principe de formation des gouttes dans une puce en 3D, avec élargissement du canal à la seconde jonction, (b) Assemblage des deux demi-puces pour former la puce, l'alignement étant permis par la présence de crans triangulaires sur le côté de la puce.

Plus récemment se sont développées des techniques plus simples, ne nécessitant pas d'injecter des solvants dans la puce, et se basant uniquement sur l'exposition contrôlée de la puce aux rayonnements plasma.

Kim et al.<sup>40</sup> commencent ainsi par préparer une puce de façon classique, fermée par collage plasma. La puce est laissée reposer à 65°C jusqu'à ce que les canaux retrouvent leurs propriétés hydrophobes par migration des chaînes non réticulées. La puce fermée est alors à nouveau exposée au plasma. Les ions oxygènes pénètrent dans les canaux par les orifices percés pour l'injection des liquides, et oxydent leur surface. Les ouvertures proches des canaux devant rester hydrophobes sont fermées par du ruban adhésif pour éviter que les ions ne pénètrent *via* ces entrées. Cette technique très simple et propre nécessite malgré tout selon les auteurs d'optimiser la géométrie de façon à obtenir l'oxydation sélective des canaux que l'on souhaite hydrophiles, en utilisant des zigzags ou des rétrécissements pour éviter que les ions oxygènes ne diffusent dans les mauvais canaux.

Li et al.<sup>42</sup> protègent les canaux à conserver hydrophobes par un dépôt de colle réalisé préalablement à l'exposition au plasma. La colle agit comme une barrière empêchant les ions générés par le plasma de venir oxyder la surface. Après le plasma, la colle est retirée et la puce est fermée

par collage classique. Cette technique a l'avantage d'être simple et rapide, mais le retrait de la colle sèche après le plasma et avant collage présente le risque de dégrader la surface activée, et de conduire ensuite à un collage défectueux.

Ces deux dernières techniques sont plus simples et plus rapides à mettre en œuvre que les précédentes. En revanche, les puces réalisées ainsi ne peuvent être utilisées que quelques heures, avant que les effets du plasma ne s'estompent.

Dans la lignée de ces deux techniques, nous avons choisi de développer une nouvelle méthode pour oxyder de façon sélective la surface du PDMS, basée sur l'utilisation d'un marqueur permanent pour protéger les surfaces lors de l'exposition au plasma. Cette technique sera présentée de façon détaillée au paragraphe suivant.

## II Mise au point d'une technique permettant la formation de gouttes multiples au sein de la même puce microfluidique

Nous avons mis au point une technique permettant de protéger sélectivement certains canaux de la puce lors de leur exposition aux ions oxygènes générés par le plasma. Cette technique permet d'éviter d'injecter différentes substances dans la puce, elle est également très simple d'utilisation et rapide. Elle conduit à des puces utilisables durant quelques heures. Avant l'exposition au plasma, les canaux que l'on souhaite garder hydrophobes sont recouverts de marqueur permanent. La seule condition à remplir pour ce marqueur est sa capacité à recouvrir le PDMS d'une fine couche d'encre **homogène**. Le PDMS utilisé en regard pour fermer la puce est marqué de la même façon. Lors de l'exposition au plasma, le marqueur agit comme une barrière qui empêche les ions d'atteindre la surface de PDMS et donc de l'oxyder. A l'issue du traitement plasma, la puce est directement collée sur le substrat par simple contact, en prenant soin d'aligner les traits de marqueur. L'encre est rincée après collage, ce qui permet d'éviter de manipuler les surfaces fragiles ayant été oxydées.

Dans cette partie, nous montrerons d'abord que l'encre permet de conserver localement les propriétés hydrophobes intrinsèques du PDMS, et dans un second temps nous illustrerons avec un système modèle la possibilité de former des émulsions doubles E/H/E au sein de puces traitées par cette technique.

### II.1 Mode opératoire

Les étapes de fabrication des moules et de fermeture des puces sont toujours réalisées en salle blanche sous une hotte à flux laminaire.

**Fabrication des moules** Sur un wafer de silicium est déposée par enduction centrifuge une fine couche d'une résine polymère photosensible appelée SU-8. L'épaisseur de résine déposée correspondra à l'épaisseur des canaux des puces microfluidiques formées par la suite à partir de ces moules : la viscosité de la résine utilisée (différentes résines disponibles) ainsi que la vitesse de rotation lors du dépôt sont donc adaptées en fonction de l'épaisseur visée. Le wafer de silicium recouvert de SU-8 est ensuite exposé à un rayonnement UV permettant de réticuler les chaînes polymères constituant la résine. Pour obtenir les géométries souhaitées, cette réticulation s'effectue sous un masque, laissant passer le rayonnement uniquement à l'emplacement des futurs canaux.

Ensuite, la résine qui n'a pas été réticulée est dissoute, pour obtenir un wafer sur lequel les canaux en résine apparaissent en positif (en relief). Ces différentes étapes sont schématisées sur la FIGURE V.2 en page 175.

**Fabrication des puces** Deux grands types de PDMS sont utilisés pour la microfluidique : le PDMS Sylgard® 184, et le PDMS Momentive™ RTV 615. Le premier offre une plus grande pureté et une meilleure reproductibilité entre les différents lots. Le deuxième permet d'obtenir généralement de meilleurs collages PDMS/PDMS. Nous avons travaillé principalement avec le second type.

Dix équivalents massiques de PDMS, sous forme de liquide visqueux, sont tout d'abord mélangés avec un équivalent d'agent réticulant. Le mélange est versé sur le moule avec une épaisseur de 5 à 7 mm. Les bulles formées lors du mélange, qui risquent de venir se coincer dans les canaux micrométriques, sont éliminées sous vide. De fins substrats de PDMS (environ 2 mm d'épaisseur) sont également réalisés en coulant le même mélange dans des boîtes de Pétri. Le PDMS est ensuite laissé réticuler pendant une nuit dans une étuve à 65°C.

Après réticulation, le PDMS devient un solide souple que l'on peut démouler. Le PDMS coulé sur le wafer présente cette fois les canaux imprimés en négatif (c'est-à-dire en creux).

**Fermeture des puces** Une fois démoulées, les puces sont rincées à l'isopropanol afin d'éliminer toute trace de poussières qui pourraient boucher les canaux de la puce fermée. Des orifices sont percés pour pouvoir injecter les liquides lors de l'utilisation de la puce. Il faut ensuite fermer la puce : elle est collée pour cela sur un substrat de PDMS par exposition à un rayonnement plasma.

Nous travaillons avec un plasma Femto Sciences Cute. Le plasma est généré à une puissance de 50 W, et une fréquence de 50 kHz, avec un débit en oxygène de 30 sccm (*Standard Cubic Centimeter per Minute*). La puce et son substrat y sont exposés durant 1 min. À l'issue de l'exposition, la puce est délicatement déposée sur le substrat de PDMS, ce qui conduit immédiatement à la création de liaisons covalentes Si-O-Si. Pour parfaire le collage, la puce ainsi fermée est chauffée à 70°C pendant 3 min.

Si on souhaite préserver une partie des canaux de l'oxydation, le substrat de PDMS est tout d'abord placé sur la puce pour marquer par transparence les futures zones hydrophobes. Durant cette étape, la puce est protégée par un morceau de ruban adhésif afin d'éviter l'introduction de poussière dans les canaux. Ensuite, le ruban adhésif est retiré et les canaux que l'on souhaite conserver hydrophobes sont recouvert d'encre par le marqueur. Pour la quasi-totalité de nos expériences, un marqueur permanent rouge de la marque Simbalion® a été utilisé. La puce et son substrat sont exposés au plasma, puis collés ensemble en prenant soin d'aligner les traits de marqueur. Ce dernier n'est rincé qu'après le collage, en injectant de l'éthanol dans les canaux. Ces différentes étapes sont schématisées sur la FIGURE V.9.

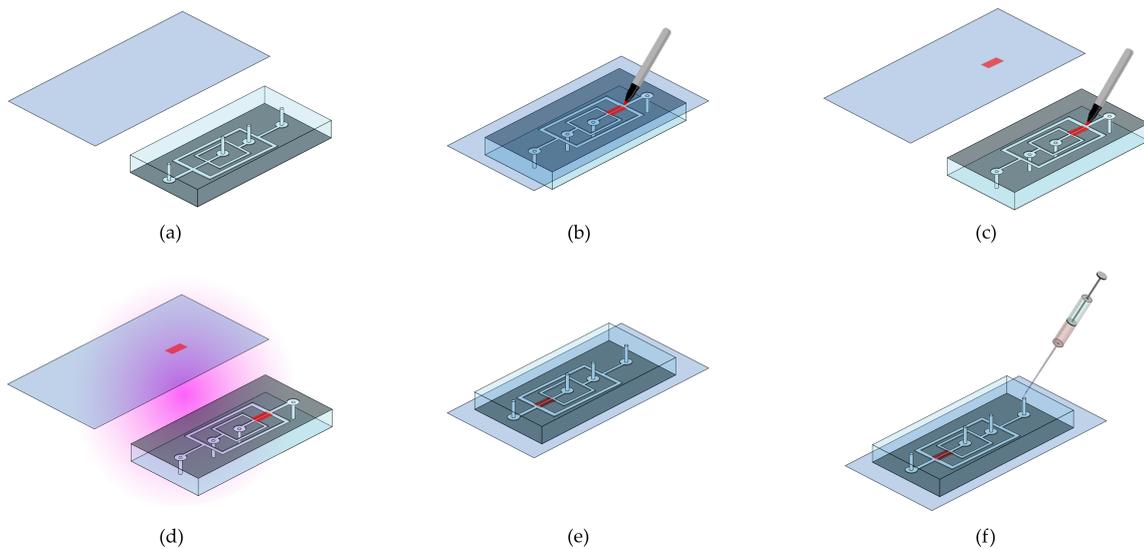


FIGURE V.9 – Présentation des différentes étapes permettant de concilier deux mouillabilités opposées sur la même puce en PDMS grâce à un marqueur permanent : (a) Découpage et démoulage d'une puce en PDMS et d'un morceau de PDMS utilisé comme substrat, perçage des orifices permettant l'injection des liquides - (b) La puce est protégée par un morceau de ruban adhésif. Le substrat PDMS est déposé sur la puce ainsi protégée et les canaux à maintenir hydrophobes sont repassés au marqueur sur le substrat par transparence - (c) Le ruban adhésif protecteur est retiré et les canaux devant rester hydrophobes sont repassés au marqueur directement sur la puce - (d) La puce et son substrat sont exposés au plasma durant 1 min - (e) Collage de la puce sur son substrat par simple contact, en prenant soin d'aligner les traits de marqueur - (f) Rinçage du marqueur **après** collage de la puce par injection d'éthanol.

## II.2 Caractérisation des surfaces protégées par le marqueur

### II.2.a Mesures d'angles de contact

Pour confirmer que le marqueur constitue une barrière efficace aux ions oxygènes et permet de conserver une surface hydrophile, nous avons réalisé des mesures d'angles de contact PDMS/eau/air sur du PDMS recouvert de marqueur, puis exposé au plasma pendant une durée variant entre 30 s et 30 min et enfin rincé à l'éthanol et séché par un souffle d'azote. Ces angles de contact ont été comparés à ceux obtenus pour une surface de PDMS non protégée. Le mode opératoire est présenté à la FIGURE V.10. Ces mesures ont été réalisées en déposant des gouttes d'eau de 10  $\mu$ L à la surface du PDMS, prises en photo à l'aide d'une caméra. Les valeurs des angles de contact ont été déterminées grâce à l'extension *Drop Analysis* du logiciel ImageJ.



FIGURE V.10 – Schéma présentant le protocole suivi pour les mesures d'angles de contact PDMS/eau/air.  $x$  représente le nombre de minutes durant lesquelles le PDMS est exposé au plasma.

Les résultats obtenus sont présentés sur la FIGURE V.11. L'angle de contact PDMS/eau/air à la surface du PDMS protégé par l'encre du marqueur lors du traitement plasma est supérieur à 100°, ce quel que soit le temps d'exposition au plasma. Ceci démontre que la surface a conservé ses

propriétés hydrophobes. L'angle de contact sur le PDMS non protégé, inférieur à 30°, confirme que le plasma hydrophilise la surface. On peut remarquer que l'angle de contact PDMS/eau/air augmente avec la durée d'exposition au plasma pour le PDMS non protégé : cela est dû à une dégradation de la surface pour des expositions longues, avec apparition de fissures à la surface du PDMS<sup>51</sup>.

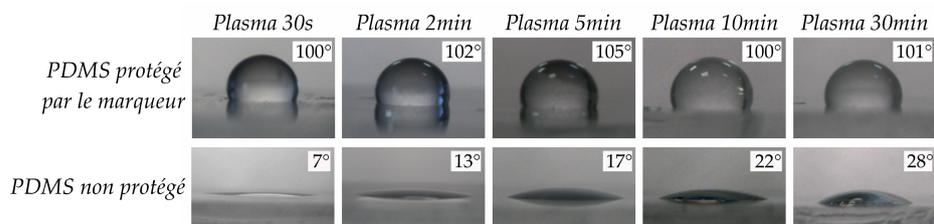


FIGURE V.11 – Angles de contact PDMS/eau/air obtenus pour du PDMS exposé au plasma pendant différentes durées : en haut, pour du PDMS protégé par un marqueur pendant le traitement plasma - en bas, pour du PDMS non protégé

## II.2.b Utilisation d'un marquage fluorescent

Pour vérifier que notre technique permet d'obtenir de façon sélective des mouillabilités différentes au sein d'une même puce, nous avons mis en évidence les parties hydrophiles de la puce grâce à un fluorophore qui s'adsorbe exclusivement sur les surfaces activées du PDMS. Nous avons utilisé des chaînes polylysines (PLL) de 20 000 g/mol greffées de polyéthylènes glycols (PEG), et marquées par un fluorophore, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Ce polycation, du fait de ses charges positives, interagit électrostatiquement avec les surfaces exposées au plasma qui sont chargées négativement. Après traitement plasma et rinçage du marqueur, une solution aqueuse de polymère marqué est injectée dans la puce et laissée incuber 8 min. La puce est ensuite séchée par injection d'air.

Les propriétés hydrophiles ou hydrophobes des surfaces sont ensuite vérifiées par observation en microscopie confocale, en excitant le FITC à l'aide d'un LASER multi-argon à 488 nm et en récoltant la lumière émise entre 500 et 600 nm. On constate que les canaux masqués par du marqueur lors du traitement plasma ne présentent aucune fluorescence tandis que ceux qui n'ont pas été protégés fluorescent en surface, comme on peut le voir sur la FIGURE V.12, indiquant qu'ils sont hydrophiles. Une petite zone de fluorescence apparaît cependant dans la zone ayant été protégée par le marqueur. Celle-ci étant très proche de la limite du trait de marqueur, on peut supposer que le recouvrement n'y est pas parfait. Dans la suite, ces éventuelles imperfections à la limite entre les deux types de mouillabilités n'ont pas posé de problèmes pour la formation des gouttes.

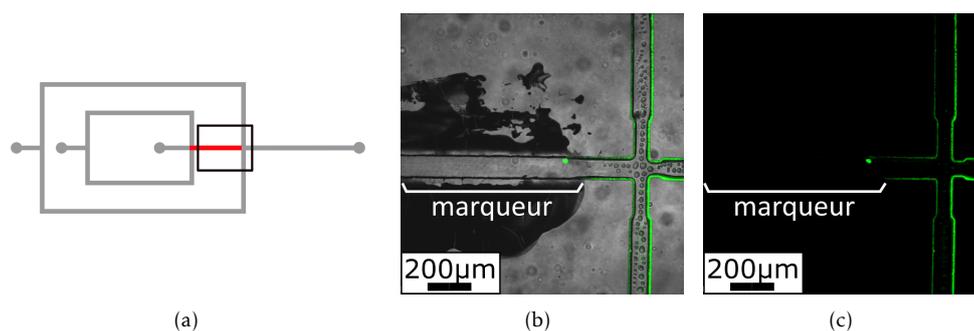


FIGURE V.12 – Mise en évidence de l'adsorption sélective de PLL-g-PEG/FITC sur les canaux hydrophiles, non protégés par l'encre d'un marqueur durant le traitement plasma. (a) Géométrie des puces utilisées. En rouge, le canal protégé par l'encre du marqueur lors du traitement plasma. Le rectangle noir représente la zone où ont été prises les images (b) et (c). (b) Image à la seconde jonction en lumière directe + fluorescence. (c) Fluorescence uniquement.

### II.2.c Conclusion

Ces deux expériences nous ont permis de montrer que l'encre d'un marqueur permanent permet de protéger efficacement la surface du PDMS des ions oxygènes générés par le plasma, et ainsi de conserver ses propriétés hydrophobes. Nous avons également montré qu'il était possible de réaliser cette protection sélectivement de façon à obtenir des puces combinant deux mouillabilités opposées.

### II.3 Formation de doubles émulsions E/H/E avec des tensioactifs modèles

Nous avons utilisé la technique présentée plus haut pour fonctionnaliser des puces en PDMS et y former des doubles émulsions stabilisées par des tensioactifs modèles, le Tween<sup>®</sup> 20 et le Span<sup>®</sup> 80. Le premier est un tensioactif hydrophile, tandis que le second est hydrophobe. De la même façon que pour les techniques classiques de formulation des émulsions en deux étapes par voie mécanique s'appuyant sur la règle de Bancroft<sup>52</sup>, nous avons stabilisé les gouttes d'eau formées à la première jonction par le Span<sup>®</sup> 80 dilué en phase huile, et les gouttes d'huile formées à la seconde jonction par le Tween<sup>®</sup> 20 dilué en phase aqueuse externe.

La géométrie de la puce utilisée est représentée FIGURE V.13. Les canaux mesurent 50 μm de haut et 100 μm de large. Le canal entre les deux jonctions est protégé par l'encre d'un marqueur pendant le traitement plasma pour conserver ses propriétés hydrophobes et permettre la formation de gouttes d'eau dans l'huile à la première jonction, et d'huile dans l'eau à la seconde.

Les liquides sont injectés dans la puce par des seringues, à débits contrôlés par l'interface neMESYS développée par CETONI. La phase aqueuse interne est composée d'eau distillée, la phase huile de myristate d'isopropyle à 3,5 % en masse de Span<sup>®</sup> 80, et la phase aqueuse externe d'une solution aqueuse à 0,7 % en masse de Tween<sup>®</sup> 20. Les débits sont de l'ordre de 1 μL/min pour la phase aqueuse interne, de 5 à 10 μL/min pour la phase huile et de 15 à 25 μL/min pour la phase aqueuse externe.

Avec ce dispositif, nous avons pu former une émulsion double monodisperse avec une déviation standard de 1,2% pour les diamètres des gouttes d'eau internes et de 1,7% pour les globules d'huile (calculée sur 28 gouttes) (cf FIGURE V.14).

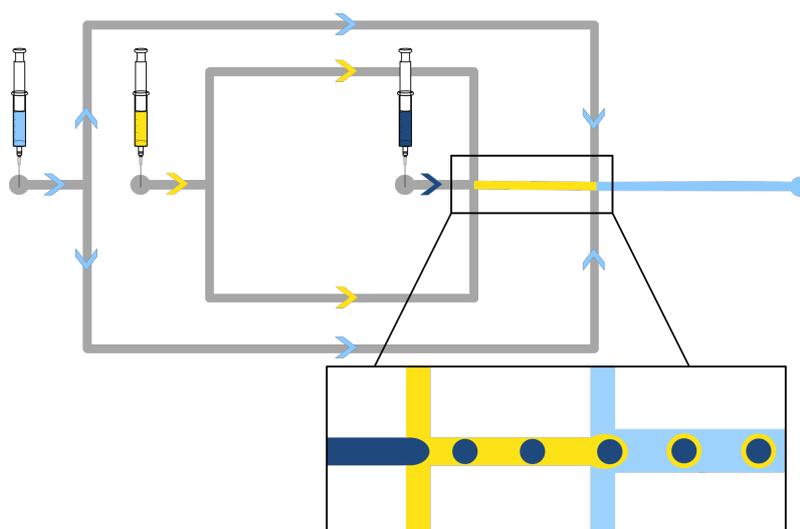


FIGURE V.13 – Géométrie des puces utilisées pour la formation de nos émulsions doubles stabilisées par des tensioactifs modèles. La phase aqueuse interne est représentée en bleu foncée, l'huile en jaune et la phase aqueuse externe en bleu clair.

La variation des débits d'eau interne et d'huile permet également d'ajuster la taille des gouttes formées, comme illustré à la FIGURE V.15. Ainsi, à débits de phase aqueuse externe et d'huile fixés, les gouttes internes auront un diamètre d'autant plus grand que le débit d'eau interne sera élevé. A l'inverse, à débits de phases aqueuses interne et externe fixés, le diamètre des gouttes interne sera d'autant plus petit que le débit d'huile sera élevé. Cette évolution est en adéquation avec ce qui est observé dans la littérature<sup>42,53</sup>.

L'encre du marqueur constitue une barrière aux ions oxygènes générés par le plasma. Il n'y a donc pas *a priori* de formation de ponts Si-O-Si à ce niveau là, donc pas de collage. Nous avons vérifié que le trait de marqueur, bien qu'il soit plus large que le canal protégé, n'engendrait pas de décollement gênant pour la formation des émulsions. Pour cela, nous avons utilisé un canal droit de 100  $\mu\text{m}$  de large, protégé lors du traitement plasma par l'encre d'un marqueur et bouché à une extrémité. De l'eau est injectée dans celui-ci à pression croissante. Un fin film d'eau peut s'infiltrer au niveau du marqueur (visible sous microscope), mais nous n'avons pas constaté de décollement complet de la puce, ce jusqu'à 2 bars, ce qui correspond à un débit de 600  $\mu\text{L}/\text{min}$  bien supérieur aux débits utilisés pour la formation de nos émulsions. De plus, nous n'avons jamais été gênés par ce phénomène lors de la formation des émulsions.

## II.4 Conclusions

Cette technique basée sur l'utilisation de l'encre d'un marqueur permanent pour protéger les canaux lors du traitement plasma permet d'obtenir simplement des puces combinant de façon contrôlée des canaux hydrophiles et hydrophobes. Des émulsions doubles stabilisées par un système de tensioactifs modèles ont pu être formées dans ces puces.

Dans la suite, nous allons nous intéresser à la formation par voie microfluidique d'émulsions stabilisées par notre copolymère, d'abord simples, puis multiples E/H/E.

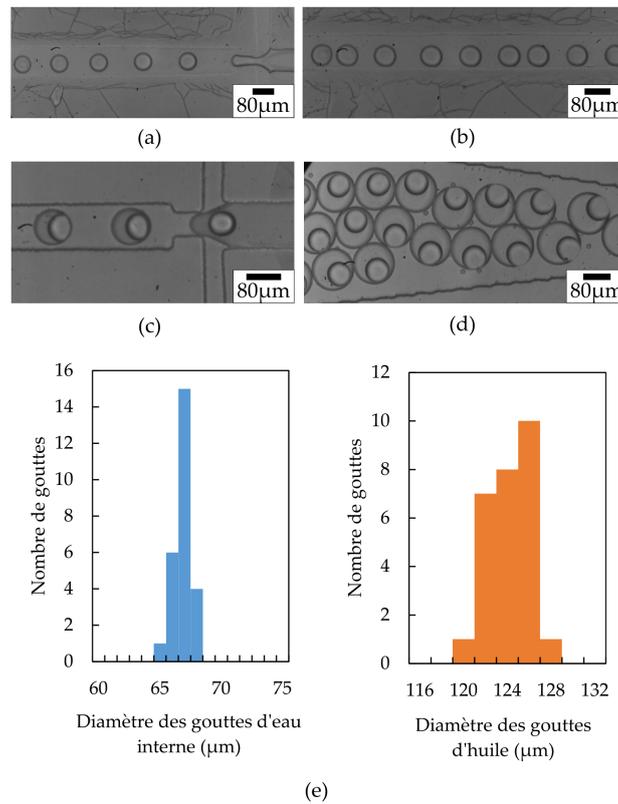


FIGURE V.14 – Émulsion E/H/E stabilisée par le Span<sup>®</sup> 80 (interface E/H) et le Tween<sup>®</sup> 20 (interface H/E), formée dans les puces utilisant la technique du marqueur : (a) Formation de l'émulsion inverse E/H à la première jonction - (b) Pas de mouillage par les gouttelettes d'eau des canaux protégés par le marqueur - (c) Formation de gouttes E/H/E à la seconde jonction - (d) Gouttes E/H/E dans la chambre de sortie - (e) Distribution de taille des gouttelettes d'eau internes (à gauche, en bleu), et des globules d'huile (à droite, en orange).

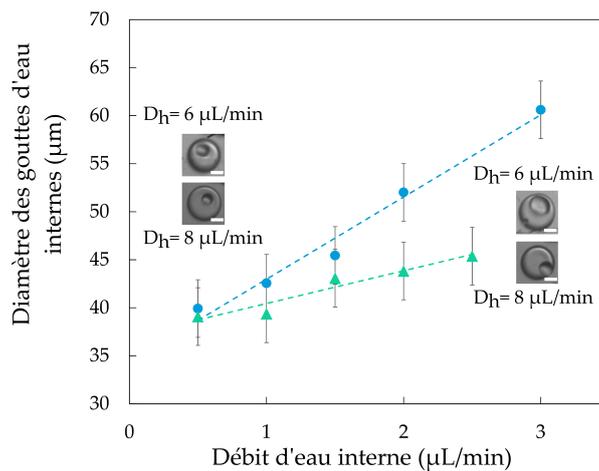


FIGURE V.15 – Évolution des diamètres des gouttes d'eau interne en fonction du débit d'eau interne : ● pour un débit d'huile de  $6 \mu\text{L}/\text{min}$ , ▲ pour un débit d'huile de  $8 \mu\text{L}/\text{min}$ . Les images en insert représentent les gouttes obtenues pour chaque débit d'huile  $D_h$  pour les débits d'eau interne étudiés les plus bas et les plus élevés. Les barres d'échelle représentent  $40 \mu\text{m}$ .

### III Formation d'émulsions stabilisées par des copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA par voie microfluidique

#### III.1 Formation d'émulsions simples

La microfluidique, contrairement à l'émulsification par voie mécanique, permet de forcer la formation d'un type d'émulsion donné, qui peut être différent de celui obtenu à l'Ultra-Turrax®. Nous avons donc exploré la formation d'émulsions simples (directes et inverses), dans plusieurs conditions de pH et de concentrations en chlorure de sodium, représentatives des trois types d'émulsions obtenus à l'Ultra-Turrax®.

Pour ces expériences, nous avons travaillé avec deux types de puces dont la géométrie est présentée FIGURE V.16 :

- Pour former les émulsions directes, nous utilisons directement après leur exposition au plasma des puces en PDMS hydrophiles collées sur un substrat de PDMS (cf FIGURE V.16(a));
- Pour former les émulsions inverses, nous utilisons des puces en PDMS collées par exposition au plasma sur un substrat de PDMS, et conservées à 65°C pendant plus de 48 h pour leur permettre de retrouver leurs propriétés hydrophobes (cf FIGURE V.16(b)).

Les canaux font 50 µm de haut et 50 µm de large, jusqu'à la chambre de sortie où le canal s'élargit brutalement à 500 µm.

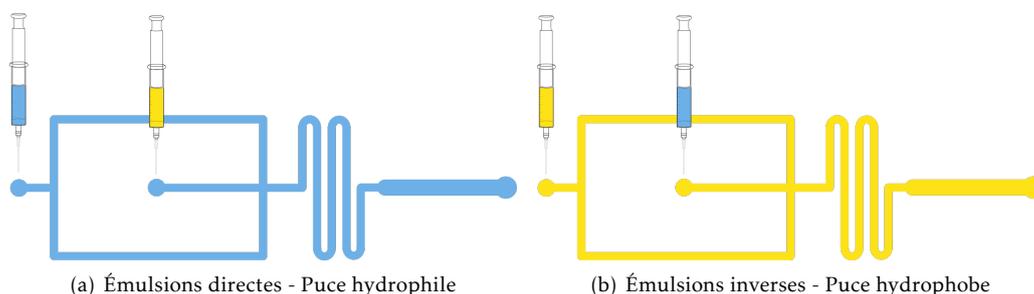


FIGURE V.16 – État de surface et géométries des puces utilisées pour la formation d'émulsions simples.

Pour toutes les expériences microfluidiques, nous avons travaillé avec le myristate d'isopropyle. C'est en effet la moins visqueuse des huiles que nous avons étudiées (5 mPa.s contre 30 pour le Miglyol® 812 à température ambiante), ce qui permet d'obtenir de meilleurs résultats pour la formation d'émulsions directes puisque la formation de gouttes est favorisée par un rapport  $\frac{\text{viscosité phase continue}}{\text{viscosité phase dispersée}}$  élevé<sup>54</sup>.

Dans un pilulier, 2 mL de phase aqueuse sont mis au contact durant 24h avec 2 mL de myristate d'isopropyle, contenant 5 mg/mL de PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub>, dans un souci d'avoir le protocole de préparation le plus proche possible de celui utilisé pour former les émulsions à l'Ultra-Turrax®. Les phases sont ensuite prélevées chacune séparément à la seringue, puis utilisées pour former des émulsions. Les liquides sont injectés dans la puce par des pousse-seringues dont les débits sont contrôlés par l'interface nMESYS développée par CETONI.

Cinq échantillons, présentés dans le TABLEAU V.1, sont étudiés. Pour chacun d'entre eux, la formation des deux types d'émulsions simples est considérée. On rappelle que le pH initial est le

pH de préparation de la phase aqueuse, et  $\text{pH}_{24h}$  le pH après les 24 h de mise au contact des deux phases. Ce pH peut être différent du pH d'équilibre, pH définitif remesuré dans la phase aqueuse sous-nageante après formation de l'émulsion (cf Chapitre III page 78).

Nom de l'échantillon	$\text{pH}_{initial}$	$\text{pH}_{24h}$	[NaCl] (M)	Type d'émulsion obtenu à l'Ultra-Turrax®
S1-0	1	1	0	Directe instable (stabilité : quelques jours)
S3-0,15	3	3	0,15	Multiple E/H/E
S3-0,6	3	8	0,6	Multiple E/H/E
S6-1	6	8	1	Multiple E/H/E
S12-2	12	12	2	Inverse instable (stabilité : quelques minutes)

TABLEAU V.1 – Échantillons étudiés pour la formation en microfluidique d'émulsions directes et inverses stabilisées par le copolymère PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub>.

### III.1.a Émulsions directes

Deux régimes sont observés dans les puces lors de la génération de gouttes huile dans eau stabilisées par notre polymère : le *dripping* (goutte-à-goutte), où les gouttes sont formées à la jonction, et le *jetting*, où l'huile forme un jet qui se rompt en gouttelettes en aval de la jonction.

Le régime de "goutte-à-goutte" est obtenu sans difficulté pour les échantillons à bas pH (S1-0 et S3-0,15, dont les phases aqueuses sont respectivement à pH 1 et pH 3), et ce dans une large gamme de débits (cf FIGURE V.17(a)). En revanche, pour les échantillons à pH plus élevés, autour de 8, la formation d'un jet est observée lorsque le rapport  $\frac{\text{débit huile}}{\text{débit eau}}$  est trop élevé, comme on peut le voir à la FIGURE V.17(b). Ce régime conduit souvent à des gouttes moins monodisperses<sup>15</sup>, il est donc préférable dans la mesure du possible de générer des gouttes en *dripping*. Ce régime a pu être obtenu en diminuant le débit de la phase huile (cf FIGURE V.17(c)).

L'échantillon à pH 12 (S12-2) n'a quant à lui pas permis de former d'émulsion directe, même pour des rapports  $\frac{\text{débit huile}}{\text{débit eau}}$  très faibles (cf FIGURE V.18). Cela est cohérent avec la formation spontanée d'émulsions inverses lors de l'émulsification à l'Ultra-Turrax® et avec la conformation plutôt étendue vers l'huile du copolymère dans ces conditions.

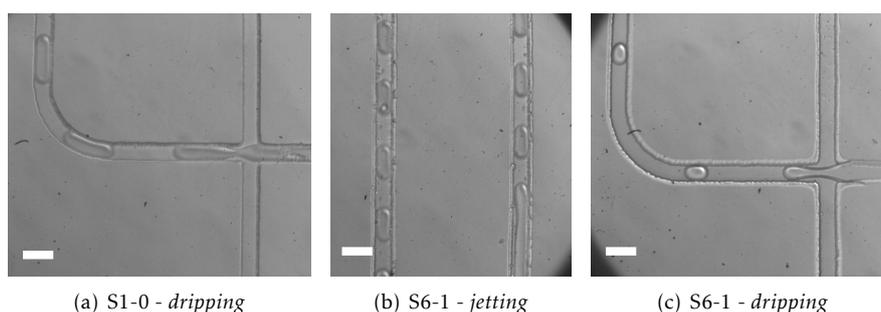


FIGURE V.17 – Formation de gouttes d'huile dans l'eau,  $D_{eau}=10 \mu\text{L}/\text{min}$ , (a) à bas pH (ici échantillon S1-0), en régime "goutte-à-goutte", pour  $D_{huile}=7 \mu\text{L}/\text{min}$  - (b) à pH 8 (ici échantillon S6-1), en mode jet, loin de la jonction, pour  $D_{huile}=7 \mu\text{L}/\text{min}$  - (c) à pH 8, retour en régime de "goutte-à-goutte", pour  $D_{huile}=1 \mu\text{L}/\text{min}$ . Les barres d'échelle représentent  $100 \mu\text{m}$ .

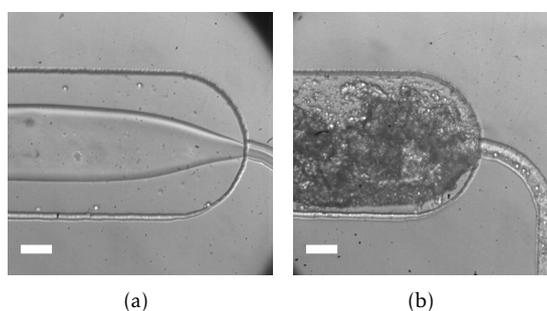


FIGURE V.18 – Échantillon S12-2, pas de formation de gouttes : (a)  $D_{eau}=10 \mu\text{L}/\text{min}$  -  $D_{huile}=7 \mu\text{L}/\text{min}$  : régime de "jet" qui se poursuit jusque dans la chambre de sortie des gouttelettes, sans jamais se rompre - (b)  $D_{eau}=10 \mu\text{L}/\text{min}$  -  $D_{huile}=0,03 \mu\text{L}/\text{min}$  : même à très bas rapport  $\frac{\text{débit huile}}{\text{débit eau}}$ , on ne forme pas de gouttes mais simplement un mélange erratique d'eau et d'huile. Les barres d'échelle représentent  $100 \mu\text{m}$ .

**Émulsions obtenues et stabilité** Pour chaque échantillon, hormis S12-2, nous avons récolté les émulsions formées dans les puces et étudié leur vieillissement. Pour cela, il suffit de relier la sortie de la puce à un pilulier *via* un capillaire. Les résultats sont présentés dans le TABLEAU V.2. L'émulsion issue de S1-0 est complètement déstabilisée en une semaine. En revanche, les émulsions issues de S3-0,15; S3-0,6 et S6-1 ne présentent pas d'évolution sur deux mois. L'émulsion formée à partir de S6-1 est très polydisperse, probablement parce qu'il est difficile d'éviter le *jetting* avec cet échantillon, ce qui conduit à des gouttes de tailles moins maîtrisées et à la production de petites gouttes satellites.

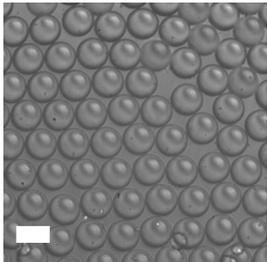
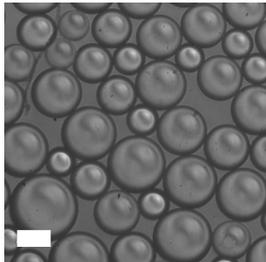
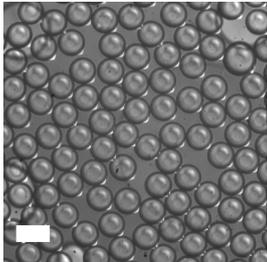
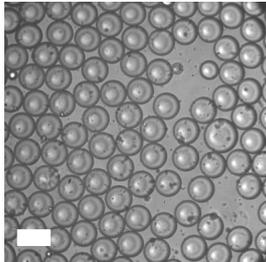
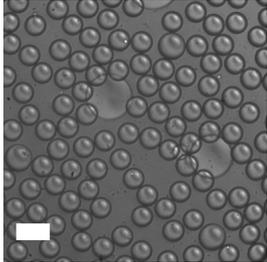
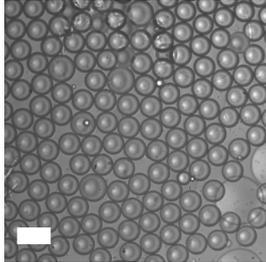
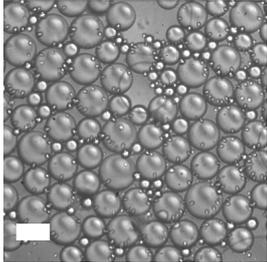
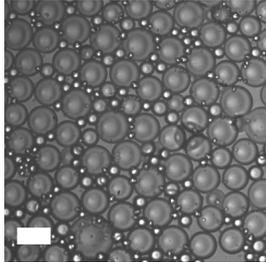
Échantillon	Émulsion juste après formation	Émulsion vieillie	Durée de stabilité
S1-0		 24h	< 4 jours
S3-0,15		 2 mois	> 2 mois
S3-0,6		 2 mois	> 2 mois
S6-1		 2 mois	> 2 mois

TABLEAU V.2 – Évolution des émulsions directes formées en microfluidique. Les barres d'échelle représentent 100  $\mu\text{m}$ .

### III.1.b Émulsions inverses

Nous avons réussi à former des émulsions inverses en puce pour tous les échantillons, malgré le fait qu'aucune émulsion inverse stable ne soit obtenue de façon spontanée à l'Ultra-Turrax<sup>®</sup> avec ce copolymère (cf Chapitre III). Toutes les gouttes sont formées en régime de *dripping*. Ce régime est ici favorisé par la plus grande viscosité de la phase huile continue qui implique une contrainte plus importante sur le flux de phase dispersé que lorsque les rapports de viscosité sont inversés.

**Émulsions obtenues et stabilité** Nous avons récolté pour chaque échantillon les émulsions E/H formées dans les puces et étudié leur vieillissement. Elles sont présentées dans le TABLEAU V.3. L'émulsion issue de l'échantillon S1-0 est déstabilisée en quelques jours. De façon surprenante, la formation spontanée d'une émulsion double H/E/H est observée au bout de 24 h en pilulier, avant le déphasage de l'émulsion (cf photo à 24 h à la première ligne du TABLEAU V.3). Cela peut s'expliquer par le pH très bas favorisant la formation d'interfaces tournées vers l'huile. Le transport d'huile est probablement rendu possible par la présence de micelles de polymère dans les gouttes d'eau (cf Chapitre III, paragraphe I.2.b page 92).

Les émulsions sont relativement difficiles à observer et on constate une déstabilisation rapide lorsqu'elles sont déposées sur la lame d'observation du microscope. En particulier, de nombreuses gouttes non sphériques sont observées, ce qui est probablement dû au mouillage de celles-ci sur la lame de verre hydrophile.

Les émulsions S3-0,15 ; S3-0,6 et S6-1 commencent à démixer en quelques jours (et sont donc à partir de là considérées comme déstabilisées, comme précisé au début du Chapitre III). En revanche, une petite phase d'émulsion inverse subsiste à l'interface entre les deux phases, c'est cette phase qui est observée et présentée sur le TABLEAU V.3. Cette phase est observable pendant 21 jours pour l'échantillon S6-1 et plus d'un mois pour les échantillons S3-0,15 et S3-0,6.

### III.1.c Conclusions

Il est intéressant de voir comment se comporte notre système lorsqu'on impose la formation d'un type d'émulsion qui n'est pas celui spontanément obtenu à l'Ultra-Turrax<sup>®</sup>. Hormis à pH 12 et 2 M en NaCl où la formation de directe n'a pas pu être observée, il a toujours été possible de former les deux types d'émulsions, directe et inverse, quels que soient le pH et la concentration en sel de la phase aqueuse. On note malgré tout que les émulsions à pH 1 sont instables, de même que celles formées à l'Ultra-Turrax<sup>®</sup>. Les émulsions directes obtenues pour les échantillons S3-0,15 ; S3-0,6 et S6-1 sont stables sur plus de deux mois, tandis qu'une phase émulsion subsiste pendant plus d'un mois dans le cas des émulsions inverses.

Cela semble cohérent avec la capacité du polymère à stabiliser les deux types d'interface par voie mécanique dans ces conditions physico-chimiques. En revanche, les interfaces tournées vers l'eau semblent moins stables puisqu'une démixtion partielle des émulsions inverses est rapidement observée. Ceci laisse penser que la présence de l'interface tournée vers l'huile joue un rôle dans la bonne stabilité de l'interface opposée, tournée vers l'eau, dans nos émulsions doubles.

III. FORMATION D'ÉMULSIONS STABILISÉES PAR DES COPOLYMÈRES PDMS-*B*-PDMAEMA PAR VOIE MICROFLUIDIQUE

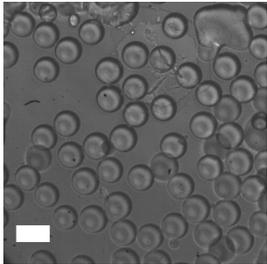
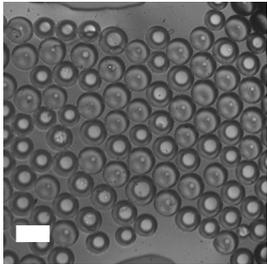
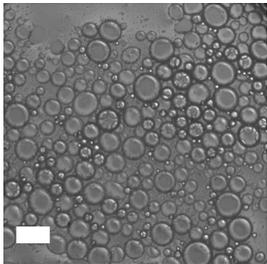
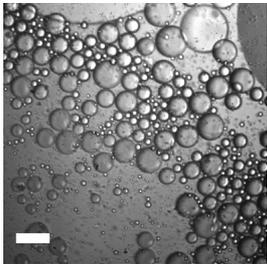
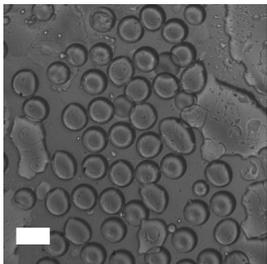
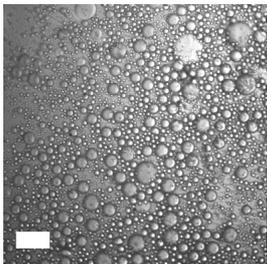
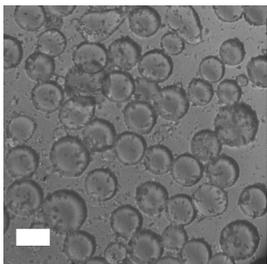
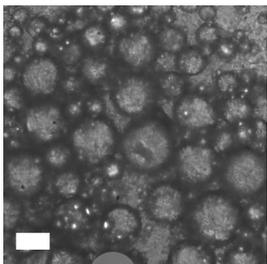
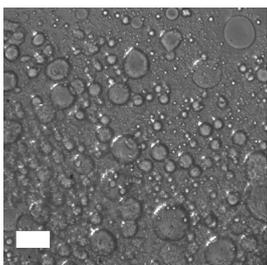
Échantillon	Émulsion juste après formation	Émulsion vieillie	Durée de stabilité
S1-0		 24h	< 4 jours
S3-0,15		 24h	< 7 jours
S3-0,6		 1 mois	< 7 jours
S6-1		 1 mois	< 7 jours
S12-2		×	< 2 jours

TABLEAU V.3 – Évolution des émulsions inverses formées en microfluidique. Les barres d'échelle représentent 100  $\mu\text{m}$ .

### III.2 Formation d'émulsions doubles en microfluidique

Pour réaliser nos émulsions doubles, nous avons utilisé la méthode présentée au paragraphe II à la page 183 qui permet de concilier au sein de la même puce des canaux hydrophiles et hydrophobes.

La phase huile utilisée est le myristate d'isopropyle dans lequel le PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub> est dissous à 5 mg/mL. Les phases aqueuses ont des pH et des concentrations en NaCl variées. Les mêmes volumes de chaque phase sont mis au contact pendant 24 h dans un pilulier en verre. Chaque phase est ensuite prélevée à la seringue. La phase aqueuse est séparée en deux seringues, l'une jouant le rôle de phase aqueuse interne, l'autre de phase aqueuse externe. Les liquides sont ensuite injectés dans la puce par des pousses-seringues dont les débits sont contrôlés par l'interface nEMESYS développée par CETONI.

Il faut noter que si les conditions de préparation des échantillons sont identiques à celles utilisées pour l'Ultra-Turrax<sup>®</sup>, les fractions volumiques d'eau et d'huile constituant l'émulsion finale ne seront pas identiques mais contrôlées par les débits utilisés pour former les gouttes.

#### III.2.a Optimisation de la géométrie de la puce

Dans un premier temps, nous avons travaillé avec une géométrie très simple pour nos canaux : deux jonctions en croix successives, avec uniquement des canaux droits. Les diamètres du canal reliant les deux jonctions et du canal en aval de la seconde jonction étaient les mêmes et valaient 100 μm (cf FIGURE V.19(a)).

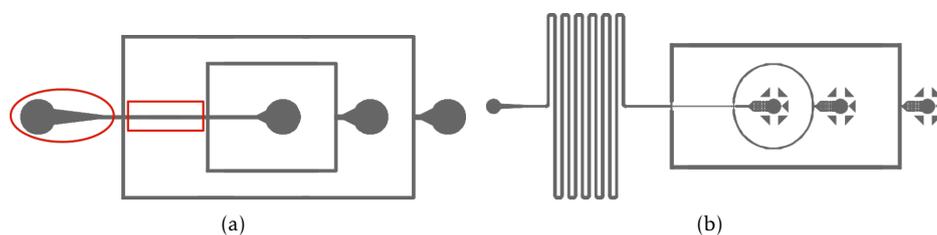


FIGURE V.19 – Géométries des puces utilisées pour former nos émulsions doubles : (a) Géométrie posant des problèmes de désorganisation des gouttes d'eau dans l'huile (zone mise en évidence par un rectangle rouge) et de coalescence (zone mise en évidence par une ellipse rouge), (b) Nouvelle géométrie permettant de résoudre ces problèmes.

Cette géométrie pose deux difficultés :

- Tout d'abord, les gouttelettes d'eau internes ont tendance à se désorganiser entre les deux jonctions, c'est-à-dire qu'elles arrivent avec une fréquence variable à la seconde jonction (cf zone mise en évidence par un rectangle rouge sur la FIGURE V.19(a)). Ceci est lié à la largeur identique des canaux en amont et en aval de la seconde jonction : pour être correctement encapsulées à la seconde jonction, les gouttelettes d'eau formées à la première jonction doivent avoir un diamètre suffisamment inférieur aux globules d'huile formés à la seconde jonction. Les gouttelettes générées pour répondre à cette exigence ne touchent pas les parois du canal, ce qui conduit à leur désorganisation au cours de leur trajet entre les deux jonctions. Elles arrivent donc de façon aléatoire à la seconde jonction, rendant impossible la formation de gouttes multiples régulières encapsulant un même nombre de gouttelettes dans chaque globule (cf FIGURE V.20(a) et (b)).

- Ensuite, beaucoup de globules d'huile coalescent dans la chambre de sortie de la puce (cf zone mise en évidence par une ellipse rouge sur la FIGURE V.19(a)), laissant penser que le polymère n'a pas suffisamment de temps pour venir se placer aux interfaces et les stabiliser correctement (cf FIGURE V.20(c)).

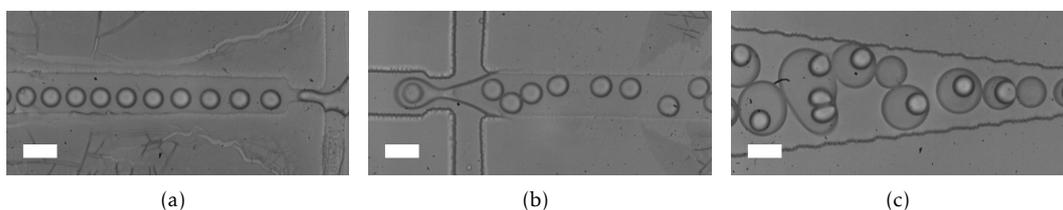


FIGURE V.20 – Difficultés rencontrées lors de la formation d'émulsions doubles stabilisées par le copolymère PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub> : (a) formation organisée des gouttelettes d'eau dans l'huile à la première jonction, (b) les gouttelettes d'eau dans l'huile arrivent à la seconde jonction de façon désorganisée, avec une fréquence irrégulière, (c) coalescence des globules d'huile dans la chambre de sortie. Les barres d'échelle représentent 100  $\mu$ m.

Pour résoudre ces problèmes, nous avons développé une nouvelle géométrie de puce, en réduisant le diamètre du canal entre les deux jonctions à 50  $\mu$ m : au lieu d'être libres de se déplacer dans le canal, les gouttes vont cette fois-ci être contraintes par les parois, comme illustré sur la FIGURE V.21. Un long canal de sortie en serpentin a en outre été créé, qui laisse le temps au polymère de venir se placer aux interfaces avant que les gouttes n'entrent en contact dans la chambre de sortie de la puce où le canal s'élargit (cf FIGURE V.19(b)). La coalescence des globules d'huile dans la chambre de sortie des puces a pu être supprimée grâce à cet ajout.



FIGURE V.21 – Gouttes contraintes par les parois dans un canal plus fin de 50  $\mu$ m, ce qui permet d'éviter leur désorganisation.

### III.2.b Influence des paramètres physico-chimiques sur la formation des émulsions

Comme pour les émulsions simples, il est possible en microfluidique de forcer la formation d'émulsions doubles dans des conditions de pH et de concentration en sel qui donnent d'autres types d'émulsions à l'Ultra-Turrax<sup>®</sup>. Nous nous sommes ici concentrés sur l'étude des phases aqueuses à pH d'équilibre entre 3 et 8. En effet, pour d'éventuelles applications pour le vivant, le pH 12 semble moins pertinent tandis que les émulsions formées à pH 1 ont une stabilité très limitée, et conduisent à la perte du levier de déstabilisation que constitue la diminution du pH.

Nous avons donc étudié des échantillons avec des phases aqueuses à pH initiaux de 3 ou 6, pour des concentrations en NaCl variant entre 0 et 2 M. Les valeurs de pH de ces phases aqueuses après 24 h de mise au contact avec une phase myristate d'isopropyle en présence de copolymère, et les valeurs de pH à l'équilibre de ces mêmes phases, sont rappelées dans les quatre premières colonnes du TABLEAU V.4. En résumé, le pH à l'issue des 24 h de mise au contact est compris entre

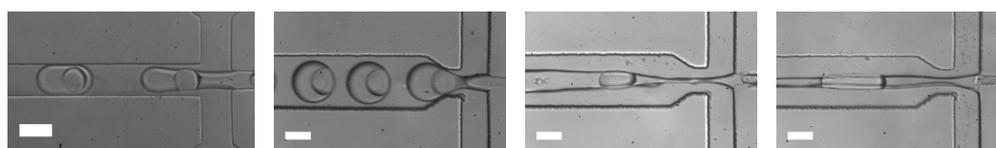
3 et 4 pour des pH initiaux de 3 et des concentrations en NaCl comprises entre 0 et 0,4 M. Pour tous les autres échantillons, le pH est de 8 à l'issue des 24 h de mise au contact.

pH initial	Gamme de [NaCl]	pH <sub>24h</sub>	pH <sub>équilibre</sub>	Formation de doubles émulsions ?
3	0 M	3	3	oui
3	0,15 à 0,4 M	entre 3 et 4	8	oui
3	0,6 à 2 M	8	8	non
6	0 à 2 M	8	8	non

TABLEAU V.4 – Conditions de pH et de concentration en NaCl dans lesquelles il est possible de former des émulsions doubles stabilisées par un copolymère PDMS-*b*-PDMAEMA en microfluidique.

Nous avons fait une constatation surprenante : il est possible de générer des émulsions doubles lorsque le pH de la phase aqueuse lors de la formation des gouttes est autour de 3, comme présenté sur les FIGURES V.22(a) et (b) (attention, c'est bien le pH après 24 h de mise au contact qui est à considérer ici et non le pH d'équilibre, cf Chapitre III page 78). En revanche, lorsque le pH de la phase aqueuse lors de la formation de l'émulsion est autour de 8, il est impossible de générer des gouttes à la seconde jonction. Dans ce cas, la phase huile forme un fin filet que la phase aqueuse ne parvient pas à rompre, même à des rapports de débits très élevés entre la phase continue et les phases dispersées (un facteur 50 entre les débits de phase aqueuse externe et de phase dispersée n'a pas permis de former des gouttes à la seconde jonction à ces pH, quand un facteur 4 peut suffire pour un pH de 3). Ceci est illustré aux FIGURES V.22(c) et (d).

Ces constatations sont résumées en dernière colonne du TABLEAU V.4.



(a) pH 3 - [NaCl] = 0 M (b) pH 3 - [NaCl] = 0,4 M (c) pH 8 - [NaCl] = 0 M (d) pH 8 - [NaCl] = 1 M

FIGURE V.22 – Observation de la formation des gouttes d'huile à la seconde jonction des puces microfluidiques. Les phases aqueuses à pH 3 des échantillons (a) et (b) permettent la formation de gouttes, tandis que les phases aqueuses à pH 8 des échantillons (c) et (d) conduisent à des filets d'eau impossible à rompre. (a)  $D_{EE} = 12 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $D_H = 4,5 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $D_{EI} = 2 \mu\text{L}/\text{min}$ ; (b)  $D_{EE} = 18 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $D_H = 4 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $D_{EI} = 1 \mu\text{L}/\text{min}$ ; (c)  $D_{EE} = 25 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $D_H = 0,1 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $D_{EI} = 0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ ; (d)  $D_{EE} = 20 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $D_H = 0,4 \mu\text{L}/\text{min}$ ,  $D_{EI} = 0,05 \mu\text{L}/\text{min}$ ; avec  $D_{EE}$  débit de la phase aqueuse externe,  $D_H$  débit de la phase huile, et  $D_{EI}$  débit de la phase eau interne. Les barres d'échelle représentent 100  $\mu\text{m}$ .

De plus, des échantillons de pH initial de 3 et de concentration en sel élevées, incapables de former des gouttes à la seconde jonction, peuvent en former s'ils sont utilisés sans mise au contact préalable des deux phases (et donc avant que la phase aqueuse n'ait subi un saut de pH). C'est le cas par exemple de l'échantillon à pH 3 et 1 M en NaCl présenté FIGURE V.23. En revanche deux phases non mises en contact de pH initial de 6 conduisent à la formation d'une langue de liquide insécable, de la même façon qu'après 24 h de mise au contact.

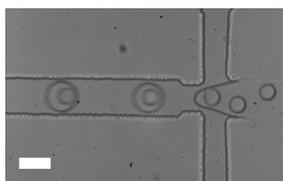


FIGURE V.23 – Formation de gouttes d'huile à la seconde jonction pour un échantillon de pH 3 et 1 M en NaCl dont les deux phases n'ont pas été mises au contact, et dont le pH évolue pour atteindre 8 après 24 h.

Le pH semble donc être le facteur déterminant pour la formation d'émulsions doubles dans nos systèmes microfluidiques. Il est à noter que ce phénomène n'est pas lié à la façon dont nos puces sont traitées pour concilier les deux mouillabilités au sein d'une même puce. En effet, les premiers essais de formation d'émulsions doubles avaient été réalisés avec des puces fonctionnalisées par la méthode de Bauer et al.<sup>41</sup> (cf page 181), basée sur l'utilisation d'un revêtement de couches de polyélectrolytes de charges opposées (*layer-by-layer*), et les mêmes constatations ont été effectuées.

Pour tenter d'expliquer ce phénomène, nous avons réalisé plusieurs mesures physico-chimiques :

- Des mesures de tensions interfaciales entre les phases aqueuses et les phases huiles dans les différentes conditions de pH et de concentration en NaCl : en effet, une tension interfaciale plus basse favoriserait la stabilisation d'une colonne de liquide sans fractionnement en gouttes ;
- Des mesures de viscosité : une phase aqueuse plus visqueuse ou une phase huile moins visqueuse augmenterait la contrainte exercée sur la langue d'huile à la seconde jonction et donc favoriserait la formation de gouttes ;
- Des mesures d'angles de contact PDMS/eau/huile : comme on l'a vu, le mouillage des différentes phases est un paramètre critique pour obtenir la formation de gouttes. Un angle de contact faible de l'huile dans l'eau sur le PDMS hydrophile défavoriserait la formation des gouttes.

**Mesures de tensions interfaciales** Les mesures de tensions interfaciales entre les phases myristate d'isopropyle contenant 5 mg/mL de copolymère et les phases aqueuses aux différents pH et concentrations en NaCl ont été décrites au Chapitre III, paragraphe I.2.b, à la page 91. Les résultats sont présentés ici sous une autre forme à la FIGURE V.24.

Comme on peut le voir, les valeurs de tensions obtenues ne semblent pas significativement différentes selon que la formation de gouttes d'huile à la seconde jonction soit ou non possible. Ce paramètre ne semble pas déterminant ici.

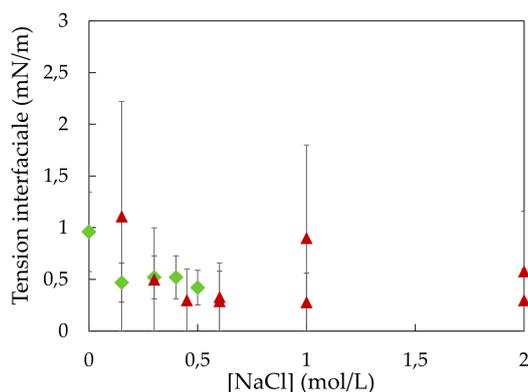


FIGURE V.24 – Tensions interfaciales entre les phases eau et huile de nos émulsions mesurées par tensiométrie à goutte tournante. ◆ Conditions de pH et de NaCl permettant de former des gouttes d'huile en microfluidique à la seconde jonction, ▲ Conditions de pH et de NaCl ne permettant pas de former des gouttes à la seconde jonction des puces.

**Mesures de viscosité** Des mesures de viscosité ont été réalisées sur un viscosimètre à billes Anton Paar Lovis 2000 M sur deux échantillons différents : un pour lequel la formation de gouttes d'huile à la seconde jonction est possible (pH 3, [NaCl]=0 M), l'autre pour lequel elle est impossible (pH 8, [NaCl]=1 M). Les phases eau et huile de ces deux échantillons ont été mises au contact durant 24 h puis chacune des phases a été prélevée séparément pour réaliser la mesure de viscosité.

Les résultats sont présentés au TABLEAU V.5.

Échantillon	Viscosité eau	Viscosité huile
pH 3, [NaCl]=0 M	0,99 ± 0,02 mPa.s	5,47 ± 0,2 mPa.s
pH 8, [NaCl]=1 M	1,04 ± 0,03 mPa.s	5,32 ± 0,06 mPa.s

TABLEAU V.5 – Mesures de viscosité réalisées sur les phases eau et huile de deux échantillons grâce à un viscosimètre à billes.

Là encore les valeurs de viscosité obtenues ne permettent pas d'expliquer les différences obtenues.

**Mesures d'angles de contact** Deux types d'angles de contact sont mesurés : les angles de contact d'une goutte d'eau sur du PDMS non exposé au plasma (hydrophobe) dans l'huile, et ceux d'une goutte d'huile sur du PDMS exposé au plasma (hydrophile) dans l'eau. On s'attend à obtenir des angles de contact élevés pour ces différentes mesures. Cependant, si des angles de contact faibles de l'huile sur le PDMS exposé au plasma sont obtenus, cela pourrait expliquer les difficultés rencontrées pour former des gouttes à pH élevé.

Pour les différents échantillons testés, 4 mL de phase aqueuse sont d'abord mis au contact avec 4 mL de phase huile, puis chaque phase est prélevée séparément. Le même échantillon est utilisé pour effectuer les deux mesures. Les mesures sont réalisées dans une cuve en quartz cubique de 2 cm de côté.

Les mesures sur les gouttes d'eau sont les plus simples à réaliser car l'eau est plus dense que l'huile. Un morceau de PDMS propre mais non exposé au plasma est déposé au fond de la cuve en quartz. Il est ensuite recouvert par la phase huile de l'échantillon étudié. Une goutte d'eau de 5  $\mu$ L est ensuite déposée à la pipette à la surface du PDMS (cf FIGURE V.25(a)).

Les mesures sur les gouttes d'huile sont un peu plus complexes. La cuve est remplie d'eau à ras bord, puis un morceau de PDMS ayant été exposé au plasma et percé d'un trou de 500  $\mu$ m est déposé à la surface de l'eau, face oxydée tournée vers l'eau. Un capillaire est introduit dans l'orifice et une goutte d'huile de 5  $\mu$ L est alors formée à l'aide d'un pousse-seringue (cf FIGURE V.25(b)).

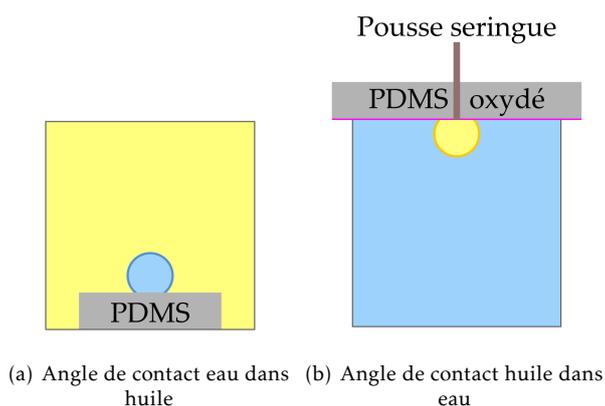


FIGURE V.25 – Schéma des montages expérimentaux permettant la détermination des angles de contact

Dans les deux cas, une image de la goutte est prise puis la valeur de l'angle de contact est déterminée à l'aide de l'extension *Drop Analysis* du logiciel ImageJ. Des exemples des images obtenues sont présentées à la FIGURE V.26.

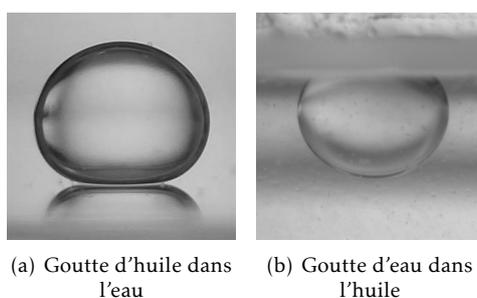


FIGURE V.26 – Exemples d'images obtenues pour la mesure des angles de contact.

Les mesures sont présentées dans le TABLEAU V.6.

L'échantillon à pH 3 sans sel présente un angle de contact pour l'huile plus élevé que les autres, et un angle plus faible pour l'eau. Un angle de contact élevé pour l'huile dans l'eau au contact du PDMS hydrophile est en faveur de la formation de gouttes à la seconde jonction, ce qui est bien observé.

En revanche, les valeurs d'angle de contact ne semblent pas constituer un paramètre critique puisque l'échantillon à pH 3 et 0,3 M de NaCl est capable de former des gouttes à la seconde jonction, au contraire des échantillons à pH 8, qui présentent pourtant des angles de contact tout à fait similaires. Les mesures d'angles de contact ne révèlent pas de changements de mouillabilité

pH <sub>24h</sub>	[NaCl]	Angle de contact huile	Angle de contact eau
<i>Sans copolymère</i>			
eau milli-Q	0 M	167° ± 4°	158° ± 4°
<i>En présence de copolymère</i>			
3	0 M	149° ± 2°	152° ± 2°
3	0,3M	138° ± 4°	163° ± 7°
8	0 M	131° ± 6°	165° ± 4°
8	0,6 M	135° ± 6°	166° ± 6°
8	1 M	139° ± 4°	163° ± 7°

TABLEAU V.6 – Mesures d'angles de contact sur les phases eau et huile de plusieurs échantillons. Les pH mentionnés ici sont les pH de la phase aqueuse à l'issue des 24 h de mise au contact des deux phases. Angle de contact huile désigne l'angle de contact que forme une goutte d'huile dans l'eau au contact de PDMS exposé au plasma, tandis que Angle de contact eau désigne l'angle de contact formé par une goutte d'eau dans l'huile au contact de PDMS non exposé au plasma.

importants à même d'expliquer les différences observées.

On note que la présence de copolymère conduit à un angle de contact légèrement plus faible pour l'huile sur le PDMS hydrophile, celle-ci a donc une hydrophobie moins prononcée. Au contraire, l'angle de contact d'une goutte d'eau sur le PDMS non exposé au plasma est légèrement plus élevé en présence de copolymère. La présence de copolymère diminue donc légèrement l'hydrophobie de l'huile et celle de l'eau.

**Conclusions** Aucune des mesures que nous avons effectuées ne permet de mettre en avant une explication à la différence de comportement observé à la seconde jonction entre les échantillons à pH 3 et ceux à pH supérieurs à 6. Il faut cependant prendre en compte le fait que ces mesures sont effectuées en statique et relevées à l'équilibre. Les valeurs, notamment celles des tensions interfaciales, peuvent être très différentes localement lors de la formation de la goutte, par exemple du fait du délai de la diffusion du copolymère vers l'interface. A titre indicatif, les mesures de DLS ont montré que le coefficient de diffusion du copolymère en phase myristate d'isopropyle est de  $2,7 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ , ce qui signifie qu'il faut 30 s aux chaînes pour parcourir 10  $\mu\text{m}$ . Cette durée est extrêmement grande devant le temps de formation d'une goutte qui est de l'ordre de la microseconde.

Nous pouvons imaginer que les phénomènes observés sont liés à des différences de tensions interfaciales apparaissant dans les premiers instants après la création de l'interface eau/huile. Lors de la formation d'une langue de liquide d'huile dans l'eau, le copolymère vient s'adsorber aux interfaces pour les stabiliser. A bas pH, les chaînes nouvellement adsorbées vont se charger,

ce qui va rendre difficile l'adsorption de nouvelles chaînes aux interfaces, du fait de la répulsion électrostatique ainsi engendrée. A pH plus élevé, le copolymère sera neutre, et de nouvelles chaînes pourront plus facilement venir à l'interface pour la stabiliser. La tension interfaciale sera donc plus faible dans ce deuxième cas, ce qui permet la stabilisation d'une langue de liquide. A bas pH, la tension est plus importante et il est alors plus favorable de rompre l'interface pour former des gouttes.

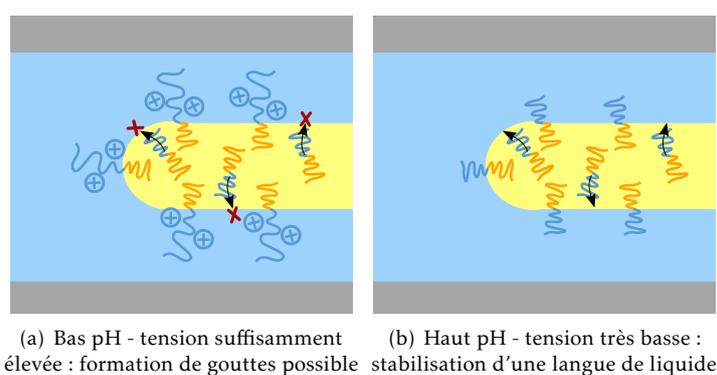


FIGURE V.27 – Représentation schématique du comportement du copolymère lors de la formation d'une goutte lorsque les deux phases ont été mises au contact (a) à bas pH et (b) à haut pH.

Pour la suite nous nous concentrerons sur les échantillons pouvant produire des gouttes, obtenus pour des pH autour de 3 et des concentrations en NaCl faibles.

### III.2.c Formation et récolte d'émulsions doubles

Nous avons vu à la partie précédente comment optimiser la géométrie de la puce et les paramètres physico-chimiques de la phase aqueuse pour parvenir à former des gouttes doubles sur puce. L'étape suivante est la récolte de l'émulsion et son étude au cours du temps.

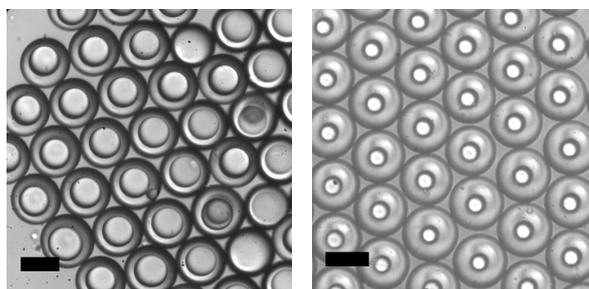
Nous avons dû faire face à deux difficultés :

- dans certains cas, la coalescence des gouttes internes avec la phase externe au sein même de la puce, à cause de micro-poussières dont la présence est impossible à éviter ;
- la coalescence des gouttes internes avec la phase aqueuse externe après récolte, indiquant une mauvaise stabilité de l'interface tournée vers l'eau.

Le premier problème n'a pas de solution directe mais peut être contourné en travaillant avec une autre puce traitée de façon identique. En revanche, la coalescence des gouttes internes en sortie de puce n'a pas pu être évitée. Ce phénomène n'est pas observé pour tous les échantillons.

La seule émulsion que nous avons réussi à récolter et à stabiliser sur plus d'une semaine sous forme de multiple est une émulsion formée à partir d'une phase aqueuse à pH 3 sans sel. Il faut noter que ces conditions, qui apparaissent comme optimales pour la stabilisation d'émulsions formées par voie microfluidique, sont des conditions qui conduisent à la formation d'une émulsion directe à l'Ultra-Turrax®, qui démixe en quelques mois. Nous avons pu conserver une de ces émulsions pendant deux ans. Durant cette période, l'émulsion est restée multiple et monodisperse, mais la taille des gouttelettes internes a diminuée, passant d'un diamètre moyen de 75  $\mu\text{m}$  à un diamètre de 37  $\mu\text{m}$ . L'évolution des gouttes est illustrée à la FIGURE V.28. On peut supposer que les

gouttelettes internes se sont vidées par transfert de l'eau interne *via* la phase huile, probablement par transport au sein de micelles de copolymère.



(a) Émulsion juste après récolte (b) Émulsion 2 ans après récolte

FIGURE V.28 – Évolution d'une émulsion E/H/E formée en microfluidique, à pH initial de 3 et sans NaCl. Les barres d'échelle représentent 100  $\mu\text{m}$ .

**Conclusions** Alors que des émulsions doubles sont très facilement obtenues de façon spontanée à l'Ultra-Turrax<sup>®</sup>, leur formation en microfluidique est plus complexe. Nous avons dû faire face à plusieurs difficultés dont nous n'avons pas toujours su établir l'origine avec certitude, démontrant la complexité du système sur lequel nous travaillons. En optimisant la géométrie de la puce et en travaillant dans des conditions physico-chimiques bien précises, nous avons cependant réussi à former des émulsions doubles par cette voie. En particulier, il a été possible de conserver une émulsion à pH 3 sans sel pendant deux ans, avec préservation de sa structure multiple malgré une diminution de la taille des gouttelettes internes.

#### III.2.d Formation d'émulsions doubles chargées en catéchine

**Préparation des échantillons** Un volume de phase aqueuse au pH et à la concentration en NaCl souhaités est mis au contact avec le même volume de phase huile contenant le copolymère. Après 24 h de contact, ces deux phases sont prélevées à la seringue pour constituer les phases externes et huile de l'émulsion. Un autre échantillon, dont la phase aqueuse contient de la catéchine à 1 mg/mL, est préparé de la même façon. Seule la phase aqueuse de cet échantillon sera prélevée, pour constituer la phase aqueuse interne de l'émulsion double.

**Résultats obtenus** Il a été difficile d'obtenir des émulsions doubles stables chargées en catéchine de façon reproductible. De la même façon que pour les émulsions sans molécule encapsulée, les gouttelettes internes ont tendance à rapidement coalescer avec la phase aqueuse externe une fois hors de la puce. Ce phénomène se produit uniquement pour certains échantillons. De façon surprenante, un même échantillon peut conduire d'une fois sur l'autre à une émulsion double très stable ou bien à une émulsion très vite déstabilisée en directe.

Nous avons testé différentes conditions pour essayer d'améliorer la stabilité des émulsions et éviter d'observer la coalescence rapide des gouttelettes internes :

- Des concentrations en NaCl variant entre 0 et 0,3 M;
- L'utilisation du copolymère PDMS<sub>104</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>89</sub> comme stabilisant au lieu du PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub> (ce copolymère étant à même de stabiliser des émulsions inverses, on peut

espérer que les interfaces tournées vers l'eau soit mieux stabilisées).

D'autres essais ont également été réalisés pour des émulsions chargées en saccharose pour lesquelles les émulsions présentent les mêmes difficultés à être stabilisées. Nous avons essayé :

- De doubler la concentration en polymère en phase huile, pour essayer de mieux couvrir les interfaces ;
- D'utiliser d'une phase aqueuse externe moins concentrée en NaCl que la phase aqueuse interne dans le but d'essayer de favoriser le gonflement des gouttelettes et de défavoriser leur déstabilisation.

La plupart de ces essais ont conduit à des émulsions instables dont les gouttelettes internes coalescent rapidement avec l'extérieur. Les meilleurs résultats furent obtenus pour des phases aqueuses chargées en catéchine et des concentrations en NaCl de 0 et 0,15 M, stabilisées par le copolymère habituel en solution dans l'huile à 5 mg/mL.

Nous avons réussi à plusieurs reprises à former une émulsion double chargée en catéchine très stable pour une concentration en NaCl de 0,15 M et un pH initial de 3. Nous avons pu conserver durant 5 mois une de ces émulsions sans modification de sa structure (cf FIGURE V.29(a) et (b)). Cependant, il a été impossible de former cette émulsion de façon reproductible et le plus souvent (environ pour 80% des échantillons testés), l'émulsion ainsi formée devient rapidement directe par coalescence des gouttelettes internes avec la phase aqueuse externe.

Les meilleurs résultats furent finalement obtenus avec des phases aqueuses sans sel, à pH initial de 3, conditions dans lesquelles à la fois la stabilité et la reproductibilité furent optimales (cf FIGURE V.29(c) et (d)), c'est-à-dire que l'obtention d'une émulsion double dont les gouttelettes internes coalescent avec la phase aqueuse externe est limitée à de rares cas.

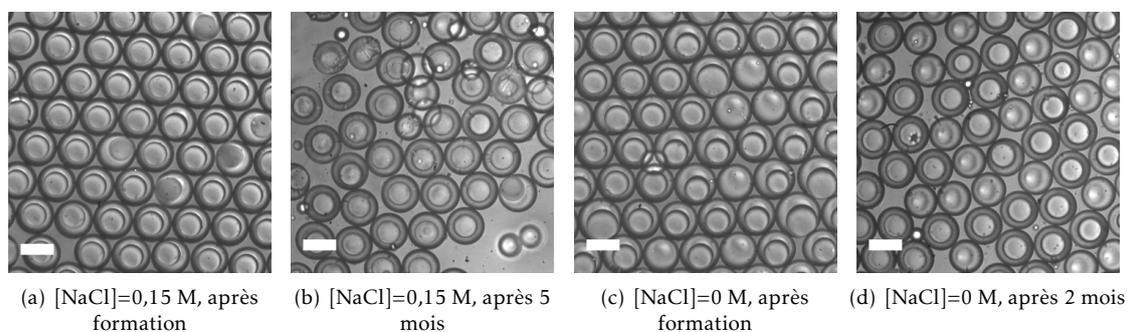


FIGURE V.29 – Émulsions chargées en catéchine formées à pH 3 et (a) 0,15 M ou (c) 0 M en NaCl. Les images (b) et (d) représentent les mêmes émulsions respectivement 5 et 2 mois après formation. Les barres d'échelle représentent 100  $\mu\text{m}$ .

**Relargage de la catéchine** Une émulsion E/H/E chargée en catéchine a été formée en microfluidique à partir de phases aqueuses à pH 3 et sans NaCl, puis récoltée dans deux piluliers différents.

L'émulsion contenue dans le premier pilulier, représentée à la FIGURE V.30(a), a été utilisée juste après formation. Cette émulsion est constituée de 770  $\mu\text{L}$  de phase aqueuse se répartissant entre 700  $\mu\text{L}$  de phase aqueuse externe et 70  $\mu\text{L}$  de phase aqueuse interne contenant 70  $\mu\text{g}$  de catéchine. Les images de la FIGURE V.30 ne sont pas représentatives des proportions gouttelettes internes /

eau externe car elles ont été prises sur un échantillon d'émulsion crémée. La phase aqueuse des émulsions est prélevée après crémage et la quantité de catéchine qu'elle contient est mesurée par fluorescence. Cette phase aqueuse est remplacée par un même volume de phase aqueuse à pH 1, et l'émulsion ainsi obtenue est laissée agiter pendant 3 h. L'émulsion devient rapidement directe (cf FIGURE V.30(b)). La phase aqueuse sous-nageante est à nouveau prélevée à l'issue des 3 h et la concentration en catéchine ainsi que le pouvoir antioxydant sont mesurés.

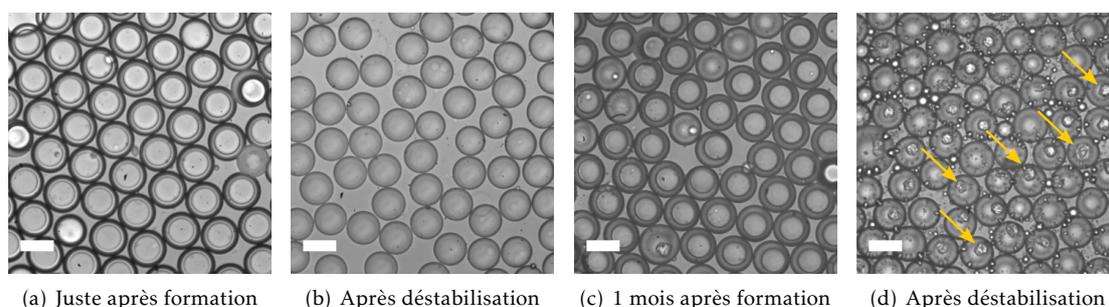


FIGURE V.30 – Emulsion chargée en catéchine formée à pH 3, en l'absence de NaCl, (a) et (b) après formation, (c) et (d) un mois après formation. Les flèches jaunes mettent en évidence les gouttelettes d'eau interne présentant un aspect solide. Les barres d'échelle représentent 100  $\mu\text{m}$ .

Avant déstabilisation, on s'attend à avoir une quantité extrêmement faible, voire nulle, de catéchine en phase aqueuse, puisque dans le cas de la microfluidique la phase aqueuse externe n'en contient initialement pas du tout. Or, une concentration de 55,2  $\mu\text{g/mL}$  est détectée, ce qui correspond à 55% de la catéchine initialement introduite.

Cette proportion est très élevée, et peut s'expliquer soit par la coalescence de certaines gouttes internes avec la phase aqueuse externe lors de la formation de l'émulsion au sein de la puce, soit par la fuite très rapide de la catéchine des gouttelettes internes de l'émulsion vers la phase aqueuse externe du fait de la différence de pression osmotique entre ces deux phases. La première explication paraît peu vraisemblable car si ce phénomène avait été important il aurait été visible. La deuxième hypothèse a en outre été observée dans la littérature lors du relargage passif de composés encapsulés dans des émulsions doubles formées en deux étapes<sup>55-57</sup>.

Le phénomène de fuite est cependant très rapide ici. Cela est probablement dû au fait que le copolymère ne couvre pas encore très bien les interfaces, comme illustré à la FIGURE V.31. En effet, en microfluidique, la migration du copolymère vers les interfaces est uniquement gouvernée par la diffusion, au contraire de la voie mécanique où une composante convective importante s'y ajoute. La faible couverture est encore renforcée par l'adsorption probable du copolymère présent en phase aqueuse externe à la surface des canaux hydrophiles. La plupart du copolymère se trouve donc à cette étape réparti entre les phases huile et eau sous forme de micelles. La catéchine peut alors facilement traverser la phase huile en étant transportée par celles-ci.

La fuite pourrait être limitée par la présence de sel. Nous avons en effet constaté que la phase aqueuse externe de l'émulsion contenant 0,15 M de NaCl présentée aux FIGURES V.29(a) et (b) reste incolore pendant tout son vieillissement, tandis que la phase aqueuse de l'émulsion présentée aux FIGURES V.29(c) et (d) en absence de sel se colore assez rapidement en brun, comme les solutions de catéchine vieilles présentées au Chapitre IV. Il semble donc que la fuite n'a pas lieu si les phases aqueuses contiennent du sel. Le déséquilibre osmotique induit par la catéchine est en effet négligeable dans ce cas (la concentration molaire en catéchine étant près de 50 fois inférieure à la

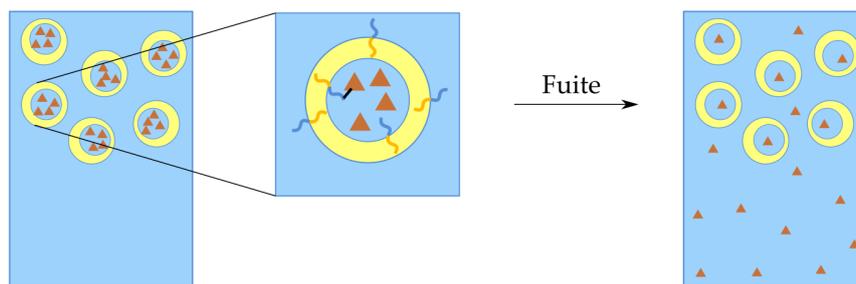


FIGURE V.31 – Représentation schématique de la couverture des interfaces par le copolymère juste après récolte de l'émulsion. Celui-ci y est peu présent, rendant les interfaces faciles à traverser pour la molécule de catéchine.

concentration en sel), et la molécule reste encapsulée dans les gouttelettes internes. Cela pourrait être un moyen d'éviter la fuite de la catéchine à ce stade. Il est donc regrettable que la formation d'émulsions doubles en microfluidique en présence de NaCl ne puisse pas être obtenue de façon fiable.

Après déstabilisation de l'émulsion multiple formulée sans NaCl, la phase aqueuse sous-nageante prélevée est concentrée à 38,3 µg/mL en catéchine, concentration qui prend en compte à la fois à la catéchine présente dans la phase aqueuse externe résiduelle après le premier prélèvement, et la catéchine libérée lors de la diminution du pH. 29,4 µg sont réellement issus de la phase aqueuse interne, soit 42% de la quantité de catéchine initialement introduite en phase aqueuse interne. Au total, 67,7 µg de catéchine sont récupérés sur les 70 µg introduits, c'est-à-dire la quasi-totalité. Contrairement aux expériences réalisées avec l'Ultra-Turrax<sup>®</sup>, il a été possible ici de récupérer une quantité importante de catéchine après déstabilisation, ce qui montre que le relargage de cette molécule est possible. Là encore, ceci peut s'expliquer par la couverture encore faible des interfaces par le copolymère, la catéchine ne peut donc former qu'une quantité restreinte de liaisons hydrogènes avec le copolymère présent à l'interface. La quasi-totalité de la molécule après relargage est donc libre et peut être détectée.

Le pouvoir antioxydant mesuré en phase aqueuse externe après déstabilisation est de 20,8 µmol ET/µmol, ce qui est cohérent avec les valeurs de pouvoir antioxydant de la catéchine obtenues au jour 0 sur les mesures présentées au Chapitre IV à la page 143.

La même expérience est réalisée pour une émulsion vieille de 1 mois. Le pH de la phase aqueuse est alors remonté à 6. La FIGURE V.30(c) représente l'émulsion avant utilisation : la morphologie est identique à celle juste après formation, avec des gouttelettes internes de 34 µm de diamètre et des globules d'huile de 52 µm.

Les mêmes études que précédemment ont été réalisées sur cette émulsion. La déstabilisation à pH 1 n'a pas été complète, et à l'issue des 3 h sous agitation les globules contiennent encore pour certains de petites gouttelettes d'eau (cf FIGURE V.30(d)). La plupart des gouttes internes qui subsistent présentent un aspect solide, certaines d'entre elles sont mises en évidence par des flèches sur la FIGURE V.30(d). Nous supposons que cela est lié à la façon dont sont déstabilisées les émulsions. Nous avons vu au Chapitre III que le mécanisme principal probable de déstabilisation

est la fuite d'eau interne dans la phase aqueuse externe *via* les micelles formées par le copolymère en phase huile. Au fur et à mesure de la fuite de l'eau, la concentration en catéchine et en copolymère au sein des gouttelettes internes augmente, pour former *in fine* un gel physique composé des chaînes polymères et des molécules de catéchine liées par des liaisons hydrogènes. Ce phénomène est représenté de façon schématique à la FIGURE V.32. Il pourrait être renforcé par la dégradation et l'oligomérisation d'une partie de la catéchine au sein des gouttelettes durant le mois de stockage à pH 6.

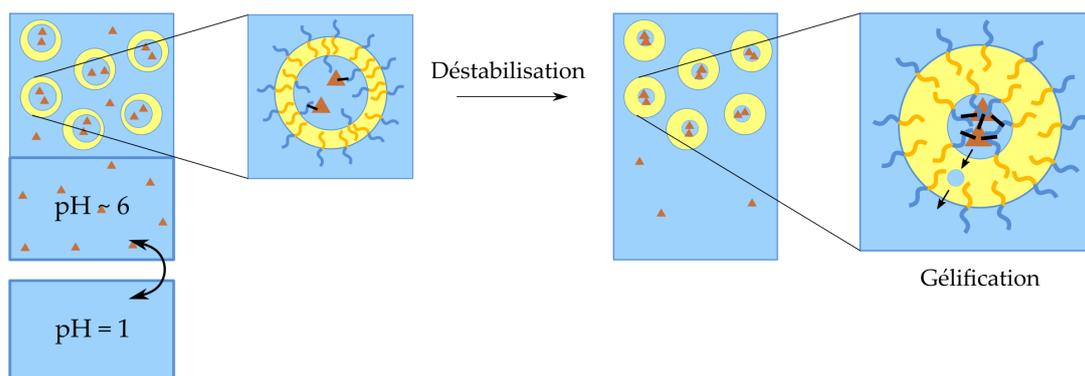


FIGURE V.32 – Représentation schématique de la déstabilisation de l'émulsion formée en microfluidique vieille de 1 mois. Le copolymère couvre bien les interfaces. La fuite de l'eau vers l'extérieur lors de la diminution du pH conduit à la formation d'un gel physique catéchine/copolymère. Les liaisons hydrogènes sont représentées par les épais traits noirs.

Cette mauvaise déstabilisation n'a jamais été observée dans d'autres cas, et en particulier ne l'a pas été pour l'émulsion non vieillie. Cela peut être expliqué par la couverture encore mauvaise de l'interface par le polymère aux temps courts en microfluidique, limitant les interactions catéchines/copolymère possibles pour la formation du gel. L'absence d'oligomères de catéchine à ce stade peut également expliquer que la déstabilisation puisse être complète.

Ce phénomène n'a pas été observé non plus à l'Ultra-Turrax<sup>®</sup> avec le Miglyol<sup>®</sup> 812.

Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de quantifier la catéchine en phase aqueuse avant et après déstabilisation, ni par spectroscopie UV/visible où les spectres obtenus ne sont pas ceux habituellement observés pour la molécule, ni par fluorescence qui permet uniquement de quantifier une solution de catéchine non dégradée. Nous avons donc supposé pour la mesure de pouvoir antioxydant que la concentration en catéchine en phase aqueuse après déstabilisation était identique à la concentration mesurée lors de la déstabilisation juste après formation. Nous avons obtenu un pouvoir antioxydant de 5,9  $\mu\text{mol ET}/\mu\text{mol}$ , presque 4 fois inférieur à celui mesuré après déstabilisation de l'émulsion juste formée. Il est possible que cette diminution soit liée à une perte d'activité de la catéchine, ce qui signifierait qu'elle n'est pas correctement protégée au sein des gouttelettes internes. Cependant, comme l'émulsion n'est pas correctement déstabilisée, cela pourrait aussi être lié à une concentration de catéchine relarguée moins importante, conduisant à fausser la mesure du pouvoir antioxydant et à sous-estimer sa valeur. Enfin, cela pourrait être dû au fait que la catéchine continue à fuir en phase aqueuse externe dans les premiers jours après formation de l'émulsion, conduisant tout simplement à une diminution de la quantité de catéchine

encapsulée. Il est possible aussi que ces phénomènes se conjuguent.

**Conclusions** L'obtention d'émulsions doubles chargées en catéchine en microfluidique est également complexe, et il est difficile de former des émulsions stables de façon reproductible. Les essais de relargage réalisés n'ont pas permis de conclure quant à l'effet protecteur des émulsions sur la catéchine, il serait intéressant de poursuivre l'investigation de façon à vérifier la reproductibilité de la solidification des gouttelettes internes lors de la déstabilisation, ainsi que la durée nécessaire à l'obtention d'une telle structure.

A RETENIR DE CE CHAPITRE :

- Nous avons développé une méthode basée sur l'utilisation d'un marqueur permanent permettant de concilier au sein d'une même puce en PDMS des canaux hydrophiles et hydrophobes.
- Des émulsions directes et inverses stabilisées par le PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub> ont pu être formées avec le myristate d'isopropyle dans des conditions où des émulsions doubles sont obtenues à l'Ultra-Turrax<sup>®</sup>. Les émulsions inverses commencent à démixer en quelques jours tandis que les émulsions directes sont stables sur plus de deux mois.
- Des émulsions doubles E/H/E stabilisées par le PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub> ont pu être formées à condition que le pH de la phase aqueuse lors de la formation de l'émulsion soit de 3.
- Des études d'encapsulation et de relargage de catéchine ont été effectuées sur une émulsion à pH initial de 3 et sans sel. Une grande quantité de catéchine fuit en phase aqueuse externe dans les premiers instants, ce qui semble être évité en présence de sel (mais la formation des émulsions n'est pas reproductible dans ce cas). Le relargage complet n'est pas possible lorsque la déstabilisation est effectuée un mois après formation, probablement car on forme un gel copolymère/catéchine au sein des gouttelettes internes.

## Bibliographie

- [1] Weibel, D. B.; Kruithof, M.; Potenta, S.; Sia, S. K.; Lee, A.; Whitesides, G. M. Torque-Actuated Valves for Microfluidics. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 4726–4733.
- [2] Beebe, D. J.; Mensing, G. A.; Walker, G. M. Physics and Applications of Microfluidics in Biology. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2002**, *4*, 261–286.
- [3] Wang, J.; Sui, G.; Mocharla, V. P.; Lin, R. J.; Phelps, M. E.; Kolb, H. C.; Tseng, H.-R. Integrated Microfluidics for Parallel Screening of an In Situ Click Chemistry Library. *Angewandte Chemie* **2006**, *118*, 5402–5407.
- [4] Miller, P. W.; Jennings, L. E.; deMello, A. J.; Gee, A. D.; Long, N. J.; Vilar, R. A Microfluidic Approach to the Rapid Screening of Palladium-Catalysed Aminocarbonylation Reactions. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2009**, *351*, 3260–3268.
- [5] Manz, A.; Harrison, D. J.; Verpoorte, E. M. J.; Fettinger, J. C.; Paulus, A.; Lüdi, H.; Widmer, H. M. Planar Chips Technology for Miniaturization and Integration of Separation Techniques into Monitoring Systems : Capillary Electrophoresis on a Chip. *Journal of Chromatography A* **1992**, *593*, 253–258.
- [6] Hibara, A.; Iwayama, S.; Matsuoka, S.; Ueno, M.; Kikutani, Y.; Tokeshi, M.; Kitamori, T. Surface Modification Method of Microchannels for Gas-Liquid Two-Phase Flow in Microchips. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 943–947.
- [7] Miyaguchi, H.; Tokeshi, M.; Kikutani, Y.; Hibara, A.; Inoue, H.; Kitamori, T. Microchip-Based Liquid-liquid Extraction for Gas-Chromatography Analysis of Amphetamine-Type Stimulants in Urine. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1129*, 105–110.
- [8] Tokeshi, M.; Minagawa, T.; Kitamori, T. Integration of a Microextraction System on a Glass Chip : Ion-Pair Solvent Extraction of Fe(II) with 4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolinedisulfonic Acid and Tri-n-Octylmethylammonium Chloride. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 1711–1714.
- [9] Ng, A. H. C.; Uddayasankar, U.; Wheeler, A. R. Immunoassays in Microfluidic Systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397*, 991–1007.
- [10] Sia, S. K.; Whitesides, G. M. Microfluidic Devices Fabricated in Poly(Dimethylsiloxane) for Biological Studies. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3563–3576.
- [11] Baret, J.-C.; J. Miller, O.; Taly, V.; Ryckelynck, M.; El-Harrak, A.; Frenz, L.; Rick, C.; L. Samuels, M.; Brian Hutchison, J.; J. Agresti, J.; R. Link, D.; A. Weitz, D.; D. Griffiths, A. Fluorescence-Activated Droplet Sorting ( FADS ) : Efficient Microfluidic Cell Sorting Based on Enzymatic Activity. *Lab on a Chip* **2009**, *9*, 1850–1858.
- [12] Gómez-Sjöberg, R.; Leyrat, A. A.; Pirone, D. M.; Chen, C. S.; Quake, S. R. Versatile, Fully Automated, Microfluidic Cell Culture System. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 8557–8563.
- [13] Abgrall, P.; Gué, A.-M. Lab-on-Chip Technologies : Making a Microfluidic Network and Coupling It into a Complete Microsystem—a Review. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2007**, *17*, R15.
- [14] Umbanhowar, P. B.; Prasad, V.; Weitz, D. A. Monodisperse Emulsion Generation via Drop Break Off in a Coflowing Stream. *Langmuir* **2000**, *16*, 347–351.
- [15] Utada, A. S.; Lorenceau, E.; Link, D. R.; Kaplan, P. D.; Stone, H. A.; Weitz, D. A. Monodisperse Double Emulsions Generated from a Microcapillary Device. *Science* **2005**, *308*, 537–541.
- [16] Toldy, A. I.; Badruddoza, A. Z. M.; Zheng, L.; Hatton, T. A.; Gunawan, R.; Rajagopalan, R.; Khan, S. A. Spherical Crystallization of Glycine from Monodisperse Microfluidic Emulsions. *Crystal Growth & Design* **2012**, *12*, 3977–3982.
- [17] Duffy, D. C.; McDonald, J. C.; Schueller, O. J. A.; Whitesides, G. M. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(Dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 4974–4984.
- [18] Lee, J. N.; Park, C.; Whitesides, G. M. Solvent Compatibility of Poly(Dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 6544–6554.

- [19] Klank, H.; P. Kutter, J.; Geschke, O. CO<sub>2</sub>-Laser Micromachining and Back-End Processing for Rapid Production of PMMA-Based Microfluidic Systems. *Lab on a Chip* **2002**, *2*, 242–246.
- [20] Qi, S.; Liu, X.; Ford, S.; Barrows, J.; Thomas, G.; Kelly, K.; McCandless, A.; Lian, K.; Goettert, J.; A. Soper, S. Microfluidic Devices Fabricated in Poly(Methyl Methacrylate) Using Hot-Embossing with Integrated Sampling Capillary and Fiber Optics for Fluorescence Detection. *Lab on a Chip* **2002**, *2*, 88–95.
- [21] Steigert, J.; Haerberle, S.; Brenner, T.; Müller, C.; Steinert, C. P.; Koltay, P.; Gottschlich, N.; Reinecke, H.; Rühle, J.; R Zengerle,; Ducrée, J. Rapid Prototyping of Microfluidic Chips in COC. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2007**, *17*, 333.
- [22] Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Butte, M. J.; Whitesides, G. M. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 1318–1320.
- [23] Seemann, R.; Brinkmann, M.; Pfohl, T.; Herminghaus, S. Droplet Based Microfluidics. *Reports on Progress in Physics* **2012**, *75*, 016601.
- [24] Liu, Y. Z.; Kim, B. J.; Sung, H. J. Two-Fluid Mixing in a Microchannel. *International Journal of Heat and Fluid Flow* **2004**, *25*, 986–995.
- [25] Stroock, A. D.; Dertinger, S. K. W.; Ajdari, A.; Mezić, I.; Stone, H. A.; Whitesides, G. M. Chaotic Mixer for Microchannels. *Science* **2002**, *295*, 647–651.
- [26] Jiang F.,; Drese K. S.,; Hardt S.,; Küpper M.,; Schönfeld F., Helical Flows and Chaotic Mixing in Curved Micro Channels. *AIChE Journal* **2004**, *50*, 2297–2305.
- [27] Günther, A.; Jensen, K. F. Multiphase Microfluidics : From Flow Characteristics to Chemical and Materials Synthesis. *Lab on a Chip* **2006**, *6*, 1487–1503.
- [28] Günther, A.; Khan, S. A.; Thalmann, M.; Trachsel, F.; Jensen, K. F. Transport and Reaction in Microscale Segmented Gas–liquid Flow. *Lab on a Chip* **2004**, *4*, 278–286.
- [29] Christopher, G. F.; Anna, S. L. Microfluidic Methods for Generating Continuous Droplet Streams. *Journal of Physics D : Applied Physics* **2007**, *40*, R319.
- [30] Agresti, J. J.; Antipov, E.; Abate, A. R.; Ahn, K.; Rowat, A. C.; Baret, J.-C.; Marquez, M.; Klibanov, A. M.; Griffiths, A. D.; Weitz, D. A. Ultrahigh-Throughput Screening in Drop-Based Microfluidics for Directed Evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 4004–4009.
- [31] Guo, M. T.; Rotem, A.; Heyman, J. A.; Weitz, D. A. Droplet Microfluidics for High-Throughput Biological Assays. *Lab on a Chip* **2012**, *12*, 2146–2155.
- [32] Abate A. R.,; Weitz D. A., High-Order Multiple Emulsions Formed in Poly(Dimethylsiloxane) Microfluidics. *Small* **2009**, *5*, 2030–2032.
- [33] Engl, W.; Backov, R.; Panizza, P. Controlled Production of Emulsions and Particles by Milli- and Microfluidic Techniques. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2008**, *13*, 206–216.
- [34] Dreyfus, R.; Tabeling, P.; Willaime, H. Ordered and Disordered Patterns in Two-Phase Flows in Microchannels. *Physical Review Letters* **2003**, *90*, 144505.
- [35] Zhi Chong, Z.; Hwa Tan, S.; M. Gañán-Calvo, A.; Beng Tor, S.; Hiang Loh, N.; Nguyen, N.-T. Active Droplet Generation in Microfluidics. *Lab on a Chip* **2016**, *16*, 35–58.
- [36] Cramer, C.; Fischer, P.; Windhab, E. J. Drop Formation in a Co-Flowing Ambient Fluid. *Chemical Engineering Science* **2004**, *59*, 3045–3058.
- [37] Thorsen, T.; Roberts, R. W.; Arnold, F. H.; Quake, S. R. Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device. *Physical Review Letters* **2001**, *86*, 4163–4166.
- [38] Anna, S. L.; Bontoux, N.; Stone, H. A. Formation of Dispersions Using “Flow Focusing” in Microchannels. *Applied Physics Letters* **2003**, *82*, 364–366.

- [39] Abate, A. R.; Krummel, A. T.; Lee, D.; Marquez, M.; Holtze, C.; Weitz, D. A. Photoreactive Coating for High-Contrast Spatial Patterning of Microfluidic Device Wettability. *Lab on a Chip* **2008**, *8*, 2157–2160.
- [40] Kim, S. C.; Sukovich, D. J.; Abate, A. R. Patterning Microfluidic Device Wettability with Spatially-Controlled Plasma Oxidation. *Lab on a Chip* **2015**, *15*, 3163–3169.
- [41] Bauer, W.-A. C.; Fischlechner, M.; Abell, C.; Huck, W. T. S. Hydrophilic PDMS Microchannels for High-Throughput Formation of Oil-in-Water Microdroplets and Water-in-Oil-in-Water Double Emulsions. *Lab on a Chip* **2010**, *10*, 1814–1819.
- [42] Li, S.; Gong, X.; Nally, C. S. M.; Zeng, M.; Gaule, T.; Anduix-Canto, C.; Kulak, A. N.; Bawazer, L. A.; McPherson, M. J.; Meldrum, F. C. Rapid Preparation of Highly Reliable PDMS Double Emulsion Microfluidic Devices. *RSC Advances* **2016**, *6*, 25927–25933.
- [43] Panizza, P.; Engl, W.; Hany, C.; Backov, R. Controlled Production of Hierarchically Organized Large Emulsions and Particles Using Assemblies on Line of Co-Axial Flow Devices. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, *312*, 24–31.
- [44] Okushima, S.; Nisisako, T.; Torii, T.; Higuchi, T. Controlled Production of Monodisperse Double Emulsions by Two-Step Droplet Breakup in Microfluidic Devices. *Langmuir* **2004**, *20*, 9905–9908.
- [45] Tóth, A.; Bertóti, I.; Blazsó, M.; Bánhegyi, G.; Bogнар, A.; Szaplanczay, P. Oxidative Damage and Recovery of Silicone Rubber Surfaces. I. X-Ray Photoelectron Spectroscopic Study. *Journal of Applied Polymer Science* **1994**, *52*, 1293–1307.
- [46] Dou Yue-Hua.; Bao Ning.; Xu Jing-Juan.; Chen Hong-Yuan, A Dynamically Modified Microfluidic Poly(Dimethylsiloxane) Chip with Electrochemical Detection for Biological Analysis. *ELECTROPHORESIS* **2002**, *23*, 3558–3566.
- [47] Hu, S.; Ren, X.; Bachman, M.; Sims, C. E.; Li, G. P.; Allbritton, N. L. Surface-Directed, Graft Polymerization within Microfluidic Channels. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 1865–1870.
- [48] Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies : Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232–1237.
- [49] Chang, F.-C.; Su, Y.-C. Controlled Double Emulsification Utilizing 3D PDMS Microchannels. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2008**, *18*, 065018.
- [50] Rotem, A.; Abate, A. R.; Utada, A. S.; Steijn, V. V.; Weitz, D. A. Drop Formation in Non-Planar Microfluidic Devices. *Lab on a Chip* **2012**, *12*, 4263–4268.
- [51] Sarrazin, B.; Brossard, R.; Guenoun, P.; Malloggi, F. Investigation of PDMS Based Bi-Layer Elasticity via Interpretation of Apparent Young's Modulus. *Soft Matter* **2016**, *12*, 2200–2207.
- [52] Bancroft, W. D. The Theory of Emulsification, V. *The Journal of Physical Chemistry* **1912**, *17*, 501–519.
- [53] Nisisako, T.; Okushima, S.; Torii, T. Controlled Formulation of Monodisperse Double Emulsions in a Multiple-Phase Microfluidic System. *Soft Matter* **2005**, *1*, 23–27.
- [54] Wehking, J. D.; Gabany, M.; Chew, L.; Kumar, R. Effects of Viscosity, Interfacial Tension, and Flow Geometry on Droplet Formation in a Microfluidic T-Junction. *Microfluidics and Nanofluidics* **2014**, *16*, 441–453.
- [55] Lutz, R.; Aserin, A.; Wicker, L.; Garti, N. Release of Electrolytes from W/O/W Double Emulsions Stabilized by a Soluble Complex of Modified Pectin and Whey Protein Isolate. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **2009**, *74*, 178–185.
- [56] Bonnet, M.; Cansell, M.; Berkaoui, A.; Ropers, M. H.; Anton, M.; Leal-Calderon, F. Release Rate Profiles of Magnesium from Multiple W/O/W Emulsions. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 92–101.
- [57] Jiménez-Alvarado, R.; Beristain, C. I.; Medina-Torres, L.; Román-Guerrero, A.; Vernon-Carter, E. J. Ferrous Bisglycinate Content and Release in W1/O/W2 Multiple Emulsions Stabilized by Protein-polysaccharide Complexes. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 2425–2433.

# Chapitre VI

## Discussion

Dans ce travail, nous avons étudié les différents types d'émulsions pouvant être stabilisées par une famille de copolymères polydiméthylsiloxane-*b*-(polyméthacrylate de diméthylaminoéthyle) (PDMS-*b*-PDMAEMA), dont la biocompatibilité a été démontrée grâce à des tests de cytotoxicité sur des cellules d'intestin. Ces copolymères sont synthétisés en deux étapes à partir d'un bloc PDMS hydroxylé commercial sur lequel est polymérisé par ATRP le second bloc de PDMAEMA. Ils sont amphiphiles et permettent de stabiliser des émulsions doubles en une unique étape d'émulsification. Nous avons présenté les résultats obtenus pour trois copolymères différents et avec deux huiles, le myristate d'isopropyle et le Miglyol<sup>®</sup> 812, couramment utilisées en formulation cosmétique ou pharmaceutique.

Trois types d'émulsions ont pu être formés par voie mécanique (Ultra Turrax<sup>®</sup>) avec ce système, en fonction des pH et concentrations en chlorure de sodium de la phase aqueuse : directe H/E, multiple E/H/E et inverse E/H, les émulsions simples étant formées de façon assez marginale. Nous avons pu rationaliser les types d'émulsions obtenus en nous appuyant sur les travaux de Lucie Besnard et Marine Protat avec leur copolymère PS<sub>40</sub>-*b*-P(S<sub>21</sub>-*stat*-DMAEMA<sub>68</sub>)<sup>1,2</sup>. La formation dans la plupart des cas d'émulsions H/E à bas pH et concentrations en NaCl, E/H à pH et concentrations en NaCl élevés, et E/H/E dans des conditions intermédiaires peut ainsi être reliée à la conformation du polymère à l'interface et donc à sa courbure spontanée. De plus, les émulsions multiples sont formées dans des conditions où les tensions interfaciales sont basses (<2 mN/m), et où des objets de type micelles ont été observés dans les deux phases, sans que la répartition exacte du copolymère entre les deux phases n'ait pu être estimée.

De façon intéressante, très peu d'émulsions directes sont stables avec notre système, et aucune à bas pH et faibles concentrations en sel, qui sont pourtant les conditions les plus favorables pour former ce type d'émulsions, puisque le polymère, très chargé, aura *a priori* une courbure spontanée tournée vers l'huile. Ceci n'a été observé que rarement dans la littérature : en effet, pour les rares systèmes sensibles au pH permettant la formation en une étape d'émulsions doubles, il existe généralement une zone (à bas pH<sup>2,3</sup> ou à haut pH<sup>4</sup> suivant la nature du stabilisant) dans laquelle des émulsions directes sont obtenues. Cependant, ce phénomène a été observé par l'équipe de Zhu<sup>5</sup>, dont le système permet la stabilisation d'émulsions E/H/E pour des pH compris entre 4 et 6 et inverses pour des pH plus élevés, les émulsions formées à des pH inférieurs à 4 étant instables.

Il serait intéressant de voir si une variation des proportions huile/eau utilisées pour réaliser nos émulsions pourrait avoir une influence sur ce phénomène. En effet, bon nombre de systèmes<sup>6-8</sup> permettent d'obtenir différents types d'émulsions lorsque les fractions volumiques de chaque phase sont modifiées.

La possibilité ou non de former des émulsions doubles stables aux temps longs (plusieurs mois) en fonction de l'huile et du copolymère utilisés est résumée dans la première partie du TABLEAU VI.1.

Copolymère	Huile	Molécule encapsulée	Émulsions doubles stables ?
COPO 60b50	Miglyol <sup>®</sup> 812	/	oui (8<pH<12)
COPO 60b265	Miglyol <sup>®</sup> 812	/	oui (8<pH<12)
COPO 104b89	Miglyol <sup>®</sup> 812	/	oui (8<pH<12)
COPO 60b50	Myristate d'isopropyle	/	oui (8<pH<12)
COPO 60b265	Myristate d'isopropyle	/	non
COPO 104b89	Myristate d'isopropyle	/	oui (mais seulement à pH~12)
COPO 60b50	Maisine <sup>®</sup> CC	/	non
COPO 60b50	Miglyol <sup>®</sup> 812	Saccharose	oui
COPO 60b50	Miglyol <sup>®</sup> 812	Mannane	oui mais évoluent vers des directes en 3 mois
COPO 60b50	Miglyol <sup>®</sup> 812	Catéchine	oui ([NaCl]<0,6 M)
COPO 60b50	Myristate d'isopropyle	Catéchine	non
COPO 60b50	Miglyol <sup>®</sup> 812	Curcumine (+ Catéchine)	oui mais curcumine non dissoute
COPO 60b50	Miglyol <sup>®</sup> 812 + Maisine <sup>®</sup> CC	Curcumine	non mais curcumine dissoute

TABLEAU VI.1 – Récapitulatif des systèmes copolymères / huile / molécule encapsulée permettant l'obtention d'émulsions doubles dans les conditions étudiées.

Ce tableau montre bien que le choix du copolymère et de l'huile sera déterminant pour la capacité du système à former des émulsions doubles stables. Des émulsions doubles ont pu être obtenues avec le Miglyol<sup>®</sup> 812 pour tous les copolymères étudiés. Cela n'a pas été le cas avec le myristate d'isopropyle pour lequel des émulsions majoritairement inverses ont été obtenues en présence du COPO 104b89, et majoritairement instables en présence du COPO 60b265.

La conformation du copolymère à l'interface dépend donc beaucoup des huiles utilisées, et des interactions qui existent entre ces huiles et le copolymère. En particulier, nous supposons que la présence d'acides gras libres dans les huiles pourrait expliquer les différences de conformation du copolymère et les variations du type d'émulsion qui en découlent.

Nous avons vu que le myristate d'isopropyle contient plus d'acide gras libres que le Miglyol<sup>®</sup> 812. Dans le cas des copolymères à longs blocs hydrophiles, la création de liaisons hydrogènes entre ces acides gras et certaines unités DMAEMA pourraient limiter l'extension de la chaîne en

phase aqueuse, ce d'autant plus que les liaisons sont nombreuses. Un schéma de l'effet de ces interactions est représenté aux FIGURES VI.1(a) et (b). En présence de Miglyol<sup>®</sup> 812, la chaîne conserverait une extension similaire dans chaque phase grâce à ces points d'ancrage. En revanche, l'extension en phase aqueuse serait plus restreinte avec le myristate d'isopropyle qui créera plus de liaisons hydrogènes avec la chaîne à l'interface, d'où la formation d'émulsions inverses.

Dans le cas de chaînes hydrophiles courtes cependant, comme dans le cas du COPO 60b50, la formation de ces liaisons contraindrait trop la chaîne, il est donc plus favorable qu'elle reste étendue en phase aqueuse : le copolymère étant à peu près symétrique, l'extension de la chaîne dans chaque phase sera semblable et des émulsions doubles seront obtenues, quelle que soit l'huile.

La Maisine<sup>®</sup> CC est quant à elle composée d'un mélange de mono, di et triglycérides d'acide linoléique. Les mono et diglycérides, qui composent l'huile à plus de 70% d'après la fiche technique du fabricant, sont porteurs de fonctions hydroxyles, qui peuvent interagir de façon importante avec le copolymère par des liaisons hydrogènes. La conformation du copolymère en sera probablement grandement modifiée, cette fois-ci même dans le cas d'une chaîne hydrophile courte. Cela expliquerait que des émulsions instables soient obtenues dans cette huile même avec le COPO 60b50. Le comportement de la chaîne dans ces conditions est illustré à la FIGURE VI.1(c).

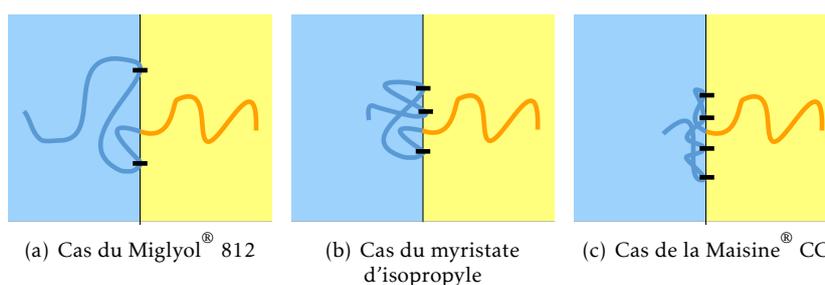


FIGURE VI.1 – Représentation schématique des liaisons hydrogènes (représentées par des rectangles noirs) pouvant exister entre le bloc PDMAEMA et les différentes huiles.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'ajout d'une molécule neutre en phase aqueuse ou en phase huile, et à son effet sur les émulsions formées.

Nous avons obtenu des émulsions E/H/E chargées en saccharose, en mannane ou en catéchine avec le Miglyol<sup>®</sup> 812. Les émulsions encapsulant du mannane sont assez peu stables et évoluent vers des émulsions directes. Les émulsions chargées en catéchine sont instables si elles contiennent une quantité de sel trop importante, et seules des émulsions inverses ont été obtenues avec cette molécule et le myristate d'isopropyle.

Nous avons également essayé d'encapsuler une molécule hydrophobe, la curcumine, en phase huile. Nous avons vu que la solubilisation correcte de cette molécule au sein de la phase huile dépendait de l'huile utilisée, la formation d'agrégats étant observées avec le Miglyol<sup>®</sup> 812, mais pas avec la Maisine<sup>®</sup> CC. Toutefois à ce jour nous n'avons pas obtenu d'émulsions E/H/E stables avec la Maisine<sup>®</sup> CC pure ou un mélange Maisine<sup>®</sup> CC/Miglyol<sup>®</sup> 812 en diverses proportions.

Ces observations, dont les interprétations sont détaillées au sein des chapitres dédiées, confirment le rôle important que jouent les interactions entre le copolymère et son environnement (molécule encapsulée, impuretés des huiles) sur la conformation adoptée par la chaîne et sur le type

d'émulsion formé.

Tous les couples copolymère/huile testés, en présence d'une molécule cargo en phase huile ou en phase aqueuse, sont résumés dans la deuxième partie du TABLEAU VI.1.

La formation par voie microfluidique d'émulsions stabilisées par le PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub> a également été étudiée. Nous avons travaillé exclusivement avec le myristate d'isopropyle, moins visqueux que le Miglyol<sup>®</sup> 812, lors de cette étude. La formation d'émulsions doubles a nécessité le développement d'une technique spécifique pour concilier des parties hydrophiles et hydrophobes au sein d'une même puce microfluidique. Le pH de la phase aqueuse externe est un paramètre déterminant dans la capacité du système à former des émulsions doubles : si celui-ci est bas, des émulsions doubles peuvent être formées, tandis que cela est impossible à des pH autour de 8. Ce phénomène est probablement lié à l'adsorption sur les parois des canaux du copolymère contenu en phase aqueuse externe si celle-ci est à bas pH.

Des émulsions doubles ne démixant pas sur plus de deux ans ont pu être obtenues à pH initial de 3 en l'absence de sel. En présence de catéchine, et dans les mêmes conditions de pH et de concentration en NaCl, des émulsions E/H/E ont pu être stabilisées sur plusieurs mois. Au même pH mais en présence de NaCl, la reproductibilité est malheureusement assez mauvaise et on obtient dans la plupart des cas des émulsions dont les gouttelettes internes sont très peu stables et coalescent rapidement avec la phase aqueuse externe.

En conclusion, la formation d'émulsions doubles stabilisées par nos copolymères PDMS-*b*-PDMAEMA est relativement facile par voie mécanique, puisqu'elle est possible sur une large gamme de pH et de concentrations en sel, pour différents polymères et différentes huiles. L'ajout d'une molécule hydrophile en phase aqueuse n'empêche généralement pas la formation d'émulsions multiples. En revanche, ces émulsions sont beaucoup plus complexes à obtenir par voie microfluidique où seules des conditions de pH et de concentrations en NaCl précises ont conduit à l'obtention de gouttes multiples. Des émulsions directes stables sont en revanche facilement obtenues par cette voie, alors qu'elles ont été très rarement observées par voie mécanique.

Après nous être intéressés à la formation des émulsions, nous avons étudié le relargage de molécules encapsulées dans les émulsions formées par voie mécanique. Pour cela, et comme nos émulsions sont obtenues en une seule étape d'émulsification, il est nécessaire de passer par une étape de lavage des émulsions pour s'affranchir de la présence des cargos en phase aqueuse externe, de façon à pouvoir suivre leur libération après déstabilisation. Nous avons constaté que nos émulsions sont assez robustes, puisqu'il a été possible de les dialyser contre une phase aqueuse sans cargo jusqu'à ce que la concentration de cargo en phase aqueuse externe de l'émulsion soit nulle, ce sans modification majeure de la morphologie des émulsions. Nous avons aussi vérifié lors de nos études de cytotoxicité que la dilution des émulsions dans du milieu de culture ne perturbait pas leur morphologie. Cette robustesse sera utile dans l'optique d'applications de notre système pour la voie orale : dans ce cas, l'émulsion doit rester stable jusqu'à dans l'estomac malgré sa dilution dans le liquide digestif.

Pour les trois molécules testées (saccharose, mannane et catéchine), il a été possible d'obtenir une émulsion pour laquelle la molécule d'intérêt se trouvait uniquement en phase aqueuse interne, après trois ou quatre étapes de dialyse.

Les émulsions chargées en saccharose ou en catéchine ont ensuite été déstabilisées par une dialyse avec une phase aqueuse à pH 1. Dans tous les cas, une certaine quantité de cargo a pu être libérée à cette étape sous l'action du pH, donc de façon contrôlée. Une modification du spectre UV-visible de la catéchine après relargage est observée (la concentration en saccharose étant mesurée de façon indirecte, nous n'avons pas été confronté à ce problème pour cette molécule). En outre, le taux d'encapsulation déduit de ces mesures nous paraît plus bas qu'attendu (toujours inférieur à 4%).

Nous supposons que ce relargage limité est lié à des interactions cargo/polymère, probablement *via* des liaisons hydrogènes existant à pH élevé, et étant en partie rompues lors de la diminution du pH. Une baisse de pH conduit en effet à l'augmentation du taux de charge de la chaîne et donc à la diminution du nombre de sites disponibles pour former des liaisons H. Il a été montré dans la littérature que les deux molécules étaient capables de former ce type de liaisons grâce à leurs fonctions hydroxyles<sup>11-15</sup>. Lors de la déstabilisation, il y aurait donc libération conjointe de la molécule présente en phase aqueuse interne, et de d'une partie de la molécule adsorbée aux chaînes polymères en phase aqueuse externe. Cela permettrait d'expliquer le pouvoir antioxydant étonnamment élevé mesuré pour la catéchine après déstabilisation de l'émulsion. La modification du spectre UV/visible serait alors due à la détection de complexes copolymère/catéchine. Cependant, nous avons vu au Chapitre IV que les quantités de catéchine récupérées au cours des différents lavages ne sont pas cohérentes avec l'écart important obtenu pour les pouvoirs antioxydants avant et après déstabilisation.

Pour tenter de mieux comprendre, il faudrait quantifier les concentrations en catéchine dans les échantillons utilisés pour la mesure de pouvoir antioxydant avant et après déstabilisation et les mettre en regard des valeurs obtenues lors des lavages.

Les résultats d'encapsulation et de relargage obtenus avec la catéchine en microfluidique sont également intéressants.

Nous avons tout d'abord observé la fuite d'une proportion importante de la catéchine présente en phase aqueuse interne dès les premiers instants d'existence de l'émulsion. Cette fuite, probablement liée au déséquilibre osmotique, n'existe pas pour les émulsions formées par voie mécanique où la molécule est présente dans les deux phases aqueuses. En microfluidique, l'ajout de NaCl en phases aqueuses externe et interne permettrait de rendre négligeable le déséquilibre osmotique induit par la catéchine interne et ainsi d'éviter la fuite. Il est donc dommage que les émulsions formulées en présence de sel n'ait pas pu être obtenues de façon reproductible.

Lorsque l'émulsion est déstabilisée juste après formation, la totalité de la catéchine introduite est récupérée. En revanche, lorsque l'émulsion est déstabilisée après un mois de vieillissement, on constate que la déstabilisation n'est pas totale et qu'une sorte de solide est formée au sein des gouttelettes d'eau.

Pour comprendre ce qui se passe, il faut considérer plus précisément la façon dont s'effectue la déstabilisation de nos émulsions. À l'origine de la déstabilisation se trouve une diminution du pH, soit l'apport en phase aqueuse externe d'une grande quantité de protons, engendrant un déséquilibre osmotique important. Deux mécanismes évoqués au Chapitre III sont possibles pour résoudre ce déséquilibre :

- les protons sont transportés par les micelles inverses de la phase aqueuse externe vers les gouttelettes d'eau internes (mécanisme n°1);
- l'eau interne est transportée par les micelles inverses de la phase aqueuse interne vers la phase aqueuse externe (mécanisme n°2).

*A priori*, le mécanisme n°2 semble plus favorable car la formation de micelles dans l'huile à bas pH est en contradiction avec la courbure spontanée du polymère. Ce mécanisme serait en outre à même d'expliquer les résultats observés lors de la déstabilisation en microfluidique : la catéchine, liée au copolymère par liaisons hydrogènes en phase aqueuse interne, ne peut pas fuir avec l'eau. Au bout d'un moment, la quantité d'eau est trop faible pour solubiliser la catéchine liée au copolymère et un gel physique est formé. Il est également possible qu'une partie de la catéchine soit dégradée et oligomérisée, ce qui faciliterait encore plus la formation d'un gel.

Nous n'avons pas constaté ce genre de difficultés pour la déstabilisation d'émulsions chargées en catéchine formées par voie mécanique avec le Miglyol<sup>®</sup> 812. Cela peut s'expliquer par l'une ou l'autre de ces hypothèses :

- L'observation des gouttes de l'émulsion se fait en microscopie confocale, et non en microscopie optique. La morphologie des émulsions est également très différente : les globules d'huile formés par voie mécanique contiennent une quantité importante de petites gouttes internes, au contraire de la microfluidique où on a une unique goutte de taille importante. Il est donc possible que le même phénomène existe mais ne soit pas visible car les gels qui en résultent sont très petits.
- Dans les phases huiles Miglyol<sup>®</sup> 812, de très gros objets ont été observés en DLS après mise au contact avec une phase aqueuse, de diamètres de l'ordre de 500 à 2000 nm. Même si les tailles de ces objets sont à considérer avec précaution, on peut supposer que de gros objets gonflés d'eau subsistent en phase huile après émulsification. La taille du copolymère est alors complètement négligeable devant la taille de ces objets. La courbure défavorable limitant *a priori* le mécanisme n°1 va donc jouer un rôle beaucoup moins important, et le transfert de protons de la phase aqueuse externe vers la phase aqueuse interne sera possible. La déstabilisation pourra donc être gouvernée par la coalescence et la formation du gel n'est pas observée.
- La quantité de copolymère qui transfère en phase aqueuse à partir du Miglyol<sup>®</sup> 812 est plus faible qu'à partir du myristate d'isopropyle. On a donc moins de copolymère disponible en phase aqueuse interne pour former un gel avec la catéchine, et le relargage complet peut être observé.

Pour confirmer ou infirmer nos hypothèses concernant les mécanismes de déstabilisation, il serait intéressant de réaliser des expériences de déstabilisation par dialyse d'une émulsion double formulée avec le myristate à un pH de 3 (pour avoir une cinétique de déstabilisation suffisamment lente pour être observée), afin de comparer l'évolution des gouttelettes au cours de la déstabilisation pour chacune des deux huiles. Dans le cas où le mécanisme principal est la coalescence, on devrait avoir diminution du nombre de gouttelettes par globule, tandis que pour l'hypothèse de la fuite de la phase aqueuse interne vers l'extérieur, une diminution du diamètre moyen des gouttelettes devrait être observée. La réponse apportée par cette expérience ne sera cependant que partielle, puisqu'il faudrait la réaliser en présence de catéchine et qu'il n'est pas

possible d'obtenir des émulsions doubles avec le myristate d'isopropyle en présence de cette molécule.

En outre, il faudrait faire des expériences de DLS quantitatives sur les phases aqueuses et huiles, permettant de remonter à une estimation de la concentration des objets dans chaque phase en fonction du pH et de la concentration en NaCl. Ainsi, nous pourrions nous assurer du fait que la concentration en micelles en phase huile à pH 1 est plus faible qu'à pH 8 pour le myristate d'isopropyle. Nous pourrions également comparer la concentration des micelles présentes en phase aqueuse après mise au contact avec chacune des huiles, afin de voir si le passage du copolymère en phase aqueuse est moins important avec le Miglyol<sup>®</sup> 812.

Enfin, de nouvelles études sont nécessaires avec les émulsions formées en microfluidique, notamment pour voir à partir de quel moment est observée la formation de ce solide lors de la déstabilisation.

Les différents résultats obtenus au cours de ce travail montrent l'importance des interactions entre le copolymère et son environnement, à la fois dans la formation et la stabilisation d'un type d'émulsion plutôt qu'un autre, mais aussi dans la libération efficace de molécules encapsulées dans des émulsions stabilisées par ces copolymères. Globalement, le Miglyol<sup>®</sup> 812 semble être une huile particulièrement favorable à la formation d'émulsions doubles puisque dans toutes les conditions étudiées, seul ce type d'émulsions a pu être stabilisé.

Au regard de ces résultats, la microfluidique, malgré ses nombreux avantages, ne semble pas la méthode optimale pour la formation d'émulsions doubles chargées avec une molécule d'intérêt. Tout d'abord nous avons pu voir qu'il était difficile d'obtenir des émulsions de façon reproductible par cette voie. De plus, la diffusion lente du polymère vers les interfaces semble favoriser la fuite d'une importante proportion de la catéchine introduite en phase aqueuse interne vers la phase aqueuse externe dès les premiers instants d'existence de l'émulsion. Pour éviter cette fuite, il serait intéressant d'essayer d'équilibrer les pressions osmotiques entre les phases aqueuses internes et externes, par exemple en utilisant une phase aqueuse externe contenant elle aussi de la catéchine en concentration identique, mais on perdrait alors tout l'intérêt de la microfluidique qui permet justement d'avoir le composé d'intérêt exclusivement en phase aqueuse interne.

## Bibliographie

- [1] Besnard, L. ; Marchal, F. ; Paredes, J. F. ; Daillant, J. ; Pantoustier, N. ; Perrin, P. ; Guenoun, P. Multiple Emulsions Controlled by Stimuli-Responsive Polymers. *Advanced Materials* **2013**, *25*, 2844–2848.
- [2] Besnard, L. ; Protat, M. ; Malloggi, F. ; Daillant, J. ; Cousin, F. ; Pantoustier, N. ; Guenoun, P. ; Perrin, P. Breaking of the Bancroft Rule for Multiple Emulsions Stabilized by a Single Stimulable Polymer. *Soft Matter* **2014**, *10*, 7073–7087.
- [3] Chen, Q. ; Deng, X. ; An, Z. pH-Induced Inversion of Water-in-Oil Emulsions to Oil-in-Water High Internal Phase Emulsions (HIPEs) Using Core Cross-Linked Star (CCS) Polymer as Interfacial Stabilizer. *Macromolecular Rapid Communications* **2014**, *35*, 1148–1152.
- [4] Tu, F. ; Lee, D. One-Step Encapsulation and Triggered Release Based on Janus Particle-Stabilized Multiple Emulsions. *Chemical Communications* **2014**, *50*, 15549–15552.
- [5] Zhu, Y. ; Sun, J. ; Yi, C. ; Wei, W. ; Liu, X. One-Step Formation of Multiple Pickering Emulsions Stabilized by Self-Assembled Poly(Dodecyl Acrylate-Co-Acrylic Acid) Nanoparticles. *Soft Matter* **2016**, *12*, 7577–7584.
- [6] Binks, B. P. ; Rodrigues, J. A. Types of Phase Inversion of Silica Particle Stabilized Emulsions Containing Triglyceride Oil. *Langmuir* **2003**, *19*, 4905–4912.
- [7] Hong, L. ; Sun, G. ; Cai, J. ; Ngai, T. One-Step Formation of W/O/W Multiple Emulsions Stabilized by Single Amphiphilic Block Copolymers. *Langmuir* **2012**, *28*, 2332–2336.
- [8] Zhang, Y. ; Gou, J. ; Sun, F. ; Geng, S. ; Hu, X. ; Zhang, K. ; Lin, X. ; Xiao, W. ; Tang, X. Impact of Electrolytes on Double Emulsion Systems (W/O/W) Stabilized by an Amphiphilic Block Copolymer. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **2014**, *122*, 368–374.
- [9] Protat, M. ; Bodin, N. ; Gobeaux, F. ; Malloggi, F. ; Daillant, J. ; Pantoustier, N. ; Guenoun, P. ; Perrin, P. Biocompatible Stimuli-Responsive W/O/W Multiple Emulsions Prepared by One-Step Mixing with a Single Diblock Copolymer Emulsifier. *Langmuir* **2016**, *32*, 10912–10919.
- [10] Protat, M. Formation d'émulsions multiples stimulables en une seule étape d'émulsification : effet du sel et évolution vers des architectures biocompatibles. Ph.D. thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, 2016.
- [11] Bock, K. ; Lemieux, R. U. The Conformational Properties of Sucrose in Aqueous Solution : Intramolecular Hydrogen-Bonding. *Carbohydrate Research* **1982**, *100*, 63–74.
- [12] Allison, S. D. ; Chang, B. ; Randolph, T. W. ; Carpenter, J. F. Hydrogen Bonding between Sugar and Protein Is Responsible for Inhibition of Dehydration-Induced Protein Unfolding. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1999**, *365*, 289–298.
- [13] Taylor, L. S. ; Zografi, G. Sugar–polymer Hydrogen Bond Interactions in Lyophilized Amorphous Mixtures. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2000**, *87*, 1615–1621.
- [14] Li, J. ; Zhu, B. ; He, Y. ; Inoue, Y. Thermal and Infrared Spectroscopic Studies on Hydrogen-Bonding Interaction between Poly(3-Hydroxybutyrate) and Catechin. *Polymer Journal* **2003**, *35*, 384–392.
- [15] Zhu, B. ; Li, J. ; He, Y. ; Yamane, H. ; Kimura, Y. ; Nishida, H. ; Inoue, Y. Effect of Steric Hindrance on Hydrogen-Bonding Interaction between Polyesters and Natural Polyphenol Catechin. *Journal of Applied Polymer Science* **2004**, *91*, 3565–3573.

# Conclusion et perspectives

Nous avons étudié dans cette thèse un système très prometteur pour l'encapsulation et le relargage contrôlé de principes actifs. Depuis quelques dizaines d'années, les émulsions doubles sont étudiées pour cette application mais dans la plupart des systèmes existants, elles sont formées de façon assez complexe, en deux étapes et avec plusieurs émulsifiants. Le mécanisme de relargage proposé *in vitro* est en outre généralement passif : il se fait progressivement dès les premiers instants après formation de l'émulsion, par diffusion de la molécule encapsulée au travers de la phase huile, ou bien par coalescence des gouttelettes internes avec la phase aqueuse externe. *In vivo*, pour des émulsions administrées par voie orale, d'autres mécanismes tels que la digestion des huiles par les lipases intestinales ou la dilution de l'émulsion dans le liquide digestif peuvent accélérer la libération des espèces encapsulées. Toutefois une bonne partie aura été libérée lors du stockage.

Le système présenté ici permet la formation d'émulsions doubles stables sur plus de deux ans, en une seule étape et avec un unique émulsifiant, le copolymère dibloc amphiphile PDMS-*b*-PDMAEMA. Les huiles utilisées sont des huiles typiques des industries cosmétiques et pharmaceutiques, le myristate d'isopropyle et le Miglyol<sup>®</sup> 812. La biocompatibilité de ce système a été établie par des études de cytotoxicité réalisées sur une coculture cellulaire mimant la paroi intestinale.

Outre la simplicité de formation et de formulation des émulsions doubles, qui sont obtenues dans une large gamme de pH et de concentrations en NaCl, notre système présente l'intérêt d'être stimulant en pH : la diminution du pH déstabilise les émulsions doubles en émulsions directes, libérant ainsi le composé encapsulé. L'inconvénient apparent de la formation des émulsions en une étape, qui oblige à avoir le composé d'intérêt en phases aqueuses interne et externe, semble en fait plutôt être un atout puisque cela évite la fuite vers l'extérieur de la molécule protégée en phase aqueuse interne. Contrairement aux systèmes couramment décrits dans la littérature, nous sommes donc en mesure d'encapsuler un composé sur plusieurs mois sans fuite de celui-ci ni déstabilisation de l'émulsion, et de le libérer sur commande au moment nécessaire.

Nous nous sommes principalement intéressés à l'encapsulation dans nos émulsions d'un antioxydant fragile extrait du thé vert, la catéchine. Des émulsions doubles chargées en catéchine ont pu être formées avec le Miglyol<sup>®</sup> 812, lavées pour s'affranchir de la présence de la molécule en phase aqueuse externe et pouvoir quantifier le relargage, puis déstabilisées. Une certaine quantité de catéchine a pu être libérée, cependant assez faible. En revanche, le pouvoir antioxydant de la catéchine formulée en émulsion double semble être préservé pendant des durées beaucoup plus longues que dans le cas de la catéchine libre.

Nous avons également considéré la formation de nos émulsions par voie microfluidique. Cette étude a permis de montrer que la microfluidique, malgré la maîtrise qu'elle peut offrir pour la formation des émulsions, n'est peut être pas un axe de recherche à poursuivre. Il est en effet difficile et coûteux en temps d'obtenir des émulsions stables par ce biais, et le principal avantage de la méthode, à savoir la présence de la molécule à encapsuler uniquement en phase interne, s'est révélé être plutôt un inconvénient conduisant à la fuite d'une bonne partie de la molécule depuis la phase aqueuse interne vers la phase aqueuse externe dès les premiers instants après formation. La voie mécanique permet l'obtention rapide d'un grand volume d'émulsion, elle paraît donc plus facile à envisager pour le développement d'applications à partir de notre système.

Deux axes principaux pourraient être suivis pour la poursuite de cette étude.

Premièrement, un gros travail de compréhension reste à effectuer sur notre système. Nous avons mis en évidence l'importance des interactions copolymère/huile et copolymère/molécule encapsulée sur la conformation du copolymère et le type d'émulsion qui en découle.

Nous n'avons rassemblé qu'une quantité d'informations restreinte sur la répartition du copolymère entre les deux phases en fonction de l'huile, de la longueur des chaînes, et éventuellement de la molécule à encapsuler, ainsi que sur la taille des objets présents dans chaque phase. Il faudrait poursuivre cette étude de façon plus systématique.

La réalisation de mesures de réflectivité de neutrons, quoique complexes avec ce système biocompatible, pourraient aussi donner des informations précieuses quant à la conformation du copolymère à l'interface dans différentes conditions.

Il faudrait enfin être capable de caractériser plus précisément les interactions pouvant exister entre le copolymère et la catéchine, par exemple en utilisant un homopolymère de PDMAEMA directement solubilisé en phase aqueuse avec la catéchine. Des mesures de spectroscopie infrarouge, UV-visible, de diffusion de la lumière et de pouvoir antioxydant pourrait nous donner des informations intéressantes, la difficulté étant de solubiliser correctement la catéchine dans ces échantillons (cf Annexe C).

En connaissant mieux notre système et les interactions susceptibles de se produire entre les différents éléments le constituant, nous serions peut être à même de développer une méthodologie pour déterminer si telle ou telle molécule pourrait être encapsulée au sein du système de façon efficace.

Le deuxième axe à suivre serait l'aspect beaucoup plus pratique de développement d'une application pour notre système. Les expériences de relargage réalisées *in vitro* dans des conditions assez éloignées de ce qui se passe réellement dans le corps lors de l'ingestion d'une substance mériteraient d'être réitérées dans un milieu plus représentatif de la réalité, en présence des enzymes et des sels constituant le milieu digestif. L'absorption ou non de la molécule de catéchine par les cellules intestinales pourrait alors être mesurée, et nous pourrions conclure sur les potentialités réelles de notre système.

# Annexes

## A Spectre RMN $^1\text{H}$ de PDMS-OH

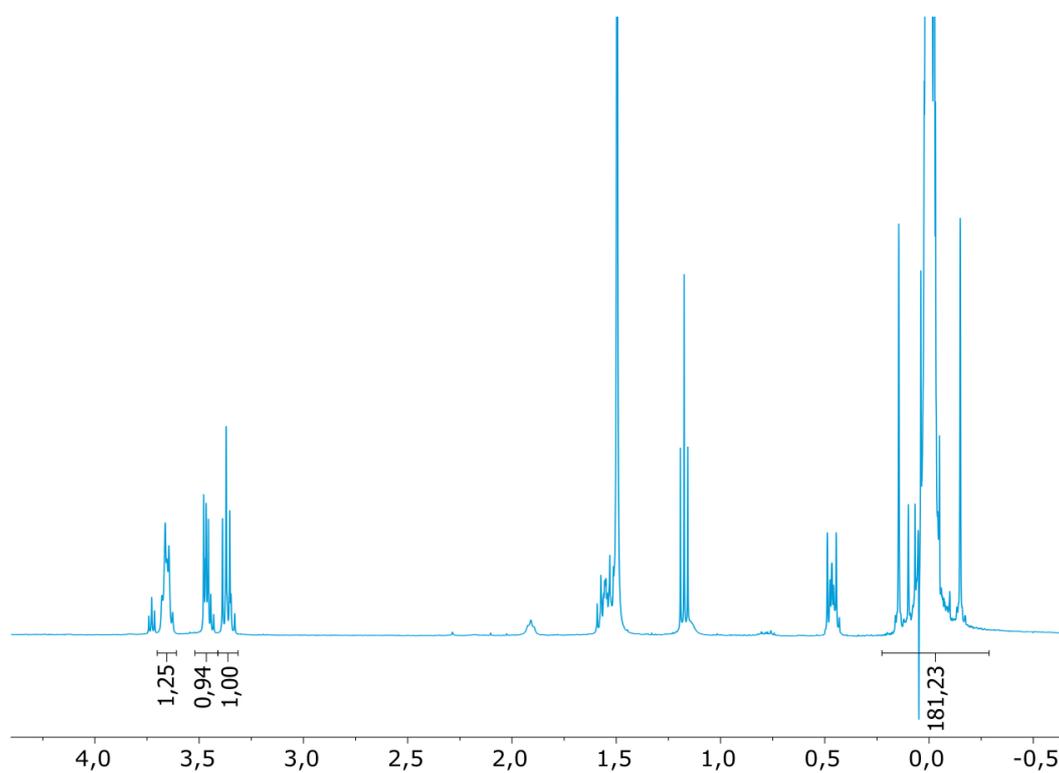


FIGURE 1 – Spectre RMN  $^1\text{H}$  dans le  $\text{CDCl}_3$  du composé commercial PDMS-OH utilisé pour la synthèse du macroamorceur PDMS-Br.

Le nombre  $n$  d'unités DMS de ce composé commercial est déterminé en faisant le rapport des intégrations du signal des protons  $d$  à 0 ppm ( $6n\text{H}$ ) et des signaux des protons  $a$ ,  $b$  et  $c$  entre 3 et 4 ppm ( $6\text{H}$ ). On trouve ici 57, valeur arrondie à 60 en faisant la moyenne des valeurs obtenues pour les différents spectres réalisés.

## B Étalonnages

Les différentes droites d'étalonnage utilisées dans ce manuscrit sont rassemblées ici.

### B.1 Droites d'étalonnage obtenues pour la catéchine

#### B.1.a Spectroscopie UV-visible et fluorimétrie

Ces mesures ont été effectuées par dilution dans l'eau pure d'une solution de catéchine à 1 mg/mL elle-même préparée dans l'eau pure.

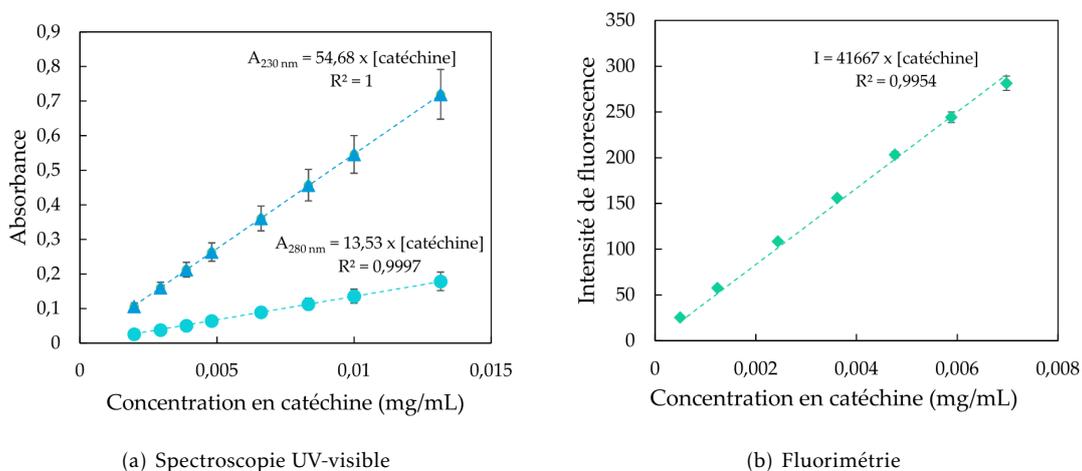


FIGURE 2 – Droites d'étalonnage obtenues pour la catéchine dans l'eau pure (a) en spectroscopie UV-visible, en relevant les maxima d'absorbance à  $\blacktriangle$  : 230 nm et  $\bullet$  : 280 nm, (b) en fluorescence en relevant les maxima à 314 nm (après excitation à 280 nm).

### B.1.b Chromatographie liquide

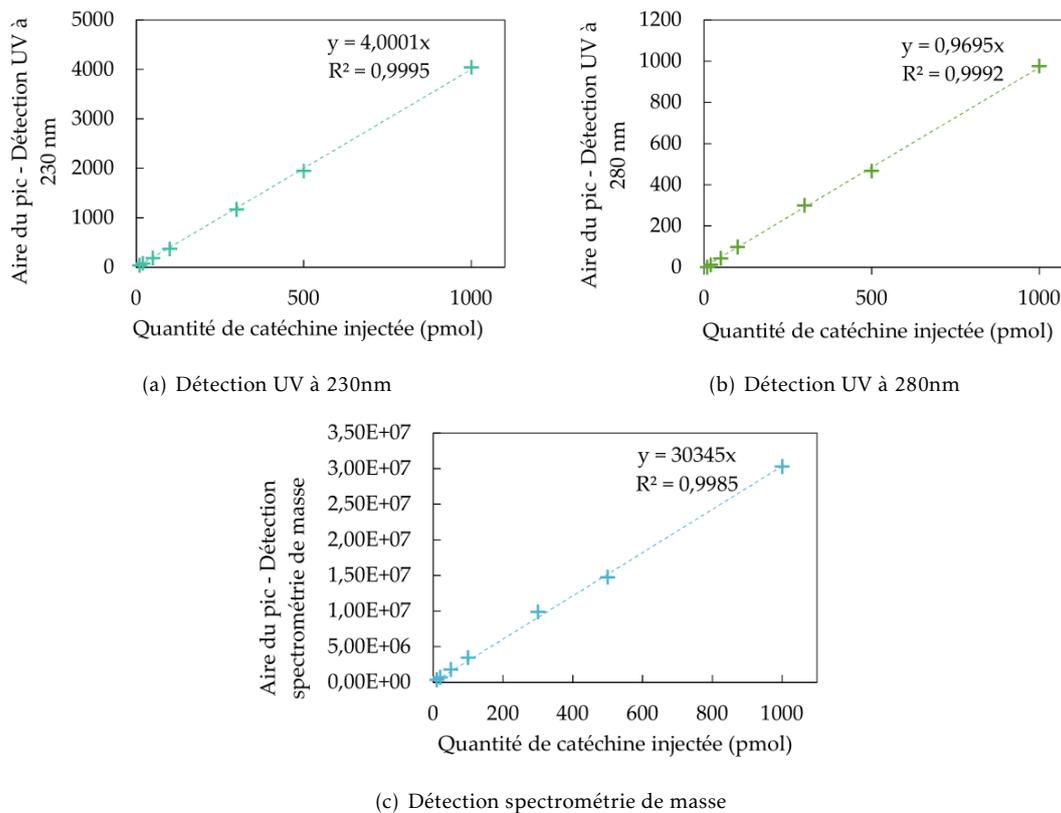


FIGURE 3 – Droites d'étalonnage obtenues pour la catéchine pour les différents types de détection.

### B.2 Droites d'étalonnage de la curcumine dans les différentes huiles

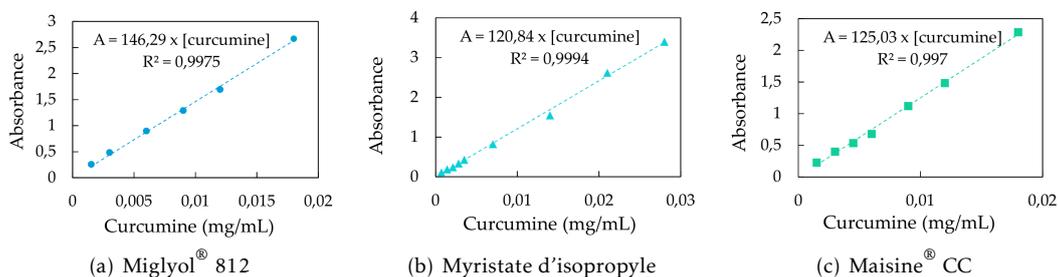


FIGURE 4 – Droites d'étalonnage obtenues en spectroscopie UV/visible en relevant les maxima à 420 nm pour la curcumine en solution dans les différentes huiles étudiées.

### B.3 Droite d'étalonnage obtenue pour le kit K-SURFG de détection du saccharose

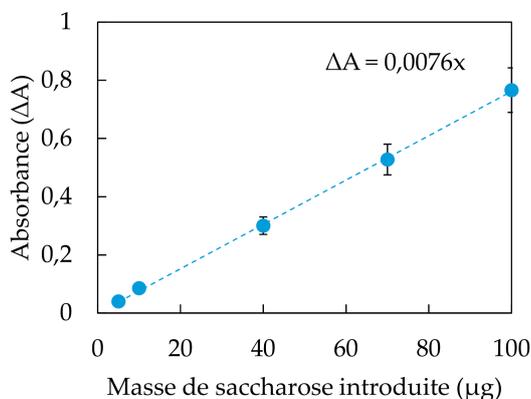


FIGURE 5 – Droite d'étalonnage réalisée à partir du kit de détection du saccharose K-SURFG.

### B.4 Droite d'étalonnage obtenue pour le mannane (méthode de détection de Plata)

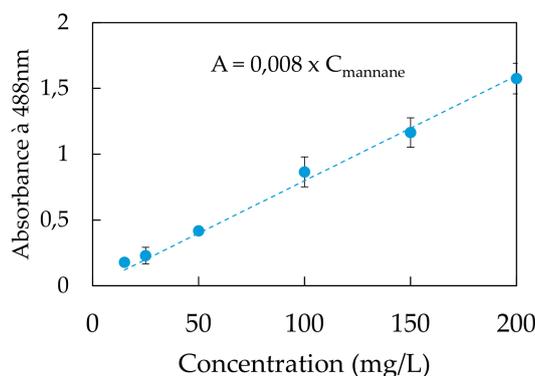


FIGURE 6 – Droite d'étalonnage obtenue pour le mannane en relevant l'absorbance à 488 nm.

## C Interactions catéchine/PDMAEMA

De façon à mieux comprendre les potentielles interactions existant entre la catéchine et notre copolymère, nous avons souhaité réaliser des mesures de DLS de la même façon qu'évoqué page 122 pour le saccharose. Pour cela, nous avons travaillé avec des phases aqueuses contenant de la catéchine à 1 mg/mL et un homopolymère de PDMAEMA à 5 mg/mL, en présence de 0,15 M de NaCl. Nous avons travaillé à 4 pH : 1 et 3 ajustés par ajout d'HCl, et 6 et 8 ajustés par un tampon phosphate. Nous avons constaté de façon reproductible que la dissolution conjointe de la catéchine et du PDMAEMA était possible aux pH 1 et 6, mais pas aux pH 3 et 8. Ceci a été observé que la catéchine solide soit ajoutée à une solution d'homopolymère, ou que l'homopolymère solide soit

ajouté à une solution de catéchine. Si un même volume d'une solution de catéchine à 2 mg/mL est mélangée à une solution d'homopolymère à 10 mg/mL, une précipitation sous forme d'un solide collant de la couleur de la catéchine solide est observé, laissant penser à une précipitation conjointe des deux espèces. Ce phénomène confirme qu'il existe des interactions entre la catéchine et notre copolymère, il est cependant très surprenant que la précipitation ne soit observée que pour deux valeurs de pH non consécutives.

Les corrélogrammes obtenues pour les mesures de DLS réalisées sur les échantillons à pH 1 et 6 n'ont pas montré d'évolution sur 20 jours.

Ces études n'ont pas été approfondies mais elles constituent assurément un point de départ à la compréhension des interactions pouvant exister entre les deux entités.





**Titre :** Formation d'émulsions multiples stables, stimulables et biocompatibles; application à l'encapsulation et au relargage contrôlé de principes actifs

**Mots clés :** Émulsion multiple, encapsulation, polymère, PDMS-*b*-PDMAEMA, microfluidique, antioxydant

**Résumé :** Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux émulsions stabilisées par une famille de copolymères diblocs biocompatibles polydiméthylsiloxane-*b*-poly(méthacrylate de diméthylaminoéthyle) (PDMS-*b*-PDMAEMA). Le bloc PDMAEMA, porteur de fonctions amines, est sensible au pH et à la force ionique. En faisant varier ces deux paramètres, des émulsions directes, inverses et multiples E/H/E ont pu être obtenues en une seule étape d'émulsification, par cisaillement d'une phase aqueuse et d'une phase huile biocompatible (Miglyol<sup>®</sup> 812 ou myristate d'isopropyle). Pour un copolymère présentant des longueurs de blocs hydrophile et hydrophobe similaires, le PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub>, des émulsions multiples stables sur plus de deux ans sont obtenues avec les deux huiles, pour des pH proches du pK<sub>A</sub> du PDMAEMA et dans une vaste gamme de sel ajouté. Il a en outre été établi sur des cellules intestinales humaines que les émulsions formées à partir de ces copolymères ne présentent pas de cytotoxicité et peuvent être utilisées pour développer des applications pour le vivant.

La diminution du pH de la phase aqueuse conduit à la déstabilisation des émulsions doubles en émulsions

directes, permettant d'obtenir la libération contrôlée des espèces encapsulées dans les gouttelettes d'eau internes. Des essais d'encapsulation ont été réalisés avec une molécule modèle, le saccharose, et un antioxydant naturellement présent dans le thé vert, la catéchine, molécule fragile facilement dégradée. Ces molécules peuvent être libérées à loisir par diminution du pH et déstabilisation de l'émulsion multiple, la formation de liaisons hydrogènes entre les molécules encapsulées et le copolymère limitant cependant le relargage. Il a également été démontré que les émulsions ont un effet protecteur sur la catéchine lors du stockage et permettent de préserver son pouvoir antioxydant.

Enfin, nous avons étudié la formation d'émulsions stabilisées par le PDMS-*b*-PDMAEMA par voie microfluidique. Une méthode originale a été développée pour permettre de former de façon simple des émulsions doubles sur des puces en PDMS. Des émulsions E/H/E ont été obtenues dans des conditions de pH et de force ionique bien précises, et la catéchine a pu également être encapsulée au cœur des gouttelettes internes par cette méthode.

**Title :** Formation of stable, stimuable and biocompatible multiple emulsions; application to encapsulation and controlled release of drugs

**Keywords :** Multiple emulsion, encapsulation, polymer, PDMS-*b*-PDMAEMA, microfluidics, antioxidant

**Abstract :** In this work, we studied different kinds of emulsions stabilized by biocompatible diblock copolymers polydimethylsiloxane-*b*-poly(dimethylaminoethyle methacrylate) (PDMS-*b*-PDMAEMA). PDMAEMA is sensitive to pH and ionic strength thanks to the amine groups carried by the chain. Varying the latter parameters, we obtained direct, inverse and W/O/W double emulsions in only one emulsification step, by shearing an aqueous phase and a biocompatible oil (Miglyol<sup>®</sup> 812 or isopropyle myristate). For a copolymer having hydrophilic and hydrophobic blocks of similar lengths, PDMS<sub>60</sub>-*b*-PDMAEMA<sub>50</sub>, very stable multiple emulsions (more than two years) were obtained, for pH close to pK<sub>A</sub> of PDMAEMA and in a large range of salt concentrations. Cytotoxicity measurements were performed on intestinal human cells, proving the possibility of using the emulsions stabilized with these copolymers to develop applications for health care.

pH lowering allows to turn direct emulsions to multiple

ones, leading to the controlled release of encapsulated species in the inner water drops. Encapsulation tests have been carried out with a model molecule, sucrose, and with an antioxidant extracted from green tea, catechin. Both molecules could be released from our emulsions by reducing the pH, despite the formation of hydrogen bonds between the encapsulated compounds and the copolymer which prevented complete deliverance. We demonstrated the ability of our multiple emulsions to protect the fragile catechin molecule during storage and preserve its antioxidant capacity.

Additionally, we achieved the formation of PDMS-*b*-PDMAEMA stabilized emulsions by microfluidics. An innovative method was developed to allow the formation of double emulsions on PDMS microchips in an easy way. W/O/W emulsions were obtained for precise pH and salt concentrations, and catechin could also be successfully encapsulated in the internal water droplets by this method.

