



HAL
open science

Nanoémulsions d'intérêt pharmaceutique stabilisées par la beta-lactoglobuline

Ali Ali

► **To cite this version:**

Ali Ali. Nanoémulsions d'intérêt pharmaceutique stabilisées par la beta-lactoglobuline. Pharmacie galénique. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS505 . tel-01486119

HAL Id: tel-01486119

<https://theses.hal.science/tel-01486119v1>

Submitted on 9 Mar 2017

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.

NNT : 2016SACLS505

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 569
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Pharmacotechnie et biopharmacie

Par

Ali ALI

Nanoémulsions d'intérêt pharmaceutique stabilisées par la β -lactoglobuline

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 16 decembre 2016

Composition du Jury :

M Elias FATTAL	Professeur, Université Paris-Sud	Président du jury
Mme Odile CHAMBIN	Professeur, Université de Bourgogne	Rapporteur
M Philippe LEGRAND	Professeur, Université de Montpellier I	Rapporteur
M Alain DURAND	Professeur, Université de Lorraine	Examineur
Mme Isabelle PEZRON	Professeur, Université de Technologie de Compiègne	Examineur
M Moncef STAMBOULI	Professeur, Ecole Centrale Paris	Examineur
Mme Ghazlene MEKHOULFI	Docteur, Université Paris-Sud	Co-encadrant
Mme Florence AGNELY	Professeur, Université Paris-Sud	Directeur de thèse

إلى ذكرى والدي

سنواتٍ طَويلةٍ مرَّتْ مُنذُ رَجيلِكَ، لَكُنَّكَ حاضِرٌ دائماً في كلِّ نجاحاتي

A la mémoire de mon père.

*De longues années sont passées depuis ton départ,
mais tu es toujours présent dans toutes mes réussites.*

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements,

Au Professeur **Elias FATTAL**, en sa qualité de Directeur de l'Institut Galien Paris-Sud, pour son bon accueil au sein de son unité de recherches et d'avoir accepté d'être membre du jury.

Au Professeur **Odile CHAMBIN**, et au Professeur **Philippe LEGRAND**, pour avoir accepté d'être les rapporteurs scientifiques de ce travail. Merci également au Professeur **Alain DURAND**, au Professeur **Moncef STAMBOULI** et au Professeur **Isabelle PEZRON** pour avoir accepté d'examiner mon travail en acceptant d'être membres du jury.

Au Professeur **Florence PETIT-AGNELY**, Responsable de l'équipe Physique Pharmaceutique, pour son accueil chaleureux en qualité de Directrice de thèse, son expérience professionnelle précieuse et surtout sa grande patience et sa confiance pour la réalisation du projet ainsi confié.

Au Docteur **Isabelle LE POTIER**, de l'équipe de Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives, pour son aide, ses conseils et nos discussions scientifiques enrichissantes et sa qualité d'encadrante disponible.

Au Docteur **Claire GUEUTIN**, pour son sens de l'encadrement, son aide, ses conseils en matière de HPLC.

Au Docteur **Nicolas HUANG**, et l'Assistante Ingénieur **Sara VILLEBRUN**, pour leurs conseils avisés sur la plateforme de rhéologie.

Au Docteur **Monique CHERON**, pour son expertise et son aide précieuse dans le domaine du dichroïsme circulaire, sa disponibilité et ses qualités humaines.

Au Docteur **Isabelle TURBICA**, des équipes Inflammation, chimiokines et immunopathologie de l'UMR-S 996, pour son sens relationnel, et sa disponibilité.

Aux membres de l'équipe Physico-Chimie des Systèmes Polyphasés, le Professeur **Sylviane LESIEUR**, le Docteur **Gillian BARRATT**, et notamment le Docteur **Vincent FAIVRE**, pour leur accueil, leur aide et leur patience pour me guider face à l'homogénéisateur haute pression.

Au personnel de l'équipe Physico-Chimie des Surfaces, représentée par le Professeur **Véronique ROSILIO** dont les conseils m'ont été précieux, puis à Monsieur **David CHAPRON** et au Docteur **Jean-Philippe MICHEL** pour leur sens de l'écoute les conseils très professionnels.

A tous les membres actuels de l'équipe Physique Pharmaceutique, notamment le Docteur **Sandrine GEIGER**, le Professeur **Nour-Eddine GHERMANI**, et anciens membres, pour leur bonne humeur, leur gentillesse et leur professionnalisme ; aux étudiants avec lesquels j'ai partagé l'espace de travail pendant ces quelques années, en particulier **Agnès, Manal, Ariana, Claire, Clémence** et **Amine**.

Enfin, aux membres de ma famille, à mes Enseignants référents de mon pays, pour leur soutien et leurs encouragements.

TABLE DES MATIERES

Abréviations et symboles	5
Introduction générale.....	11
Références.....	13
Chapitre I : Étude bibliographique : les nanoémulsions	15
1 Introduction.....	15
2 Définitions.....	16
2.1 Systèmes émulsionnés	16
2.2 Macroémulsions	16
2.3 Nanoémulsions	17
2.4 Miniémulsions, émulsions ultrafines ou émulsions submicroniques	17
2.5 Microémulsions	18
3 Mécanismes de déstabilisation des nanoémulsions	18
3.1 Mûrissement d'Ostwald.....	19
3.2 Coalescence.....	22
3.3 Floculation	23
3.4 Sédimentation ou crémage.....	25
4 Agents émulsionnants utilisés pour la formulation des nanoémulsions	26
4.1 Tensioactifs de faible masse molaire.....	27
4.2 Agents émulsionnants macromoléculaires (polymères)	27
4.3 Stabilisation de Pickering	27
5 Méthodes de stabilisation des nanoémulsions.....	28
5.1 Stabilisation rhéologique	28
5.2 Stabilisation stérique	28
5.3 Stabilisation électrostatique	29
5.4 Stabilisation électro-stérique	29
6 Formulation des nanoémulsions.....	30
6.1 Méthodes d'émulsification à basse énergie.....	30
6.2 Méthodes d'émulsification à haute énergie.....	34
6.3 Aspects thermodynamiques de la formation des nanoémulsions	39
7 Caractérisation des nanoémulsions.....	42
7.1 Analyse granulométrique	42
7.2 Charge de surfaces des gouttelettes.....	44
7.3 Comportement rhéologique	45
7.4 Stabilité	47
8 Avantages et inconvénients des nanoémulsions.....	50
8.1 Avantages des nanoémulsions	50
8.2 Inconvénients des nanoémulsions.....	52
9 Nanoémulsions pour des applications pharmaceutiques.....	54
10 Protéines en tant qu'agents émulsionnants.....	63
10.1 Propriétés interfaciales et émulsionnantes des protéines.....	64
10.2 Protéines utilisées pour la formulation des nanoémulsions	67
10.3 Comparaison des propriétés émulsifiantes des différentes protéines.....	79
10.4 Comparaison des propriétés émulsifiantes des tensioactifs et des protéines... ..	80
11 Conclusion.....	82
Références.....	84

Chapitre II : Nanoémulsions stabilisées par la β-lactoglobuline : effet des paramètres de formulation et de procédé sur la taille des gouttelettes et sur la stabilité des nanoémulsions.....	101
Introduction - résumé	101
Publication 1 : β-lactoglobulin stabilized nanoemulsions - Formulation and process factors affecting droplet size and nanoemulsion stability.....	103
Chapitre III : Effet de l'homogénéisation à haute pression sur la structure, les propriétés interfaciales et les propriétés émulsionnantes de la β-lactoglobuline	105
Introduction – résumé.....	105
Références.....	107
Partie A : Projet de publication : Effect of high pressure homogenization on the structure and the interfacial properties of β-lactoglobulin.....	109
Partie B : Effect of high pressure homogenization on the emulsifying properties of β-lactoglobulin	111
1 Introduction.....	111
2 Materials and methods	112
2.1 Materials	112
2.2 Preparation of the nanoemulsions	112
2.3 Nanoemulsion characterization and physical stability study	114
3 Results and discussion.....	114
4 Conclusion.....	121
References.....	122
Chapitre IV : Etude préliminaire en vue de l'encapsulation et de la délivrance cutanée d'une substance active hydrophobe modèle : l'isotrétinoïne.....	125
1 Introduction.....	125
2 Contexte bibliographique	126
2.1 L'acné.....	126
2.2 L'isotrétinoïne	137
2.3 Conclusion	148
3 Matériels et méthodes.....	149
3.1 Matériels	149
3.2 Etude de la solubilité de l'isotrétinoïne	149
3.3 Etude de la stabilité de l'isotrétinoïne	150
3.4 Préparation des nanoémulsions	151
3.5 Répartition de la protéine entre les différentes phases	152
3.6 Etude de l'efficacité d'encapsulation de l'isotrétinoïne	152
3.7 Caractérisation des nanoémulsions et de leur stabilité	153
3.8 Séparation et dosage de l'isotrétinoïne par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC).....	154
4 Résultats et discussion.....	154
4.1 Solubilité et stabilité de l'isotrétinoïne	154
4.2 Caractérisation des nanoémulsions	158
4.3 Répartition de la protéine entre les différentes phases des nanoémulsions ...	162
4.4 Efficacité d'encapsulation de l'isotrétinoïne	164
4.5 Stabilité physique des nanoémulsions	166
5 Conclusion.....	170
Références.....	170
Chapitre V : Discussion générale.....	183

1	Quelles sont les conditions pour stabiliser des NEs par la β-lg ?	
	Quels sont les mécanismes mis en jeu ?	184
1.1	Mécanisme d'émulsification avec la β -lg par homogénéisation à haute pression .	186
1.2	Mécanismes de stabilisation/déstabilisation des NEs avec la β -lg	188
2	Quel est le rôle de la dénaturation de la protéine ?	191
3	Est-il possible d'obtenir une formulation d'intérêt pharmaceutique pour une application cutanée ?	197
	Références.....	200
Conclusion et perspectives.....		205
Annexe I.....		209
1	Effect of the composition and process conditions on the droplet Zeta potential and its stability	209
2	Effect of the composition and process conditions on the nanoemulsion viscosity and its stability.....	213
Annexe II : Free protein measurement.....		215

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

AFM	<i>Atomic force microscopy</i> / Microscope à force atomique
APS	<i>Ammonium persulfate</i> / Persulfate d'ammonium
AUC	<i>Area under the curve</i> / Aire sous la courbe
BSA	<i>Bovin serum albumin</i> / Albumine de sérum bovin
Ca	<i>Capillary number</i> / Nombre capillaire
Ca _c	<i>critical capillary number</i> / Nombre capillaire critique
CAH	<i>Congenital Adrenal Hyperplasia</i> / Hyperplasie congénitale des surrénales
CD	<i>Circular Dichroism</i> / Dichroïsme circulaire
Ce	<i>Critical entanglement concentration</i> / Concentration d'enchevêtrement critique
CP	<i>Cloud point</i> / Température de trouble
CRABP	<i>Cellular retinoic acid binding proteins</i> / Protéines cellulaires de liaison de l'acide rétinoïque
CRBP	<i>Cellular retinol binding proteins</i> / Protéines cellulaires de liaison du rétinol
C _s	<i>Concentration of the emulsifier in the emulsion</i> / Concentration de l'émulsifiant dans l'émulsion
Cys	<i>Cysteine</i> / Cystéine
D	<i>Translational diffusion coefficient</i> / Coefficient de diffusion translationnelle
d	<i>Droplet diameter</i> / Diamètre des gouttes
DHEA	<i>Dehydroepiandrosterone</i> / Déhydroépiandrosterone
DHT	<i>Dihydrotestosterone</i> / Dihydrotestostérone
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> / Diffusion dynamique de la lumière
e	<i>Electron charge</i> / Charge de l'électron
E'	<i>Storage modulus</i> / Module de conservation
E''	<i>Loss modulus</i> / Module de perte
E*	<i>Dilatational complex modulus</i> / module complexe dilatationnel
E*	<i>Norm of the complex modulus</i> / Norme du module complexe
EIP	<i>Emulsion inversion point</i> / Point d'inversion d'émulsion
EMA	<i>European medicines agency</i> / Agence européenne des médicaments
FDA	<i>Food and drug administration</i> / Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

f_{α} , f_{β} , f_c	<i>Fractions of α-helix, β-sheets, and random coils / Fractions d'hélice α, de feuillets β, et des structures désordonnées</i>
g	<i>Gravitational acceleration / Accélération de la pesanteur</i>
HPH	<i>High pressure homogenization / Homogénéisation à haute pression</i>
HLB	<i>Hydrophilic-lipophilic balance / Balance hydrophile-lipophile</i>
HP	<i>High pressure / Haute pression</i>
ICH	<i>International conference on harmonisation / Conférence internationale sur l'harmonisation</i>
$I_{\text{Crémage}}$	<i>Creaming index / Indice de crémage</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1 / Facteur de croissance-1 analogue à l'insuline</i>
IL	<i>Interleukins / Interleukines</i>
K_B	<i>Boltzmann constant / Constante de Boltzman</i>
L	<i>Distance or Length / Distance ou Longueur</i>
LSs	<i>Liposomes / Liposomes</i>
2-ME	<i>2-Mercaptoethanol / 2-Mercaptoéthanol</i>
HPM	<i>High pressure microfluidization / Microfluidisation à haute pression</i>
MTT	<i>Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium</i>
$\overline{Mw}_{\text{PAGE}}$	<i>Apparent molecular weight according to Polyacrylamide Gel Electrophoresis / Masse moléculaire apparente selon l'électrophorèse sur gel de poly(acrylamide)</i>
$\overline{Mw}_{\text{SEC}}$	<i>Apparent molecular weight according to size exclusion chromatography / Masse moléculaire apparente selon la chromatographie d'exclusion stérique</i>
NCs	<i>Nanocapsules / Nanocapsules</i>
NE (100/4-100/4)	<i>Nanoémulsion préparée à 100 MPa/4 cycles avec une solution de β-lg homogénéisée à 100 MPa/4 cycles</i>
NE (300/5-100/4)	<i>Nanoémulsion préparée à 100 MPa/4 cycles avec une solution de β-lg homogénéisée à 300 MPa/5 cycles</i>
NE (85° C-100/4)	<i>Nanoémulsion préparée à 100 MPa/4 cycles avec une solution de β-lg dénaturée par la chaleur à 85° C pendant 30 min</i>
NE (0-100/4)	<i>Nanoémulsion préparée à 100 MPa/4 cycles avec une solution de β-lg non traitée</i>
NE (0-300/5)	<i>Nanoémulsion préparée à 300 MPa/5 cycles avec une solution de β-lg non traitée</i>
NE-GX	<i>Nanoémulsion contenant 0,5 m/m% de gomme xanthane</i>
NE-IT	<i>Nanoémulsion contenant 0,033 m/m% d'isotrétinoïne</i>
NE-IT-GX	<i>Nanoémulsion contenant 0,033 m/m% d'isotrétinoïne et 0,5 m/m% de gomme xanthane</i>
NE-R	<i>Nanoémulsion de référence (sans gomme xanthane ou isotrétinoïne)</i>
NEs	<i>Nanoemulsions / Nanoémulsions</i>
NPs	<i>Nanoparticles / Nanoparticules</i>

NSPs	<i>Nanospheres</i> / Nanosphères
O/W	<i>Oil in water or oil/water</i> / Huile dans eau ou huile/eau
O/W/O	<i>Oil in water in oil</i> / Huile dans eau dans huile
p	<i>Packing parameter</i> / Paramètre d'empilement
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
PAPA	<i>Pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum, acne</i> / Arthrite pyogénique, pyoderma gangrenosum, acné cystique
PASH	<i>Pyoderma gangrenosum, acne, suppurative Hhidradenitis</i> / Pyoderma gangrenosum, acné, hidradénite suppurée
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i> / Solution tampon phosphate
PCOS	<i>Polycystic ovary syndrome</i> / Syndrome des ovaires polykystiques
PDI	<i>Polydispersity index</i> / Indice de polydispersité
PEG	<i>Polyethylene glycol</i> / Polyéthylène glycol
Phe	<i>Phenylalanine</i> / Phénylalanine
pI	<i>Isoelectric point</i> / Point isoélectrique
PIC	<i>Phase inversion composition</i> / Composition d'inversion de phase
PIT	<i>Phase inversion temperature</i> / Température d'inversion de phase
pKa	<i>Acidity constant</i> / Constante d'acidité
PEO	<i>Polyethylene oxide</i> / Poly(oxyéthylène)
PP	<i>Pea protein</i> / Protéines de petit pois
PVP	<i>Polyvinylpyrrolidone</i> / Poly(vinylpyrrolidone)
r	<i>Radius of drop</i> / Rayon de goutte
R	<i>Gas constant</i> / Constante des gaz parfaits
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i> / Récepteurs d'acide rétinoïque
RP-HPLC	<i>Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography</i> / Chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse
RXR	<i>Retinoid X receptor</i> / Récepteurs X du rétinoïdes
$S_{(r)}, S_{(\infty)}$	Solubilité de l'huile sous forme de goutte de rayon r, solubilité de l'huile à la séparation des phases
SA, SAs	Substance(s) active(s)
SAHA	<i>Seborrhoea, acne, hirsutism, alopecia</i> / séborrhée, acné, hirsutisme, alopecie
SAPHO	<i>Synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis, osteitis</i> / Synovite, acné, pustulose palmo-plantaire, hyperostose, ostéite
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> / Electrophorèse sur gel de poly(acrylamide) en présence de dodécylsulfate de sodium
SE	<i>Spontaneous emulsification</i> / Emulsification spontanée
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> / chromatographie d'exclusion stérique
SEDDS	<i>Self-emulsifying drug delivery systems</i> / Systeme de delivrance d'un médicament à auto-emulsification
SNEDDS	<i>Self--nanoemulsifying drug delivery systems</i> / Systeme de delivrance d'un médicament à auto-nanoemulsification
SPI	<i>Soybean protein isolate</i> / Isolat de protéine de soja

t	<i>Time / Temps</i>
T	<i>Absolute temperature / Température absolue</i>
TCL	<i>Long-chain triglycerides / Triglycérides à chaînes longues</i>
TCM	<i>Medium-chain triglyceride / Triglycérides à chaînes moyennes</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine / Tétraméthyléthylènediamine</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha / Facteur de nécrose tumorale-α</i>
Trp	<i>Tryptophan / Tryptophane</i>
Tyr	<i>Tyrosine / Tyrosine</i>
V	<i>Volume / Volume</i>
v	<i>Rate / Vitesse</i>
W/O	<i>Water in oil / Eau dans huile</i>
W/O/W	<i>Water in oil in Water / Eau dans huile dans eau</i>
WPC	<i>Whey protein concentrate / Concentré de protéines du lactosérum</i>
WPI	<i>Whey protein isolate / Isolat de protéines du lactosérum</i>
W_{vdws}	<i>Energy of van der Waals interaction / Energie d'interaction de van der Waals</i>
z	<i>Charge number / Nombre de charges</i>
α	<i>Plastic viscosity / Viscosité plastique</i>
α_0	<i>Cross-sectional area / Aire de section transversale</i>
α -la	<i>Alpha-lactalbumin / Alpha-lactalbumine</i>
β -lg	<i>Beta-lactoglobulin / Bêta-lactoglobuline</i>
γ	<i>Interfacial tension / Tension interfaciale</i>
$\dot{\gamma}$	<i>Shear rate / Taux de cisaillement</i>
Γ	<i>Surface excess / Excès superficiel</i>
δ	<i>Phase angle / déphasage</i>
ΔA	<i>Variation d'aire de l'interface</i>
ΔG	<i>Variation in Gibbs free energy / Variation d'énergie libre de Gibbs</i>
ΔH	<i>Variation in enthalpy / Variation d'enthalpie</i>
ΔS	<i>Variation in entropy / Variation d'entropie</i>
$\Delta \rho$	<i>Difference between the phases densities / Différence entre les masses volumiques des phases</i>
ϵ	<i>Permittivity / Permittivité</i>
ϵ_r	<i>Relative permittivity or dielectric constant / Permittivité relative ou constante diélectrique</i>
ζ	<i>Zeta potential / Potentiel Zêta</i>
η	<i>Viscosity / viscosité</i>
η_0	<i>Zero-shear viscosity / Viscosité à taux de cisaillement nul</i>
η_∞	<i>Infinite shear viscosity / Viscosité à taux de cisaillement infini</i>
η_c	<i>Continuous phase viscosity / Viscosité de phase continue</i>
η_d	<i>Dispersed phase viscosity / Viscosité de phase dispersée</i>
κ	<i>Inverse Debye length / Inverse de la longueur de Debye</i>
λ	<i>Wave length / Longueur d'onde</i>
v	<i>Creaming rate / Vitesse de crémage</i>
ϕ	<i>Dispersed phase volume fraction / Fraction volumique de phase dispersée</i>

Π	<i>Interfacial pressure</i> / Pression interfaciale
$[\theta]$	<i>Mean residue ellipticity</i> / Ellipticité molaire moyenne par résidu
ρ	<i>Density</i> / Masse volumique
τ_0	<i>Threshold stress</i> / Contrainte seuil
ψ	<i>Electrostatic Potential</i> / Potentiel électrostatique
ω	<i>Rate of Ostwald ripening</i> / Vitesse du mûrissement d'Ostwald

INTRODUCTION GENERALE

Les nanoémulsions (NEs) sont des systèmes métastables comportant au moins deux phases liquides non miscibles, en général l'eau et l'huile, dispersées l'une dans l'autre sous forme de gouttelettes sphériques de 20 à 200 nm de diamètre. Les NEs ont été développées depuis une quinzaine d'années grâce à l'amélioration de la compréhension des méthodes d'émulsification à basse énergie et la disponibilité des techniques d'émulsification à haute énergie. Les NEs ont alors suscité un intérêt grandissant, spécialement durant la dernière décennie, dans différents domaines tels que la chimie, les sciences des matériaux et les sciences pharmaceutiques et médicales. Dans le domaine pharmaceutique, les NEs ont été développées pour améliorer la délivrance des substances actives (SAs). Les NEs huile dans eau permettent de solubiliser les SAs hydrophobes peu ou pas solubles dans l'eau. Leur surface spécifique accrue par rapport aux émulsions conventionnelles permet une meilleure libération de la substance active (SA) et, en conséquence, améliore leur biodisponibilité. Les NEs peuvent également améliorer la stabilité chimique des SAs sensibles aux dégradations enzymatiques et chimiques. En raison de l'augmentation de l'interface huile/eau (O/W) par rapport aux émulsions conventionnelles, les NEs nécessitent l'utilisation de concentrations plus élevées d'agents émulsionnants, indispensables pour leur stabilisation. Actuellement, 80 % des agents émulsionnants utilisés pour la stabilisation des NEs pharmaceutiques sont des tensioactifs synthétiques de faible masse molaire. Ces tensioactifs sont associés à des effets irritants, voire toxiques, pour les différentes voies d'administration. Cela limite l'utilisation des NEs et plus particulièrement pour le traitement à long terme de maladies chroniques. Pour le remplacement des tensioactifs de synthèse, les phospholipides, principalement la phosphatidylcholine, sont actuellement utilisés dans ce domaine en tant qu'agents émulsionnants naturels. Une autre approche se trouve dans le domaine des NEs agroalimentaires et consiste en l'utilisation des biopolymères tels que les protéines et les polysaccharides. Au meilleur de notre connaissance, une seule étude se trouve dans la littérature pour appliquer cette approche dans le domaine pharmaceutique (He et *al.*, 2011).

La β -lactoglobuline (β -lg) est une petite protéine globulaire très largement étudiée et utilisée dans le domaine alimentaire. Sa structure est bien caractérisée et ses propriétés

interfaciales et émulsionnantes bien établies. Ce projet de thèse propose cette protéine en tant qu'excipient à utiliser en association avec une des méthodes d'émulsification à haute énergie. Ce type de méthode consiste en l'application de forces intenses pour rompre les grosses gouttes des émulsions et produire des gouttelettes nanométriques.

L'objectif de cette thèse est donc de formuler des NEs stabilisées par la β -lg, la protéine principale du lactosérum, de comprendre les mécanismes de stabilisation et déstabilisation par cette protéine, ainsi que l'influence du procédé de préparation des NEs sur la structure de la protéine et, enfin, d'évaluer ce système pour encapsuler une SA pharmaceutique en vue d'une délivrance cutanée.

Le premier Chapitre de ce mémoire est une synthèse bibliographique sur le thème des NEs et des aspects physico-chimiques à prendre en compte pour leur préparation et leur stabilisation. Nous présentons une revue sur la stabilisation des NEs avec des biopolymères établie sur la base des données existantes dans le domaine agroalimentaire et nous discutons l'intérêt de ces systèmes pour des applications pharmaceutiques.

Le deuxième Chapitre présente une étude expérimentale sur la préparation des NEs stabilisées par la β -lg et des facteurs influençant les propriétés et la stabilité des NEs obtenues. L'effet de la composition (la concentration en protéine dans la phase aqueuse, la nature et la fraction massique de la phase huileuse) et des conditions du procédé (la pression et le nombre de cycles d'homogénéisation) ont été étudiés systématiquement. Une étude physico-chimique a également été menée pour mieux comprendre les mécanismes de stabilisation et/ou de déstabilisation des NEs par cette protéine.

Le procédé de préparation des NEs est susceptible d'altérer la structure de la protéine et ses propriétés en tant qu'agent émulsionnant. Le troisième Chapitre présente donc une étude expérimentale sur ces aspects pour mettre en évidence la relation entre la structure de la protéine et son efficacité optimale en tant qu'agent émulsionnant.

Le quatrième Chapitre de cette thèse vise à étudier l'efficacité des NEs développées pour l'encapsulation de l'isotrétinoïne, (acide 13-*Cis*-rétinoïque), un dérivé synthétique de la vitamine A souvent utilisé pour le traitement de l'acné sévère, sélectionné pour ce travail en tant que substance hydrophobe modèle.

Nous discuterons ensuite de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse pour les replacer dans le contexte scientifique actuel avant de conclure et d'ouvrir des perspectives pour la suite de ce projet.

Références

He, W., Tan, Y., Tian, Z., Chen, L., Hu, F., Wu, W., 2011. Food protein-stabilized nanoemulsions as potential delivery systems for poorly water-soluble drugs: Preparation, in vitro characterization, and pharmacokinetics in rats. *International Journal of Nanomedicine* 6, 521-533.

CHAPITRE I

Étude bibliographique : les nanoémulsions

1 Introduction

Les NEs sont des systèmes émulsionnés qui ont suscité un intérêt croissant au cours des deux dernières décennies. La synthèse bibliographique présentée dans ce Chapitre est basée principalement sur les nombreuses références parues dans ce domaine depuis la fin des années 1990.

Après avoir présenté les NEs et leurs spécialités par rapport aux autres systèmes émulsionnés, nous décrirons leurs mécanismes de déstabilisation puis les méthodes utilisées pour les stabiliser et les fabriquer. Nous insisterons sur les avantages et les inconvénients de ces systèmes particulièrement pour des applications pharmaceutiques.

Actuellement, dans le domaine alimentaire, les protéines sont largement utilisées comme agents émulsionnants. Nous discuterons leur intérêt pour stabiliser des NEs pharmaceutiques en remplacement des tensioactifs de synthèse actuellement utilisés dans ce domaine.

Cette synthèse bibliographique nous permettra de sélectionner la protéine et le procédé pour fabriquer des NEs innovantes destinées à encapsuler une SA pharmaceutique.

2 Définitions

2.1 Systèmes émulsionnés

Les systèmes émulsionnés, ou simplement les émulsions, sont des systèmes comportant au moins deux phases liquides non miscibles, en général de l'eau et l'huile, dispersées l'une dans l'autre sous forme de gouttes. Il s'agit de systèmes hors équilibre thermodynamique en raison de l'énergie libre à l'interface entre les deux phases. La formulation des systèmes émulsionnés nécessite donc l'utilisation d'agents émulsionnants pour réduire la tension interfaciale et améliorer la stabilité cinétique de ces systèmes. L'appellation « émulsion » désigne une famille de systèmes comprenant les macroémulsions, les NEs et les miniémulsions, se distinguant par le diamètre de gouttes, et dont les propriétés applicatives peuvent varier significativement. Les deux phases dans les émulsions peuvent être regroupées en deux grandes familles : la phase polaire et la phase apolaire. La phase polaire regroupe en général des liquides associés à la fois par des interactions de type Lifshitz-van der Waals et des interactions de type acide-base de Lewis, comme des liaisons hydrogène. Dans la plupart des cas, la phase polaire est une solution aqueuse. La phase apolaire dite « phase huileuse » regroupe des liquides non associés ne mettant en jeu que des interactions de type Lifshitz - van der Waals (Sjöblom, 1992; Schuster, 1996).

Les systèmes émulsionnés peuvent être classés en fonction de la nature des phases continue et dispersée. La phase dispersée peut être soit de l'huile, on parle alors d'émulsions directes huile/eau (O/W), soit la phase aqueuse, on a alors des émulsions inverses eau/huile (W/O). Les émulsions peuvent aussi être tri-phasiques. Il s'agit alors d'émulsions multiples (W/O/W ou O/W/O) (Tadros, 2013).

2.2 Macroémulsions

Les macroémulsions sont des émulsions dont le diamètre des gouttes est de l'ordre du micromètre. Elles sont généralement obtenues par agitation mécanique. Cependant le terme « émulsion » sans précision est traditionnellement utilisé pour désigner ce groupe de systèmes

émulsionnés. Pour les désigner, on trouve aussi d'autres termes comme « émulsion classique » et « émulsion conventionnelle ».

2.3 Nanoémulsions

Les NEs sont des émulsions avec un diamètre de gouttes nanométriques, dites « nanogouttes ou gouttelettes » et une distribution de taille étroite. Cependant, il n'y a pas encore de consensus dans la littérature pour définir précisément la gamme de diamètre qui peut être considérée comme « nanométrique ». Selon les auteurs, on peut trouver différentes valeurs de diamètre définissant les NEs : par exemple un diamètre inférieur à 200 nm (Mason et *al.*, 2006), de 20 à 200 nm (Solans et *al.*, 2005; El-Aasser et Sudol, 2004; Chen et *al.*, 2011), de 50 à 200 nm (Tadros et *al.* 2004), de 5 à 200 nm (Thakur et *al.*, 2012; Devarajan et *al.*, 2011) et de 100 à 500 nm (Shah et *al.*, 2010). Nous retiendrons dans ce travail la définition de Solans et *al.* (2005) soit un diamètre compris entre 20 et 200 nm.

Les NEs sont des systèmes « métastables », c'est-à-dire hors équilibre thermodynamique. Néanmoins, grâce à leur diamètre de gouttelettes ultrabas, elles présentent une stabilité cinétique plus importante par rapport aux macroémulsions. Comme toute émulsion non concentrée en phase dispersée, les NEs ont des gouttelettes sphériques en raison de la pression de Laplace élevée.

Les NEs directes (O/W) sont largement utilisées dans différents domaines dont celui de la pharmacie. Les applications pharmaceutiques des NEs (O/W) seront détaillées dans la Partie 9 de ce Chapitre. Pour leur part les NEs inverses (W/O) sont quasiment absentes dans ce domaine et ne sont pas abordées dans ce travail. Les NEs pharmaceutiques multiples (W/O/W) ont été récemment décrites dans certaines références (Schwarz et *al.*, 2012; Sigward, 2014).

2.4 Miniémulsions, émulsions ultrafines ou émulsions submicroniques

On trouve les termes « miniémulsions » (Mason et *al.*, 2006; El-Aasser et Sudol 2004) et « émulsions ultrafines » (Joscelyne et Trägårdh, 2000) qui désignent aussi des émulsions de

taille submicronique. Le terme « émulsions submicroniques » est fréquemment utilisé pour des émulsions dont la taille de gouttelettes est comprise entre 1 et 1000 nm et dont les propriétés physico-chimiques varient en fonction de leur taille de gouttelettes (Joscelyne et Trägårdh, 1999; Cortés-Muñoz et *al.*, 2009). Les NEs font donc partie des miniémulsions ou émulsions submicroniques mais correspondent aux tailles les plus faibles de cette famille d'émulsions.

2.5 Microémulsions

Les microémulsions sont des systèmes dans lesquels un tensioactif particulièrement performant rend possible la coexistence, à l'échelle quasi moléculaire, des phases eau et huile. Les microémulsions présentent des microdomaines qui ne sont pas nécessairement sphériques, de petite dimension, typiquement de l'ordre de 10 à 50 nm, fluctuant rapidement dans le temps et dans l'espace. Dans les microémulsions, l'énergie libre de Gibbs du système est plus faible que celle du système présentant deux phases séparées. Dans ce cas, l'émulsification est alors spontanée et les microémulsions sont thermodynamiquement stables, contrairement aux macro/mini/nano – émulsions (Salager et *al.*, 2001).

Les microémulsions ne sont donc pas des émulsions avec un diamètre de gouttelettes micronique comme leur appellation semble vouloir le dire. Plusieurs auteurs ont estimé que cette appellation était une « erreur historique » parce qu'elle fait une confusion entre deux systèmes complètement différents : la famille des émulsions (macro, mini et nano) et ce qu'on appelle idiomatiquement « microémulsion », même si les deux systèmes sont composés des mêmes ingrédients. En particulier, une confusion est souvent faite entre les NEs et les microémulsions (Anton et Vandamme, 2011) en raison de la similarité de leurs méthodes de préparation à basse énergie comme on le verra dans la Partie 6.1.

3 Mécanismes de déstabilisation des nanoémulsions

En général, les émulsions subissent des mécanismes de déstabilisation irréversibles (le mûrissement d'Ostwald et la coalescence) et réversibles (la floculation et la séparation

gravitationnelle). Au cours des phénomènes de déstabilisation irréversibles, les gouttelettes subissent un changement de taille de gouttelettes de façon qu'il soit impossible de restaurer l'état initial du système. Néanmoins, pendant les phénomènes réversibles la taille des gouttelettes reste stable, mais le système devient moins homogène concernant la distribution spatiale des gouttelettes (Tadros, 2013). Il est alors possible de restaurer l'homogénéité du système par simple agitation. Il est important de noter que, en général, les différents mécanismes de déstabilisation ne se produisent pas séparément. Les systèmes émulsionnés peuvent subir un ou plusieurs phénomènes simultanément avec une amplitude différente. La présence d'un de ces phénomènes peut favoriser la survenue d'un autre. La présence et l'importance de chaque mécanisme de déstabilisation dans les NEs en particulier seront discutées dans les Parties 3 et 8 de ce Chapitre.

3.1 Mûrissement d'Ostwald

Le mûrissement d'Ostwald est l'augmentation de la taille des gouttelettes au cours du temps. L'origine de ce phénomène provient de la polydispersité de la taille des gouttelettes et de la pression de Laplace. La force motrice de ce mécanisme est la solubilité de la phase dispersée dans la phase continue (Taylor, 1998). Pour une gouttelette sphérique, la pression de Laplace (ΔP , Pa) est définie comme la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la gouttelette, et donnée par l'équation de Laplace (Equation 1).

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \quad \text{Equation 1}$$

où γ est la tension interfaciale O/W ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$) et r est le rayon de la gouttelette (m). Cette équation montre que plus les gouttelettes sont petites plus la pression de Laplace est importante. Cela implique que le potentiel chimique dans les petites gouttelettes est plus élevé que dans les grosses gouttelettes. En conséquence, la solubilité de la phase dispersée dans les petites gouttelettes est plus importante que dans les grosses. Le retour vers l'équilibre thermodynamique se fait par un flux de matière de la phase dispersée à travers la phase continue (Figure 1) des petites gouttelettes vers les grosses jusqu'à la disparition complète des plus petites gouttelettes.

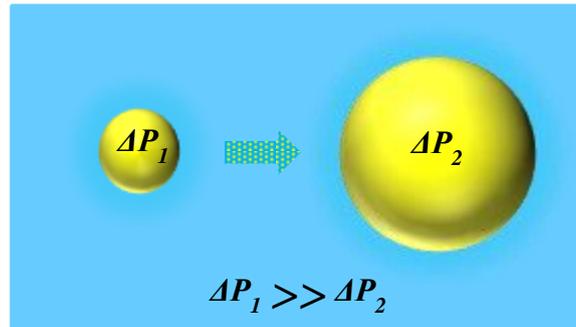


Figure 1 : Illustration du phénomène de mûrissement d'Ostwald dans une émulsion O/W (d'après Brochette, 1999).

La différence de potentiel chimique entre les gouttelettes de différentes tailles est donnée par l'équation de Kelvin (Equation 2) :

$$S_{(r)} = S_{(\infty)} \exp \left[\frac{2\gamma V_m}{rRT} \right] \quad \text{Equation 2}$$

où : $S_{(r)}$ est la solubilité de l'huile présentée sous forme de gouttes de rayon r (m), $S_{(\infty)}$ est la solubilité de l'huile quand la courbure est infinie, c'est-à-dire quand on atteint la séparation des phases, γ est la tension interfaciale O/W (N.m^{-1}), V_m est le volume molaire de l'huile ($\text{m}^3.\text{mol}^{-1}$), R est la constante des gaz parfaits ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) et T est la température absolue (K).

L'augmentation de la solubilité avec la diminution de la taille des gouttelettes implique que la concentration en huile au voisinage des petites gouttelettes est plus élevée qu'au voisinage des grosses, donc les molécules de l'huile tendent à diffuser du voisinage des petites gouttelettes vers les grosses en raison du gradient de concentration.

La vitesse du mûrissement d'Ostwald (ω , $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$) est donnée par l'Equation 3. Selon la théorie LSW de Lifshitz-Slyozov-Wagner (Lifshitz et Slyozov, 1961; Wagner, 1961), il y a une relation linéaire entre l'augmentation du rayon au cube ($r^3 \approx$ le volume) et le temps. La pente de cette relation est la vitesse du mûrissement d'Ostwald.

$$\omega = \frac{r^3 - r_0^3}{t} = \frac{8\gamma V_m S_\infty D}{9RT} \quad \text{Equation 3}$$

où r est le rayon moyen des gouttelettes (m) à un instant t (s), r_0 est le rayon moyen des gouttelettes (m) à $t = 0$ (le rayon initial), D est le coefficient de diffusion translationnelle de l'huile à travers la phase continue ($m^2.s^{-1}$).

En théorie, le mûrissement d'Ostwald va continuer jusqu'à la formation d'une seule goutte, c'est-à-dire jusqu'au déphasage total. Néanmoins, à partir d'une certaine taille (1 μm environ) la différence de solubilité devient extrêmement faible et insuffisante pour entraîner ce phénomène (Salager et *al.*, 2006).

Plusieurs stratégies ont été développées pour éviter le mûrissement d'Ostwald. Parmi elles on peut citer :

- L'utilisation d'une phase huileuse avec une très faible solubilité dans l'eau. En effet, la déstabilisation par mûrissement d'Ostwald est peu présente dans une NE préparée avec une huile ayant une très faible solubilité dans l'eau telle que les triglycérides à longues chaînes aliphatiques (ex : huile de maïs, de soja et de tournesol). Néanmoins, ce phénomène peut se produire rapidement dans une NE préparée avec une huile de solubilité plus importante telle que les triglycérides à courtes chaînes et les huiles essentielles (Jafari et *al.*, 2007; McClements, 2011; Ahmed et *al.*, 2012).
- L'ajout de composés hydrophobes dits «ultrahydrophobes» dans la phase huileuse afin de réduire sa solubilité dans la phase aqueuse (Landfester et *al.*, 1999).
- L'utilisation d'un mélange de deux huiles de solubilités différentes dans la phase aqueuse : l'huile la plus soluble a tendance à migrer davantage à partir des petites gouttelettes vers les grosses, ce qui conduit à former des grosses gouttes riches en huile la plus soluble et des petites gouttes riches en huile la moins soluble. La différence de composition est thermodynamiquement défavorable en raison de l'entropie de mélange (il est plus favorable d'avoir les deux lipides répartis uniformément dans l'ensemble des gouttelettes). En conséquence, il en résulte une force motrice d'origine entropique agissant dans le sens opposé à l'effet du mûrissement d'Ostwald (Tadros et *al.*, 2004).
- L'utilisation de polymères fortement adsorbés à interface. Les polymères ayant une activité de surface se déplacent vers l'interface après l'émulsification. Cela permet à la fois de réduire la tension interfaciale en synergie avec le tensioactif, et de

former une couche compacte à l'interface limitant le mûrissement d'Ostwald (Durand et *al.*, 2004; McClements, 2011; Chebil et *al.*, 2013).

3.2 Coalescence

La coalescence est l'inverse de l'étape de dispersion. Les gouttes vont fusionner pour former une goutte plus grosse suite à la rupture du film de phase continue entre elles, et arriver *in fine* au déphasage total (Figure 2). Tous les phénomènes qui favorisent le rapprochement des gouttes placent le système dans une situation *a priori* favorable à la coalescence.

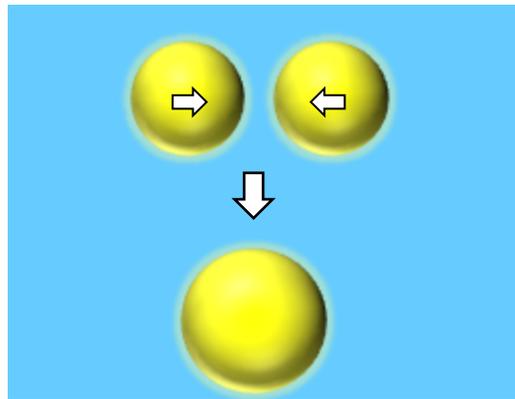


Figure 2 : Illustration du phénomène de la coalescence entre deux gouttelettes.

La présence de la coalescence comme mécanisme principal de déstabilisation est généralement vérifiée par la présence d'une relation linéaire entre l'inverse du carré du rayon moyen des gouttelettes ($1/r^2$) et le temps et par la présence d'élargissement de la distribution de taille (Deminiere et *al.*, 1999). Nazarzadeh et *al.* (2013) ont estimé que la cinétique de la coalescence peut être dépendante du mouvement brownien des gouttelettes, qui induit leur collision et ensuite la coalescence. Elle dépend alors du rayon moyen des gouttelettes au cube (r^3). De cette façon, il n'est pas toujours simple de distinguer entre la coalescence et le mûrissement d'Ostwald. Ces derniers auteurs ont constaté que la coalescence est plus probable avec une faible concentration en tensioactif quand les gouttelettes ne sont pas complètement recouvertes par le tensioactif. Une tension interfaciale très faible peut aussi augmenter la coalescence puisque la déformation des gouttelettes lors de leur collision est facile (Solans et *al.*, 2002).

3.3 Flocculation

La flocculation est un processus physico-chimique au cours duquel les gouttelettes d'une émulsion s'agglomèrent pour former des grappes dites « flocs » plus grosses. L'origine du phénomène de flocculation est une compétition entre l'agitation thermique et les forces d'interactions inter-gouttelettes. Une gouttelette de la phase dispersée est animée d'un mouvement brownien induit par les chocs avec les molécules de solvant, et qui provoque des chocs entre gouttelettes elles-mêmes. De l'autre côté, les gouttelettes de l'émulsion sont attirées les unes aux autres par les interactions de van der Waals, et se repoussent par la répulsion due aux doubles couches électrostatiques. Les doubles couches électrostatiques proviennent de l'existence d'une charge à la surface des gouttelettes. Cela implique que les ions du milieu vont s'organiser en deux couches non homogènes appelées double couche électrique (Figure 3).

Dans la première (couche de Stern), les ions avec une charge de signe opposé à celle de la surface (contre-ions) vont se concentrer autour de la gouttelette. Dans la seconde (couche de diffusion), les ions avec la charge de même signe (co-ions) seront repoussés vers l'extérieur. Loin de la surface, la concentration en ions positifs et négatifs est la même, ce qui induit un milieu électriquement neutre. Lorsque deux gouttes chargées se rapprochent, l'interpénétration des doubles couches électriques va générer un potentiel de répulsion électrostatique.

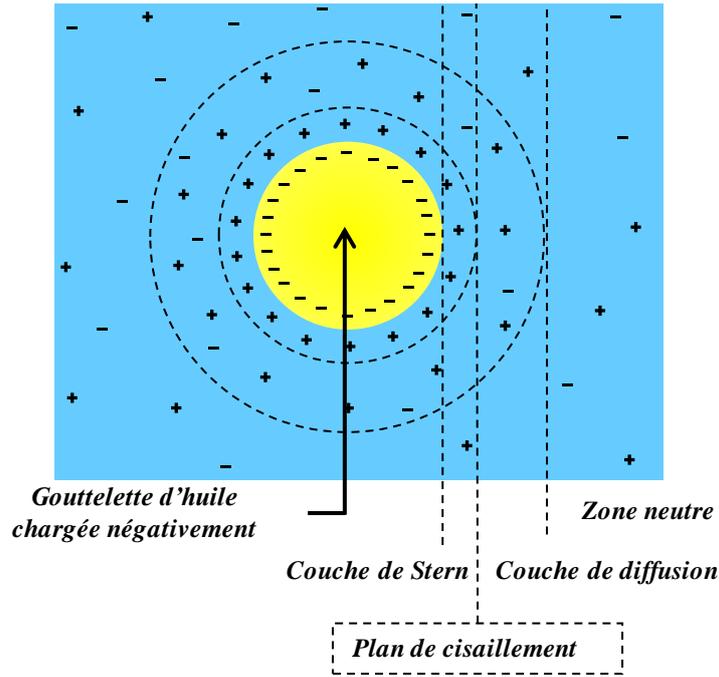


Figure 3 : Double couche électrique autour d'une gouttelette chargée négativement.

L'énergie d'interaction de van der Waals (W_{VDWS} , J) et l'énergie de répulsion des doubles couches électrostatiques (W_R , J) sont données par les Equations 4 et 5 (Shaw, 1992).

$$W_{vdws} = -\frac{Ar}{12L} \quad \text{Equation 4}$$

$$W_R = \frac{64\pi\epsilon r K_B^2 T^2}{\rho^2 z^2} \exp[-\kappa L] \left[\frac{\exp\left[\frac{ze\psi}{2K_B T}\right] - 1}{\exp\left[\frac{ze\psi}{2K_B T}\right] + 1} \right]^2 \quad \text{Equation 5}$$

où A est la constante de Hamaker (J), r est le rayon de la gouttelette (m), L est la distance entre deux gouttelettes (m), ϵ est la permittivité de la phase continue ($\text{kg}^{-1} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{sec}^4 \cdot \text{A}^2$), ρ est la masse volumique de la phase continue ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), z est le nombre de charges, κ est l'inverse de la longueur de Debye (m^{-1}), e est la charge de l'électron ($= 1,6 \times 10^{-19}$ C), ψ est le potentiel électrostatique à mi-distance entre les gouttelettes (V), K_B est la constante de Boltzmann ($= 1,38 \times 10^{-23}$ J.K⁻¹) et T est la température absolue (K).

D'autres mécanismes ont été proposés pour la floculation tels la floculation par déplétion et la floculation par pontage (Dickinson, 1989).

La floculation par déplétion se produit dans les émulsions où on utilise un excès d'émulsifiant dans la phase continue sous forme de micelles ou bien des chaînes de polymère. Lorsque deux gouttelettes se rapprochent, les objets micellaires ou polymériques n'accèdent plus à l'espace séparant les deux gouttelettes en raison d'empêchement stérique. Cela implique une différence de pression osmotique entre la phase continue et la zone séparant les gouttelettes qui favorise un flux de liquide de la zone «inter-gouttelettes» vers le reste de la phase continue qui provoque le rapprochement des gouttelettes comme illustré sur la Figure 4.

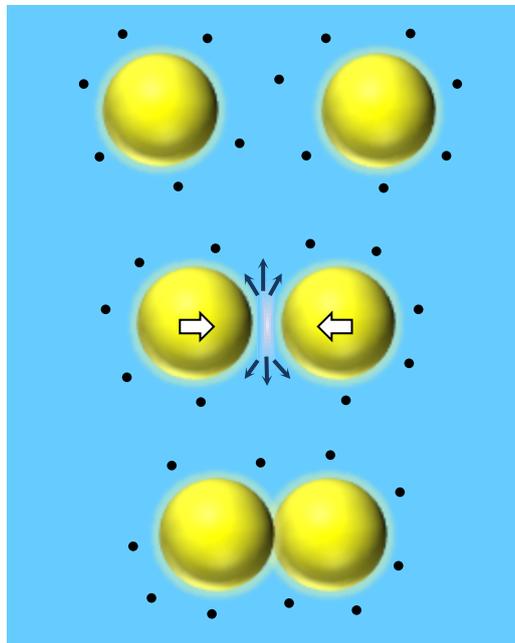


Figure 4 : Illustration de la floculation par déplétion (d'après Brochette, 1999).

La floculation par pontage est induite par l'adsorption à la surface des gouttes de polymère de masse molaire élevée. Ce polymère peut s'adsorber simultanément sur plusieurs gouttes, réalisant un «pontage» qui va induire la floculation.

3.4 Sédimentation ou crémage

La sédimentation observée pour les émulsions W/O et le crémage observé pour les émulsions O/W sont le résultat du même phénomène, dont le moteur est la pesanteur. Une

gouttelette de la phase dispersée est animée d'un mouvement brownien aléatoire. La même gouttelette est aussi soumise au champ de pesanteur terrestre, qui tend à imposer un mouvement vers le bas (sédimentation) si la goutte est plus dense que la phase continue ou vers le haut (crémage) dans le cas contraire. Cette compétition entre agitation brownienne et pesanteur aboutit à une inhomogénéité de l'émulsion laissée au repos.

La vitesse de migration des gouttelettes (v , m.s^{-1}) (par crémage ou par sédimentation) est décrite par la loi de Stokes (Equation 6) :

$$v = \frac{2}{9} \times \frac{\Delta\rho g r^2}{\eta_c} \quad \text{Equation 6}$$

où g est l'accélération due à la pesanteur (m.s^{-2}), $\Delta\rho$ est la différence entre les masses volumiques des phases (kg.m^{-3}), r est le rayon de la goutte (m) et η_c est la viscosité dynamique de la phase continue (Pa.s). Le rayon de gouttelettes a donc l'effet le plus important sur la vitesse de la séparation gravitationnelle. La différence de densité entre les deux phases joue aussi un rôle favorable à la séparation. De l'autre côté, la viscosité de la phase continue a un effet limitant sur la séparation gravitationnelle.

4 Agents émulsionnants utilisés pour la formulation des nanoémulsions

La formulation des NEs, en raison de l'énergie libre à l'interface, nécessite l'utilisation d'une classe d'ingrédients appelés agents émulsionnants (ou émulsifiants). Les agents émulsionnants sont des molécules amphiphiles. Ils possèdent une activité interfaciale liquide-liquide qui peut réduire la tension interfaciale et, par conséquent, rendre possible l'obtention et la stabilisation des émulsions. De façon générale, on peut classer les agents émulsionnants dans deux groupes différents : les tensioactifs de faible masse molaire et les agents émulsionnants macromoléculaires (ou polymériques). En dehors de cette classification, il y a aussi la stabilisation de Pickering par des fines particules solides.

4.1 Tensioactifs de faible masse molaire

Traditionnellement, la formulation des émulsions fait appel à l'utilisation de tensioactifs de faible masse molaire. Les tensioactifs de ce groupe sont composés d'une tête hydrophile (polaire) et d'une chaîne hydrophobe ou lipophile (apolaire). Ces molécules vont donc rechercher des milieux possédant à la fois des caractéristiques hydrophiles et lipophiles. Elles vont ainsi s'adsorber aux surfaces libres ou aux interfaces et réduire la tension interfaciale. Les tensioactifs sont classés suivant la nature de la tête polaire. On distingue deux groupes distincts : les tensioactifs ioniques (anioniques, cationiques ou amphotères) et les tensioactifs non ioniques tels que les tensioactifs éthoxylés (Rosen et Kunjappu 2012). Les tensioactifs utilisés pour la stabilisation des NEs pharmaceutiques seront détaillés dans la Partie 9.

4.2 Agents émulsionnants macromoléculaires (polymères)

Il est possible de stabiliser les émulsions par des polymères. Les polymères utilisés dans ce domaine, appelés parfois tensioactifs polymériques, sont classés généralement dans deux groupes : (1) les homopolymères, tels que le poly(oxyéthylène) PEO et la poly(vinylpyrrolidone) PVP, qui sont les moins efficaces et, à notre connaissance, non utilisés pour la stabilisation des NEs, et (2) les copolymères à blocs tels que le Poloxamer qui est composé de deux blocs de polyéthylène glycol et un bloc de polypropylène glycol (Tadros, 2009). Des biopolymères ont été aussi étudiés pour la stabilisation des NEs alimentaires, tels que l'amidon modifié (Mao et *al.*, 2009; Liang et *al.*, 2012 et 2013), et les protéines. Le cas des protéines sera détaillé dans la Partie 10.

4.3 Stabilisation de Pickering

Les émulsions peuvent être aussi stabilisées avec de fines particules solides. Cette approche a été bien étudiée durant la dernière décennie pour des macroémulsions. Les particules solides s'adsorbent à l'interface grâce à leur mouillabilité avec les deux phases (Binks et Lumsdon 2000). Les particules adsorbées à l'interface créent un film interfacial

rigide résistant à la coalescence des gouttelettes par un effet stérique. Très récemment, des études ont été effectuées sur la stabilisation de Pickering pour des NEs. Par exemple, Persson et *al.* (2014) ont préparé des NEs (100-200 nm) stabilisées par de la silice. Des NEs stabilisées par un mélange de protéines et β -cyclodextrine ont été rapportées parfois comme des NEs Pickering (Cheong et *al.*, 2016). Une autre étude a discuté la possibilité d'obtenir des NEs, dite « Nano-Pickering », par émulsification spontanée (Ridel, 2015).

5 Méthodes de stabilisation des nanoémulsions

Comme nous l'avons vu précédemment, les émulsions sont des systèmes hors équilibre thermodynamique. Néanmoins, le formulateur peut ralentir ou inhiber les mécanismes physiques qui conduisent normalement à la démixtion des phases non miscibles par différentes techniques. On peut trouver quatre types de stabilisation : les stabilisations rhéologique, stérique, électrostatique et électro-stérique.

5.1 Stabilisation rhéologique

Cette stratégie consiste à ajouter des additifs permettant d'augmenter la viscosité de la phase continue, tels que des polymères viscosifiants ou certains tensioactifs, de manière à ce que les gouttes dispersées soient moins mobiles et que la probabilité de choc entre les gouttelettes diminue. Cette stratégie est applicable pour limiter les problèmes de floculation, et/ou sédimentation ou crémage. Citons pour exemple, la pectine, qui est un polymère naturel (Howe et Pitt, 2008), et les dérivés du poly(acide acrylique) (Shakeel et *al.*, 2008).

5.2 Stabilisation stérique

La stabilisation stérique est une technique efficace face aux problèmes de floculation. Elle consiste à ajouter des macromolécules non-ioniques telles que des polymères amphiphiles, qui s'adsorbent à l'interface des gouttelettes. Ces couches macromoléculaires

agissent en créant une barrière physique qui augmente la distance entre les gouttes. Ce phénomène peut être interprété de deux manières. La première est l'effet entropique : si deux gouttelettes se rapprochent, les chaînes adsorbées à l'interface se compriment et réduisent leur volume, ce qui entraîne une diminution de l'entropie et provoque la répulsion désirée. La seconde explication est la répulsion osmotique due à l'interpénétration des couches adsorbées. Lors du rapprochement de deux gouttelettes, il y a une augmentation de la concentration en segments de polymère dans la région de recouvrement. Il y a alors un flux de solvant pour diluer cette surconcentration, ce qui tend à séparer les gouttes entre elles (Tadros, 2006).

5.3 Stabilisation électrostatique

La stabilisation électrostatique est applicable pour limiter les problèmes de floculation et de coalescence lorsque la phase continue est aqueuse ou bien un autre solvant de constante diélectrique élevée. Elle consiste à doter les gouttelettes d'une double couche ionique, soit en utilisant des tensioactifs ioniques ou ionisables (charges dépendant du pH), soit en adsorbant des polymères comportant des sites ionisables. Cela conduit à la formation de la double couche électrique comme précédemment vu (Partie 3.3). La présence d'une charge sur les gouttelettes est exprimée par le potentiel Zêta qui est défini comme le potentiel électrique au niveau du plan de cisaillement (Figure 3). On considère généralement qu'une valeur du potentiel zêta de l'ordre de 60 mV (en valeur absolue) garantit une stabilité totale contre la floculation. Cependant, il faut faire attention à la salinité de la phase continue, la portée des répulsions électrostatiques étant très rapidement réduite par écrantage des charges si la force ionique est augmentée.

5.4 Stabilisation électro-stérique

Il s'agit d'une combinaison des deux mécanismes de stabilisation, électrostatique et stérique, provoqués par des macromolécules possédant des groupements ioniques distribués sur la chaîne principale ou dans des ramifications. Les meilleurs exemples des stabilisants macromoléculaires ioniques sont les protéines (détaillées dans la Partie 10).

6 Formulation des nanoémulsions

Les NEs peuvent être préparées par différentes méthodes classées dans deux grandes catégories : les méthodes à haute énergie et les méthodes à basse énergie.

6.1 Méthodes d'émulsification à basse énergie

Le principe des méthodes à basse énergie est la formation spontanée de très fines gouttelettes lorsque l'on mélange les phases en présence d'agent émulsionnant ou quand on procède à un changement dans les conditions environnementales (McClements, 2010).

On peut classer ces méthodes à basse énergie en quatre catégories :

- La méthode d'émulsification spontanée, SE (pour *spontaneous emulsification*)
- La méthode de température d'inversion de phase, PIT (pour *phase inversion temperature*)
- La méthode de composition d'inversion de phase, PIC (pour *phase inversion composition*)
- La méthode de point d'inversion d'émulsion, EIP (pour *emulsion inversion point*)

Les trois dernières méthodes consistent à induire une inversion de phase. On distingue deux types d'inversion de phase d'émulsion :

- L'inversion catastrophique qui résulte de l'ajout progressif de la phase dispersée à la phase continue jusqu'au point où le tensioactif n'est plus capable de stabiliser une émulsion à une fraction volumique de la phase dispersée donnée.
- L'inversion transitionnelle est obtenue en modifiant la valeur du HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*) d'un système soit en changeant la température et/ou la concentration en électrolyte, soit en utilisant un mélange de plusieurs tensioactifs ayant des valeurs de HLB différentes à température constante.

6.1.1 Emulsification spontanée, SE (*spontaneous emulsification*)

Dans cette méthode, les NEs sont formées spontanément lorsque l'on mélange les différents constituants à une température particulière. Les méthodes d'émulsification spontanée varient en fonction de la composition des phases huileuse et aqueuse, des conditions environnementales (température, pH et force ionique) et des conditions du procédé de mélange. Celui-ci peut être mené soit par l'addition progressive de la phase huileuse contenant l'huile, les tensioactifs hydrophobes et un solvant organique miscible avec l'eau (tels que l'éthanol et l'acétone) à la phase aqueuse, soit par l'ajout de la phase aqueuse à la phase huileuse mentionnée précédemment.

On peut expliquer l'émulsification spontanée par le mécanisme suivant (McClements, 2011) : lors du mélange des deux phases, le solvant organique et le tensioactif se déplacent vers la phase aqueuse, ce qui crée une forte perturbation à l'interface. De plus, le mouvement rapide des composés miscibles avec l'eau développe largement l'interface en permettant la formation de gouttelettes huileuses entourées par la phase aqueuse comme un effet de bourgeonnement (Figure 5).

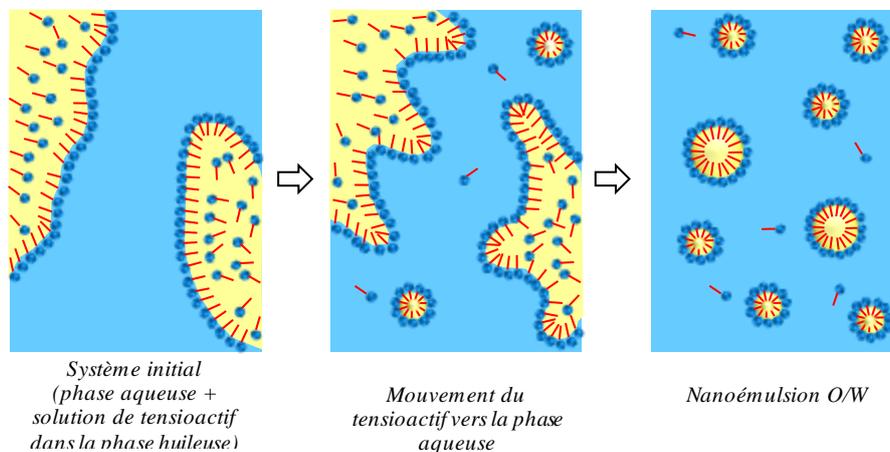


Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme proposé pour l'émulsification spontanée (d'après McClements, 2011).

Pour préparer de très petites gouttelettes, comme cela est exigé pour une NE, il est généralement nécessaire d'utiliser un ratio élevé de composés miscibles à la fois avec l'eau et avec l'huile dans la phase organique avant de mélanger celle-ci avec la phase aqueuse.

L'émulsification spontanée a un large domaine d'applications dans l'industrie pharmaceutique pour encapsuler et délivrer des SAs lipophiles. Les systèmes préparés en utilisant cette approche sont généralement décrits comme soit *Self-Emulsifying Drug Delivery Systems* (SEDDS) soit *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems* (SNEDDS) en fonction de la taille des gouttelettes produites.

6.1.2 Température d'inversion de phase, PIT (*phase inversion temperature*)

Le principe de la méthode de température d'inversion de phase est d'induire une inversion de phase (de W/O à O/W ou l'inverse) en passant par une phase intermédiaire dite « bicontinue » par le changement de la température. La force motrice de cette inversion de phase est le changement des propriétés physico-chimiques du tensioactif avec la température. Il peut s'agir du changement de sa solubilité dans l'eau. C'est le cas des tensioactifs non-ioniques tels que les tensioactifs éthoxylés qui sont particulièrement sensibles à la température. L'hydrophilie de ce genre de tensioactifs est déterminée par les interactions de type van der Waals entre le pôle hydrophile du tensioactif et la phase aqueuse, ce qui lui confère sa solubilité dans l'eau. En augmentant la température, le tensioactif devient moins hydrosoluble. Cela est dû à la prédominance de l'agitation thermique sur les interactions entre le pôle hydrophile et la phase aqueuse, et par conséquent, le tensioactif se déplace de la phase aqueuse vers la zone interfaciale en créant une extension de surface.

L'inversion de phase peut aussi être due à un changement de la géométrie de la molécule de tensioactif qui est décrite par le paramètre d'empilement p (Equation 7) (Israelachvili, 1992).

$$p = \frac{V}{L\alpha_0} \quad \text{Equation 7}$$

où V et L sont respectivement le volume (m^3) et la longueur (m) de la chaîne hydrophobe et α_0 est l'aire de section transversale de la tête hydrophile (m^2).

Pour une émulsion, le tensioactif s'adsorbe en monocouche à l'interface O/W. Le type de cette émulsion dépend de la géométrie du tensioactif qui est alors déterminée par le paramètre p . Pour $p < 1$, la courbure optimale de l'interface est convexe, donc on obtient une

émulsion O/W. Pour $p = 1$, la courbure s'annule et on obtient un système de phases bicontinues ou liquide cristallin et lorsque $p > 1$, la courbure est concave et on obtient une émulsion W/O.

Dans les deux cas, l'inversion d'un état à l'autre se fait à une température particulière dite « température d'inversion de phase », PIT, ou « température de trouble », CP, (*cloud point*) parce qu'elle correspond à la température à laquelle le tensioactif devient insoluble dans l'eau et précipite. Pour la température d'inversion de phase (PIT), $p = 1$, le tensioactif a la même affinité pour l'eau et pour l'huile, la tension interfaciale atteint alors un minimum et la taille des gouttelettes également.

Le procédé d'émulsification par cette méthode consiste à préparer une émulsion à une température supérieure à la PIT pour laquelle le tensioactif est plus soluble dans l'huile. De cette manière on obtient une émulsion W/O. Ensuite, le système est refroidi rapidement au-dessous de la PIT. Le tensioactif devient plus soluble dans l'eau et se déplace rapidement vers la phase aqueuse en formant une émulsion O/W avec des gouttelettes très fines comme dans l'émulsification spontanée. Cette méthode applique un procédé expérimental qui consiste à changer la température et qui ne se produit pas spontanément. Les systèmes obtenus sont donc des NEs (Anton et Vandamme, 2011). Cette méthode nécessite de chauffer les composés et il sera donc difficile d'incorporer des SAs thermosensibles telles que les peptides sans affecter leur stabilité. Il est néanmoins possible de réduire la PIT de la dispersion en utilisant un mélange de tensioactifs avec des caractéristiques appropriées, afin de minimiser la dégradation des principes actifs thermosensibles (Lovelyn et Attama, 2011).

6.1.3 Composition d'inversion de phase, PIC (*phase inversion composition*)

Le principe est similaire à celui de la température d'inversion de phase, la différence est qu'il s'agit ici de modifier la solubilité ou la géométrie du tensioactif en modifiant la composition. Pour cela, il est possible, par exemple, d'ajouter un sel qui neutralise la charge de la tête polaire du tensioactif et favorise la formation d'émulsions W/O. On peut aussi diluer une émulsion W/O à forte concentration en électrolyte avec de l'eau pour diminuer la force ionique au-dessous de sa valeur critique et, en conséquence, inverser cette émulsion.

6.1.4 Point d'inversion d'émulsion, EIP (*emulsion inversion point*)

Le changement de type d'émulsion par les méthodes PIT et PIC est dû à une inversion de phase transitionnelle, alors que celui observé pour la méthode EIP est une inversion de phase catastrophique. Cette dernière se fait par ajout progressif de la phase dispersée à une émulsion concentrée sous agitation jusqu'au point où le tensioactif n'est plus capable de stabiliser l'émulsion à une telle concentration en phase dispersée. La taille des gouttelettes obtenues dépend des conditions du procédé telles que la vitesse d'ajout de la phase dispersée et la vitesse d'agitation. La méthode nécessite un tensioactif capable de stabiliser à la fois des émulsions O/W et W/O, elle est donc limitée aux tensioactifs de petite taille.

6.2 Méthodes d'émulsification à haute énergie

Les méthodes d'émulsification à haute énergie utilisent une source externe de l'énergie par l'action de forces mécaniques pour fragmenter les gouttelettes. Le mélangeur simple à turbine rotative n'est pas suffisamment efficace pour obtenir des gouttelettes avec une taille nanométrique. Seuls les appareils mécaniques qui peuvent générer des forces disruptives très intenses sont capables de produire de telles gouttelettes. On utilise pour cela l'homogénéisateur et le microfluidiseur à haute pression (HP) et les appareils à ultrasons (McClements, 2011). L'émulsification par membrane peut être aussi utilisée pour la préparation des NEs.

6.2.1 Homogénéisation à haute pression, HPH (*high pressure homogenization*)

C'est une technique basée sur l'utilisation d'un homogénéisateur à valve haute pression pour produire des gouttelettes ultrafines. Cette méthode est actuellement la plus répandue pour l'obtention d'émulsions fines à l'échelle industrielle. Elle donne de meilleurs résultats quand on l'applique à des émulsions primaires préalablement préparées à partir de deux phases dispersées avec des mélangeurs à haute vitesse avant de passer à l'HPH.

L'homogénéisateur est équipé d'une pompe qui amène l'émulsion primaire dans une chambre au-dessus de l'appareil, puis la force à traverser une valve étroite à l'extrémité de

cette chambre. L'émulsion subit alors une combinaison de forces disruptives intenses (turbulence, cisaillement et cavitation). La turbulence, qui est le mécanisme prédominant de l'émulsification, conduit à la rupture des grosses gouttes en gouttelettes plus petites (Floury et *al.*, 2000).

Différents types de valves sont disponibles pour accroître l'efficacité de la perturbation des gouttelettes dans l'homogénéisateur en maintenant une pression élevée tout au long du procédé. On utilise, par exemple, un orifice ou une soupape à pointeau pouvant produire une élongation axiale (Figure 6-A), un cylindre concentrique rotatif (Figure 6-B) ou une soupape à starter (Figure 6-C) produisant tous les deux une élongation radiale (Salager et *al.*, 2006).

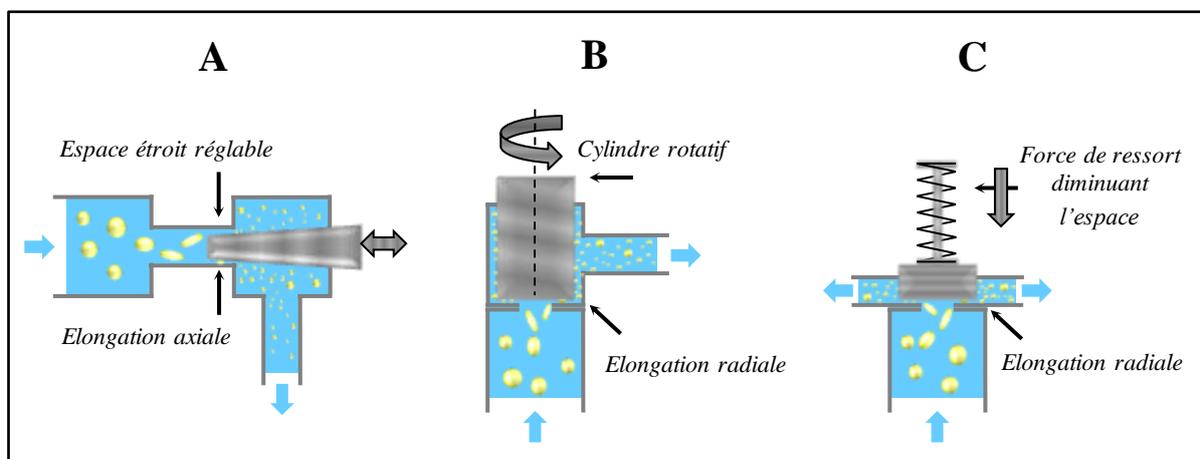


Figure 6 : Différents types de valves dans les homogénéisateurs à haute pression : (A) Soupape à pointeau, (B) soupape à cylindre rotatif et (C) soupape à starter (d'après Salager et *al.*, 2006).

Le procédé d'homogénéisation peut être continu ou discontinu. Le produit résultant peut être soumis à plusieurs cycles d'HPH jusqu'à obtenir la taille des gouttelettes de nanoémulsion et l'indice de polydispersité souhaités (Lovelyn et Attama, 2011; Tadros et *al.*, 2004).

La taille des gouttelettes obtenues par cette méthode a tendance à diminuer avec l'augmentation de la pression d'homogénéisation, de la durée du traitement pour le procédé continu ou du nombre de passages pour le procédé discontinu, avec l'accroissement de la vitesse d'adsorption d'émulsifiant à l'interface, et avec la diminution de la tension interfaciale. La viscosité des deux phases joue aussi un rôle important sur l'efficacité de l'homogénéisation. McClements (2011) a démontré que le rapport de viscosité entre la phase dispersée (η_d) et la phase continue (η_c) doit être dans la gamme de 0,05 à 5. Par ailleurs,

Tadros et *al.* (2004) ont rapporté que l'utilisation d'un mélange de plusieurs tensioactifs est plus efficace qu'un seul grâce à par l'augmentation du module élastique de dilatation de l'interface. Il convient de dissoudre préférentiellement le tensioactif dans la phase dispersée car cela conduit à des gouttelettes plus petites que le cas où le tensioactif est dissout dans la phase continue. Des études ont déjà montré que l'émulsification réalisée par étapes à pression croissante donne de meilleurs résultats surtout lorsque la viscosité de la phase dispersée est importante (Lovelyn et Attama, 2011).

6.2.2 Microfluidisation à haute pression, HPM (*high pressure microfluidization*)

Dans cette technique, on utilise un appareil « microfluidiseur » équipé d'une pompe volumétrique à HP qui force le produit à passer dans la chambre d'interaction qui contient des canaux très fins, dits "microcanaux". Ces derniers sont conçus de manière à ce que les deux courants de l'émulsion s'impactent à haute vitesse dans la chambre d'interaction, permettant d'obtenir des gouttelettes très fines submicroniques (Figure 7).

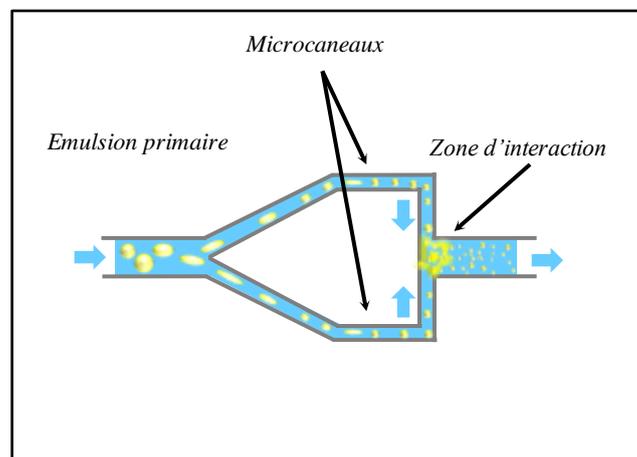


Figure 7 : Principe de fonctionnement d'un microfluidiseur (d'après McClements, 2011).

Lors de l'émulsification par cette méthode, les deux phases sont combinées et traitées dans un homogénéisateur en ligne pour obtenir une émulsion primaire. Ensuite, l'émulsion primaire est introduite dans la chambre d'interaction plusieurs fois jusqu'à obtenir la taille

souhaitée. Enfin, la nanoémulsion obtenue est filtrée pour éliminer les grosses gouttes et obtenir une nanoémulsion homogène monodisperse (Shah et *al.*, 2010). La taille des gouttelettes obtenues par cette méthode dépend des mêmes facteurs qu'avec l'HPH (McClements, 2011).

6.2.3 Sonication

La méthode de sonication est la méthode préférée avec les huiles de faible viscosité. Elle utilise des ondes ultrasoniques à une fréquence élevée (> 20 MHz) pour former des émulsions très fines. Il est possible par cette méthode de réduire la taille d'une émulsion préalablement préparée ou de produire directement des NEs à partir de deux phases séparées. Ces appareils se composent d'une sonde à ultrasons contenant un cristal piézo-électrique ou magnétostrictif en résonance (Figure 8) qui convertit les ondes électriques entrant en ondes ultrasoniques (McClements, 2011) en exerçant une pression acoustique oscillante autour de la pression hydrostatique déjà exercée sur le système.

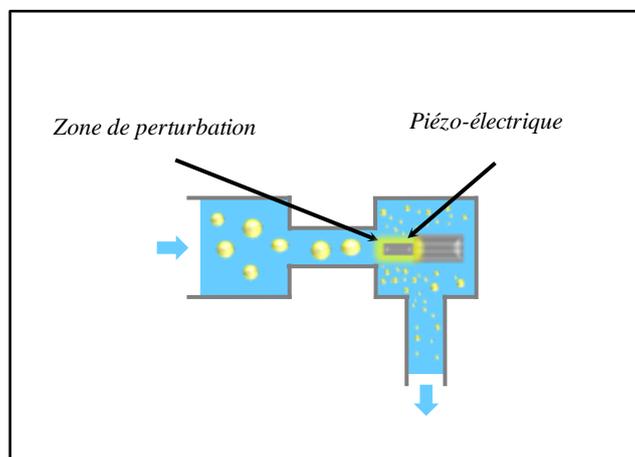


Figure 8 : Principe de fonctionnement d'un homogénéisateur à ultrasons (d'après McClements, 2011).

On peut estimer que la pression acoustique est une série d'ondes sinusoïdales. A faible intensité (amplitude), l'onde de pression entraîne un mouvement et un mélange des fluides, dit « flux acoustique ». A des intensités plus élevées, la pression locale dans l'étape de décompression du cycle est inférieure à la pression de vapeur du liquide, ce qui provoque l'apparition de petites bulles qui grossissent (créées à partir de noyaux de gaz existant dans le

fluide). Pendant l'étape de compression, les bulles rétrécissent et leur contenu est absorbé dans le liquide. Quand la surface des bulles grossit de nouveau, une partie de la vapeur revient à l'intérieur des bulles mais pas toute la quantité. Ce processus de compression, raréfaction et effondrement consécutifs des bulles s'appelle le phénomène de cavitation. Si les bulles de cavitation s'effondrent à côté de l'interface entre deux liquides immiscibles on obtient alors un mélange très efficace entre les deux liquides. La taille des gouttelettes obtenue par cette méthode diminue avec l'augmentation du temps et de l'énergie de sonication et de la concentration en agent émulsionnant.

L'apport d'énergie dans cette méthode est relativement faible comparé à celui de l'homogénéisation ou de la microfluidisation. De plus, le dépôt d'énergie ultrasonore est limité à un petit volume (1 cm³ dans la plupart des cas). Pour cette raison, l'utilisation de l'émulsification par ultrasons est limitée à l'échelle du laboratoire (Salager et *al.*, 2006).

6.2.4 Emulsification par membrane

Cette méthode est appelée parfois l'ultrafiltration (Nikiforidis et *al.*, 2011). Le principe de l'émulsification par membrane consiste à forcer les gouttes à traverser les pores d'une membrane de taille définie et très fine (Figure 9) par l'application d'un gradient de pression en faisant couler la phase continue tangentiellement à la membrane.

Les gouttelettes obtenues sont monodisperses et leur taille dépend de la taille des pores de la membrane, de sa mouillabilité et des conditions du procédé (la vitesse de flux de la phase dispersée, la pression transmembranaire, la cinétique d'adsorption de l'agent émulsionnant, la tension interfaciale, la vitesse tangentielle de la phase continue). Salager et *al.* (2006) ont conclu que ces membranes ne peuvent pas produire des nano-gouttelettes. Néanmoins, des études récentes sur une membrane hydrophile ont démontré que l'optimisation du procédé, notamment de la pression transmembranaire et de la vitesse d'agitation de la phase continue, permet d'obtenir des NEs avec des tailles des gouttelettes nanométriques (< 200 nm) 25 fois plus petites que la taille des pores de la membrane (Oh et *al.*, 2011; Laouini et *al.*, 2012).

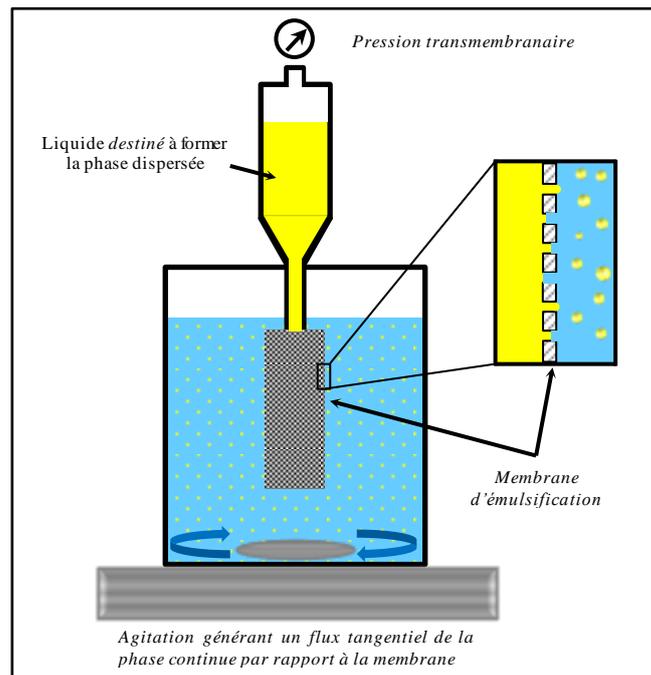


Figure 9 : Principe de fonctionnement de l'émulsification par membrane (d'après Oh *et al.*, 2011).

6.3 Aspects thermodynamiques de la formation des nanoémulsions

Pour préparer une émulsion, il est nécessaire d'avoir une phase aqueuse, de l'huile, des agents tensioactifs et un apport d'énergie. L'énergie est nécessaire pour accroître l'interface O/W. La relation suivante (Equation 8) permet le calcul de la variation d'énergie libre de Gibbs du système au cours de la préparation d'une émulsion ΔG (J) à la température T constante :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = \gamma\Delta A - T\Delta S \quad \text{Equation 8}$$

où ΔH est la variation de l'enthalpie (J), T est la température absolue (K), ΔS est la variation de l'entropie ($J.K^{-1}$), γ est la tension interfaciale ($N.m^{-1}$) et $\Delta A = A_2 - A_1$ est la variation de l'aire de l'interface O/W (m^2), A_1 étant l'interface avant le mélange. Celle-ci est négligeable devant l'interface (A_2) obtenue après avoir formé un très grand nombre de gouttelettes.

Le terme entropique $T\Delta S$ est négligeable à moins que les gouttelettes ne soient extrêmement petites (Salager *et al.*, 2006). De plus, la tension interfaciale est positive ($\gamma > 0$).

Donc, la variation de l'enthalpie est élevée et positive et ne peut pas être compensée par l'entropie du système $T\Delta S$ ($\Delta H \gg T\Delta S$). Dans ce cas, l'énergie libre de Gibbs (ΔG) est positive et la formation des gouttelettes n'est pas spontanée. Un apport d'énergie est indispensable pour produire la dispersion.

Pour les méthodes de préparation à basse énergie, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'expansion de l'interface sans apport externe d'énergie tels qu'une tension interfaciale négative, la turbulence interfaciale et la diffusion (López-Montilla et al., 2002). Le mécanisme de la tension interfaciale négative est valable pour le cas des microémulsions où il y a une combinaison de tensioactifs et co-tensioactifs à des concentrations élevées. Néanmoins, la tension interfaciale dans les NEs ne peut pas être négative. Plus récemment, l'émulsification spontanée a été interprétée par le potentiel chimique des composés (tensioactifs, co-tensioactifs et solvants) (Salager et al., 2004). En effet, dans toutes les méthodes à basse énergie, un transfert de masse se produit entre les deux phases. Ce transfert de masse peut fournir l'énergie requise si la tension interfaciale est faible.

Pour les méthodes à haute énergie, il y a un apport d'énergie externe au système pour augmenter l'énergie libre de Gibbs correspondant à l'augmentation de l'interface. Cet apport d'énergie se fait par une contrainte mécanique qui s'applique directement sur la goutte pour la rompre en gouttelettes plus petites.

La raison pour laquelle le niveau d'énergie requis par les méthodes à haute énergie est important est que les forces disruptives générées doivent être supérieures aux forces de rappel qui maintiennent la forme sphérique des gouttelettes (McClements, 2011). Ces forces de rétablissement sont déterminées par la pression de Laplace (Equation 1, Partie 3.1) qui est inversement proportionnelle au rayon de la gouttelette et est donc plus importante dans les petites gouttelettes que dans les grosses. Pour rendre possible la déformation d'une petite goutte, il faut exercer une contrainte plus importante que la pression de Laplace afin de permettre la déformation de la goutte en ellipsoïde de longueur supérieure à au moins quatre fois le diamètre initial de la goutte, avant la rupture complète en deux gouttelettes plus petites (Salager et al., 2006, McClements, 2011). La pression de Laplace ΔP (Pa) dans la goutte déformée en ellipsoïde allongé est donnée par l'Equation 9 :

$$\Delta P = \gamma \left[\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right] \quad \text{Equation 9}$$

où r_1 et r_2 sont les deux rayons de courbure de l'ellipsoïde (m).

De plus, seulement 0,1 à 1 % de l'énergie dépensée, par n'importe quelle méthode à haute énergie, est utilisé pour créer de l'interface à cause du faible transfert d'énergie du moyen d'agitation vers l'interface (Salager et *al.*, 2006). Le reste est dissipé sous forme de chaleur (Tadros et *al.*, 2004).

Pour expliquer l'aptitude ou la résistance des gouttelettes à la déformation, on utilise le nombre de Weber ou le nombre capillaire, Ca. Il s'agit d'un nombre sans dimension qui représente le rapport entre l'apport d'énergie et l'énergie capillaire (due à la tension interfaciale). On peut aussi le définir comme le rapport entre la contrainte de cisaillement τ (Pa) (Equation 10) et la pression de Laplace ΔP (Taylor 1934) :

$$Ca = \frac{\tau}{\Delta P} \quad \text{Equation 10}$$

avec

$$\tau = \eta_c \dot{\gamma} \quad \text{Equation 11}$$

où η_c est la viscosité de la phase continue (Pa.s) et $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement (s^{-1}). Dans le cas d'une sphère, le nombre capillaire est donné par l'Equation 12 :

$$Ca = \frac{\dot{\gamma} \eta_c r}{2\gamma} \quad \text{Equation 12}$$

où r est le rayon de la gouttelette (m) et γ est la tension interfaciale ($N.m^{-1}$).

Ce paramètre permet de décrire la déformation de la gouttelette en le comparant avec un nombre capillaire critique Ca_c dont la valeur dépend du ratio entre la viscosité de phase dispersée η_d et celle de la phase continue η_c . Si $Ca > Ca_c$ la rupture de gouttelettes se produit (Grace, 1982; Jackson et Tucker, 2003).

7 Caractérisation des nanoémulsions

7.1 Analyse granulométrique

La taille et la distribution de taille des gouttelettes d'une NE sont des paramètres importants parce qu'elles influencent la stabilité de la NE, ses propriétés rhéologiques et optiques, la libération des SAs encapsulées, l'interaction des gouttelettes avec les membranes biologiques, etc. (McClement et Rao, 2011). La mesure de taille submicronique nécessite l'utilisation de techniques adaptées à la taille nanométrique telles que la diffusion dynamique de la lumière, la microscopie électronique ou la microscopie à force atomique.

7.1.1 Diffusion dynamique de la lumière

Le principe de la diffusion dynamique de la lumière DLS (*dynamic light scattering*) repose sur le mouvement brownien des gouttelettes et la diffusion de la lumière par celles-ci. On peut le résumer comme suit. Les petites gouttelettes se déplacent plus rapidement que les grosses gouttelettes sous l'effet du mouvement brownien. Les appareils basés sur la DLS projettent un faisceau laser sur l'échantillon. Puis, des dispositifs optiques adaptés mesurent la fluctuation de l'intensité de la lumière diffusée (Tscharnuter, 2000).

Deux théories peuvent être utilisées pour l'interprétation de la diffusion de la lumière. La théorie de Rayleigh est appliquée pour des tailles des particules plus petites que la longueur d'onde de la lumière utilisée (λ) (typiquement $d_h < \lambda/10$, $\lambda = 633$ nm pour le laser hélium-néon actuellement utilisé dans certains appareils). Les gouttelettes de cette taille diffusent la lumière de façon isotrope, c'est-à-dire que la lumière diffuse avec la même intensité dans toutes les directions. Cette intensité est proportionnelle à d_h^6 et à $1/\lambda^4$. La deuxième est la théorie de Mie. Celle-ci suggère que pour les tailles des gouttelettes $\lambda > d_h > \lambda/10$, la diffusion devient anisotrope (dépendante de la direction), et quand $d_h \geq \lambda$ l'intensité de la lumière diffusée montre un minimum et un maximum de diffusion.

Le diamètre mesuré par DLS est le diamètre hydrodynamique d_h (m) et défini comme le diamètre d'une sphère équivalente qui a le même coefficient de diffusion translationnelle que la gouttelette. Il est donné par l'équation de Stokes-Einstein (Equation 13) :

$$d_h = \frac{K_B T}{3\pi\eta_c D} \quad \text{Equation 13}$$

où η_c est la viscosité de la phase continue (Pa.s), D est le coefficient de diffusion translationnelle ($m^2.s^{-1}$), K_B est la constante de Boltzmann ($J.K^{-1}$) et T est la température absolue (K).

La force ionique du milieu modifie la double couche électrique des gouttelettes et, par conséquent, le diamètre hydrodynamique mesuré. La DLS permet de calculer l'indice de polydispersité PDI (*Polydispersity index*) de la distribution de taille. Cependant, quand la distribution de taille est bi-modale ou poly-modale, l'interprétation de la diffusion de la lumière devient compliquée et les résultats deviennent moins représentatifs (Benita et Levy, 1993; Jamting et al., 2011).

La DLS nécessite de diluer l'échantillon pour éviter la diffusion multiple, ce qui peut fausser les résultats. Pour cette raison les phénomènes de déstabilisation réversibles tels que la floculation ne sont pas détectés par cette méthode. La DLS, à cause de ses limites de résolution (2 - 3 nm) ne peut également pas distinguer les structures présentes dans les NEs autres que les gouttelettes telles que les agrégats des tensioactifs et les micelles (Klang et Valenta, 2011).

7.1.2 Microscopie électronique

Les microscopes optiques ne permettent pas de visualiser les gouttelettes de moins de 500 nm. Seuls les microscopes électroniques peuvent être utilisés pour cela. Ces méthodes microscopiques donnent des informations sur la taille des gouttelettes et aussi sur leur morphologie et leur structure. L'analyse des NEs par ces méthodes est faisable sans préparation préalable de l'échantillon. Cependant, la comparaison des images avant et après une étape de préparation permet de gagner plus d'information. La cryo-préparation est la méthode préférée. La coloration négative avec les sels des métaux lourds de numéro atomique

de 42 à 92 tels que le molybdène, le tungstène et l'uranium est la méthode la plus simple. Pour les NEs, l'acide phosphotungstique ou ses sels et l'acétate d'uranyle sont les plus fréquemment utilisés. Toutes ces méthodes de préparation risquent de modifier la structure de l'échantillon. Le positionnement ou la réaction des métaux lourds peuvent être sélectifs (Klang *et al.*, 2012).

7.1.3 Microscopie à force atomique

Le principe de la microscopie à force atomique AFM (*atomic force microscope*) est basé sur l'interaction attraction/répulsion entre les atomes de la surface de l'échantillon et une sonde constituée d'une pointe nanométrique. Le balayage de l'échantillon par la pointe permet d'établir sa topographie sous forme d'image tridimensionnelle. La microscopie à force atomique a été utilisée avec succès pour l'analyse des NEs (Fang *et al.*, 2004; Preetz *et al.*, 2010; Marxer *et al.*, 2011).

7.2 Charge de surfaces des gouttelettes

Les gouttelettes d'une NE possèdent généralement une charge électrique à cause de l'adsorption de surfactants ioniques, d'ions minéraux ou de biopolymères à leur surface. La charge des gouttelettes joue un rôle important dans la stabilité des NEs et leur adhésion sur les membranes biologiques lors d'une application thérapeutique (McClements, 2011). La charge de gouttelettes est reflétée par le potentiel au plan du cisaillement (ou potentiel Zêta) (Figure 3, Partie 3.3). La méthode la plus répandue pour la mesure du potentiel Zêta (ζ) est basée sur la mesure de la mobilité électrophorétique (U_E) des particules. Dans cette méthode, l'échantillon est soumis à un champ électrique. Les gouttelettes vont alors se déplacer avec une vitesse qui dépend du champ électrique appliqué, de la constante diélectrique (ϵ_r), de la viscosité de la phase continue (η_c , Pa.s) et du potentiel Zêta (ζ). L'équation de Henry (Equation 14) permet de calculer le potentiel Zêta à partir de la mobilité électrophorétique :

$$U_E = \frac{2\varepsilon_r \zeta f(Ka)}{3\eta_c} \quad \text{Equation 14}$$

où est $f(Ka)$ est la fonction d'Henry qui dépend du rapport du rayon de la goutte et de l'épaisseur de la double couche électrique.

7.3 Comportement rhéologique

Le comportement rhéologique des émulsions en général est un aspect très important de leurs propriétés et leurs applications. La rhéologie des émulsions dépend de la rhéologie de la phase continue (η_c), de la granulométrie des gouttelettes et de leurs interactions. Les NEs présentent des propriétés rhéologiques différentes en comparaison avec des émulsions classiques ayant la même teneur en huile en raison de la très petite taille des gouttelettes (McClements, 2011). Cependant, les mêmes techniques peuvent être utilisées pour caractériser les émulsions classiques et nanométriques. Différents types de viscosimètres classiques ont été utilisés pour la mesure de viscosité des NEs tels que le viscosimètre capillaire d'Ostwald (Gallarate et al., 2013), ou le viscosimètre vibrant (Salvia-Trujillo et al., 2015; Guerra-Rosas et al., 2016). Les viscosimètres classiques supposent que les NEs sont des liquides newtoniens et permettent donc seulement de mesurer la viscosité apparente à une contrainte fixe (dépendant de la conception du viscosimètre) qui n'est pas un caractère absolu. L'étude plus approfondie du comportement rhéologique des émulsions nécessite l'utilisation d'une autre gamme d'appareillages dits rhéomètres. Cela permet de réaliser la courbe d'écoulement ou le rhéogramme d'une émulsion. Les rhéomètres les plus fréquents pour la caractérisation des NEs sont les rhéomètres rotatifs tels que le rhéomètre à cylindres coaxiaux (Maher et al., 2011; Ševčíková et al., 2012; Tabibiazara et al., 2015; Calligaris et al., 2016), à plateaux parallèles (Ru et al., 2010; Maher et al., 2011) ou à cône-plan (Gimeno Sandiga et al., 2013; Dario et al., 2016).

Pour décrire le comportement rhéologique d'une NE, le rhéogramme de celle-ci est ajusté avec les modèles théoriques généraux pour des fluides. Les modèles le plus couramment utilisés pour les rhéogrammes sans seuil d'écoulement sont le modèle d'Ostwald-de-Waele et le modèle de Cross.

Le modèle d'Ostwald-de-Waele (Ostwald, 1925) ou la loi de puissance (Equation 15) est un modèle à deux paramètres ajustables (K et n) :

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad \text{Equation 15}$$

où τ est la contrainte de cisaillement (Pa), K est l'indice de consistance ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$), $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement (s^{-1}) et n est l'indice de fluidification avec $n < 1$ pour les fluides rhéofluidifiants, $n = 1$ pour les fluides newtoniens et $n > 1$ pour les fluides rhéoépaississants.

Le modèle de Cross (Cross, 1965) (Equation 16) est un modèle à quatre paramètres ajustables (η_0 , η_∞ , β et n). Il prend en compte les deux limites du rhéogramme, c'est-à-dire la viscosité à cisaillement nul η_0 et celle à cisaillement infini η_∞ (Pa.s).

$$\tau = \left[\eta_\infty + \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + (\beta\dot{\gamma})^{1-n}} \right] \times \dot{\gamma} \quad \text{Equation 16}$$

où β est une constante associée à la rupture des liens structurels entre les gouttelettes.

Les rhéogrammes peuvent montrer un seuil d'écoulement. Les modèles théoriques sont alors le modèle de Bingham (Bingham, 1922) (Equation 17) ou le modèle de d'Herschel-Bulkley (Herschel et Bulkley, 1926) (Equation 18).

$$\tau = \tau_0 + \alpha\dot{\gamma} \quad \text{Equation 17}$$

$$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n \quad \text{Equation 18}$$

où τ_0 est le seuil de contrainte (Pa) et α est un coefficient appelé viscosité plastique (Pa.s).

A faible fraction volumique de la phase huileuse et à faible taille de gouttelettes, les NEs O/W peuvent se comporter comme des liquides newtoniens (Barradas et *al.*, 2015; Clares et *al.*, 2014). Cependant, le comportement le plus typique des NEs est le comportement rhéofluidifiant (Howe et Pitt, 2008; Lante et Friso, 2013; Harwansh et *al.*, 2015). L'addition

de polymères hydrophiles à la phase est la technique la plus fréquemment utilisée pour modifier la structure et le comportement rhéologique des NEs (Gupta et *al.*, 2016).

7.4 Stabilité

Les NEs, comme toute formulation pharmaceutique, doivent présenter une stabilité physique, une stabilité chimique de ses composés et une stabilité microbiologique. Toutefois, les aspects de stabilité spécifiques aux NEs sont la stabilité physique contre les différents mécanismes de déstabilisation (Partie 3) et la stabilité chimique de l'huile, en particulier, sa stabilité oxydative.

L'analyse de la stabilité physique des NEs s'effectue par le suivi de leurs caractéristiques physiques lors du vieillissement en temps réel ou du vieillissement accéléré. Selon les directives générales de l'*International Conference on Harmonisation*, ICH, l'étude de stabilité doit être effectuée à 25° C pendant 12 mois pour le vieillissement en temps réel et à 40° C pendant 6 mois pour le vieillissement accéléré. La mesure de taille des gouttelettes au cours du temps est évidemment la façon la plus appropriée pour diagnostiquer la présence ou l'absence des phénomènes de croissance des gouttelettes (le mûrissement d'Ostwald et la coalescence). Cependant, la méthode la plus couramment utilisée pour la mesure de taille des gouttelettes, la DLS, ne permet pas de déterminer les phénomènes de déstabilisation réversible tels que la floculation en raison de la dilution indispensable à cette méthode pour éviter les phénomènes de diffusion multiple.

Le test de stabilité contre le crémage est fréquemment rencontré pour les études de stabilité physique des NEs O/W (Adjonu et *al.*, 2014; Anu Bhushania et *al.*, 2016; Cheong et Nyam, 2016). Ce test consiste en la conservation des NEs dans des tubes inertes à température ambiante, et ensuite en la mesure de la hauteur de la couche de crémage à des intervalles de temps prédéfinis. La stabilité des NEs, mesurée par cette méthode, est présentée par l'indice de crémage $I_{\text{Créimage}}$ (% , Equation 19) :

$$I_{\text{Crémage}} = \left(\frac{H_C}{H_T} \right) \times 100 \quad \text{Equation 19}$$

où H_C et H_T sont respectivement la hauteur de la couche de crémage et la hauteur totale de la nanoémulsion dans le tube. Cette méthode basée sur l'observation visuelle de la séparation des phases manque de précision. Le défaut étant que la séparation des phases peut déjà avoir commencé avant de pouvoir la constater à l'œil nu.

La mesure de turbidité est couramment utilisée pour les NEs à des fins alimentaires pour évaluer leur stabilité et aussi pour étudier leur transparence. Des modules expérimentaux ont été développés pour évaluer la vitesse de floculation lors du vieillissement des NEs à partir de la mesure de la turbidité (Rahn-Chique et *al.*, 2012). La mesure de la turbidité s'effectue bien évidemment dans le spectre visible (à 600 nm dans la plupart des études) (Zhang et *al.*, 2016; Saberi et *al.*, 2013a). A l'instar de la DLS, cette mesure nécessite une dilution importante pour atteindre la zone de linéarité entre la taille des gouttelettes et la turbidité. Pour cela, les phénomènes de déstabilisation réversibles ne peuvent pas être détectés.

L'analyseur par balayage optique (Turbiscan[®]) est fréquemment utilisé pour évaluer la stabilité physique des systèmes colloïdaux tels que les NEs. Son principe est basé sur la diffusion multiple de la lumière lors de l'incidence sur les gouttelettes. Un faisceau de lumière incident dans le proche infrarouge ($\lambda = 800 - 880 \text{ nm}$) est envoyé perpendiculairement à l'échantillon, ensuite deux détecteurs synchrones permettent de mesurer l'intensité des faisceaux transmis et rétrodiffusé respectivement à 180° et à 45° de la source lumineuse incidente. Le Turbiscan[®] effectue un balayage de cette façon sur toute la hauteur de l'échantillon et les résultats sont exprimés en pourcentage d'intensités transmise et rétrodiffusée par rapport à l'intensité incidente en fonction de la hauteur (Mengual et *al.*, 1999a,b). L'analyse des variations des intensités transmise et rétrodiffusée au cours du temps permet de détecter, identifier et quantifier les mécanismes de déstabilisation beaucoup plus tôt que l'observation visuelle. Dans la plupart des cas, seule l'intensité rétrodiffusée est prise en compte pour l'interprétation puisque la transmission est nulle dans la majorité des NEs étudiées à cause de l'opacité des échantillons (Feng et *al.*, 2016). Cette méthode décrit précisément l'état et l'évolution des systèmes colloïdaux si elle est menée au cours du temps parce qu'elle ne nécessite aucune dilution ou modification sur le système. Les phénomènes de

séparation gravitationnelle (crémage ou sédimentation) sont facilement identifiés par des variations de l'intensité rétrodiffusée simultanées dans deux directions opposées au niveau des parties supérieure et inférieure de l'échantillon (Bazylińska et *al.*, 2014). Cependant, les phénomènes de déstabilisation qui modifient la taille des gouttelettes ou causent leurs agrégations (le mûrissement d'Ostwald, la coalescence et la floculation) introduisent des variations uniformes de l'intensité rétrodiffusée sur toute la hauteur de l'échantillon de telle façon qu'il n'est pas possible de distinguer ces différents mécanismes (Porras et *al.*, 2004, 2005, 2008; Wulff-Pérez et *al.*, 2009).

L'étude de la stabilité physique accélérée permet de prédire la durée de vie de la formulation et les éventuels phénomènes de déstabilisation. Le vieillissement accéléré s'effectue de plusieurs manières telles que la centrifugation, l'augmentation de température et les variations de température par cycles. La centrifugation accélère la vitesse de migration des gouttelettes, et par conséquent, l'apparition de la séparation des phases (Morais Diane et Burgess, 2014; Fofaria et *al.*, 2016). L'augmentation de température diminue la viscosité de la phase continue et donc augmente la vitesse de séparation (Santos-Magalhães et *al.*, 2000; Yilmaz et Borchert 2005). Les variations de température par cycles s'effectuent soit par des cycles de réchauffement-refroidissement à + 40° C et - 4° C respectivement, en imitant l'amplitude journalière maximale de température (Choudhury et *al.*, 2014); soit par cycles de congélation-décongélation à - 20° C et + 25° C en imitant les variations de température lors du stockage et du transport (Shafiq et *al.*, 2007).

L'étude de la stabilité oxydative des NEs est un aspect très important en raison de la présence d'huile. L'oxydation des lipides est une cascade de réactions radicalaires déclenchée par la décomposition des hydroperoxydes lipidiques en radicaux libres catalysée par la présence des métaux de transition, tels que l'ion fer, dans la phase aqueuse et provenant des impuretés. L'oxydation des lipides dans les systèmes émulsionnés se produit normalement à l'interface O/W en raison de l'interaction des radicaux libres avec les triglycérides insaturés présents dans la phase huileuse (Yoshida et Niki, 1992). La vitesse de l'oxydation des lipides dans les NEs dépend du type d'huile, du type et de la concentration de tensioactif, de la méthode de préparation et de la taille des gouttelettes (Walker et *al.*, 2015; Tabibiazar et *al.*, 2015; Salvia-Trujillo et *al.*, 2016; Uluata et *al.*, 2015; Lee et *al.*, 2011). L'étude de la stabilité oxydative des NEs s'effectue principalement par deux méthodes spectrophotométriques : le dosage des produits primaires de l'oxydation (les peroxydes) par la méthode de Shantha et

Decker (1994) (Walker *et al.*, 2015; Uluata *et al.*, 2015; Cavazos-Garduño *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Salvia-Trujillo *et al.*, 2016) et le dosage des produits secondaires de l'oxydation réagissant avec l'acide thiobarbiturique (méthode de Buege et Aust, 1978 modifiée par McDonald et Hultin, 1987) (Lee *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2015; Tabibiazar *et al.*, 2015; Salvia-Trujillo *et al.*, 2016). Pour les NEs alimentaires, d'autres méthodes ont été rapportées pour l'étude de stabilité oxydative accélérée par la chaleur telles que le dosage de l'hexanal volatile (Uluata *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016) et le rancissement (Lante et Friso, 2013; Sotomayor-Gerding *et al.*, 2016). L'hexanal est l'aldéhyde majeur généré par l'oxydation des lipides comme produit secondaire et le rancissement est une méthode d'oxydation accélérée par la chaleur et par l'oxygène.

8 Avantages et inconvénients des nanoémulsions

La différence entre les NEs et les émulsions conventionnelles n'est pas fondamentale mais elle est assez importante pour la pratique à cause de la taille très petite des gouttelettes (Salager *et al.*, 2006).

8.1 Avantages des nanoémulsions

Bien que les NEs soient des systèmes poly-phasiques hors équilibre thermodynamique, elles montrent une stabilité cinétique plus importante en comparaison avec les macroémulsions. Cela provient de la résistance des NEs à la majorité des mécanismes de déstabilisation. En effet, grâce à la taille des gouttelettes ultrabasse, le mouvement brownien devient prédominant devant les mouvements liés à la pesanteur. De cette façon la vitesse de migration gravitationnelle (sédimentation ou crémage) devient négligeable (Tadros *et al.*, 2004; Solans *et al.*, 2005; Mason *et al.*, 2006). Quand la séparation gravitationnelle est présente dans une NE, sa vitesse est largement ralentie avec la taille nanométrique des gouttelettes (Equation 6, Partie 3.4). Les NEs sont plus stables contre la floculation par rapport aux macroémulsions grâce à la prédominance du mouvement brownien (Tadros *et al.*, 2004). D'autre part, les interactions attractives entre les gouttelettes nanométriques sont

faibles parce que l'énergie de van der Waals est proportionnelle au rayon des gouttelettes (Equation 4, Partie 3.3). Les NEs sont stables contre la coalescence grâce à la pression de Laplace très élevée dans les petites gouttelettes qui résistent à la déformation lors de leur collision. De plus, le film interfacial de l'agent émulsionnant est relativement plus épais par rapport au rayon des gouttelettes. Ce film est donc plus résistant contre la rupture. Néanmoins, la coalescence est présente dans les NEs quand la tension interfaciale est ultrabasse puisque la pression de Laplace devient également faible et la déformation est donc davantage possible (Solans et *al.*, 2002).

Toutefois, la pression de Laplace élevée dans les petites gouttelettes favorise le mûrissement d'Ostwald. En effet, le mûrissement d'Ostwald constitue le mécanisme principal de déstabilisation des NEs (Salager et *al.*, 2006). Cependant, Nazarzadeh et *al.* (2013) ont estimé que la coalescence est aussi présente dans les NEs bien que tous les cas de croissance des gouttelettes aient été interprétés seulement par le mûrissement d'Ostwald en raison de l'ambiguïté de la relation entre la coalescence et le rayon moyen des gouttelettes.

Les NEs peuvent être transparentes ou translucides. Cela présente un avantage pour l'apparence de certains produits alimentaires et pharmaceutiques. La raison pour laquelle les NEs sont transparentes est que la taille des gouttelettes est plus petite que la longueur d'onde du spectre visible (400 - 700 nm) de façon que la diffusion de la lumière devient extrêmement faible. Pour avoir une nanoémulsion transparente, la taille de gouttelettes doit être de l'ordre de 60 nm ou moins pour permettre une diffusion isotrope de la lumière (Partie 7.1.1). La faible fraction volumique de la phase dispersée et la faible différence d'indice de réfraction entre les deux phases favorisent la transparence des NEs (Saberri et *al.*, 2013b; Zhang et *al.*, 2015).

Contrairement aux microémulsions, qui exigent une forte concentration en tensioactif (généralement 20 % ou plus), les NEs peuvent être préparées en utilisant une concentration de tensioactif raisonnable. Par exemple, pour une nanoémulsion O/W à une fraction volumique de 20 m/m%, une concentration en tensioactif de 5 à 10 m/m% peut être suffisante (Lovelyn et Attama, 2011).

8.2 Inconvénients des nanoémulsions

Malgré ces avantages, les NEs montrent quelques inconvénients liés à la taille nanométrique des gouttelettes. Les NEs ont une grande surface spécifique de sorte que toute réaction de dégradation chimique qui se produit à l'interface O/W peut être promue, comme l'oxydation des lipides (McClements, 2011). En outre, lorsque les NEs sont transparentes, la lumière UV peut les pénétrer facilement, ce qui peut favoriser des réactions de dégradation chimique induite par la lumière. Par conséquent, il peut être nécessaire de prendre des précautions supplémentaires pour améliorer la stabilité chimique des composés sensibles encapsulés à l'intérieur de ces NEs, par exemple en ajoutant des antioxydants ou des agents de chélation (McClements, 2011).

Les NEs n'ont suscité l'intérêt qu'à l'aube des années 2000 pour les raisons suivantes (Tadros et *al.*, 2004) :

- La préparation d'une nanoémulsion nécessite dans de nombreux cas, des techniques spéciales telles que l'homogénéisateur à HP, le microfluidiseur et les ultrasons qui n'ont été rendues disponibles que récemment.
- Il y avait une perception que la fabrication des NEs était coûteuse et nécessitait des équipements onéreux, ainsi que l'utilisation de concentrations élevées d'émulsifiants.
- La stabilité des NEs est sensible aux conditions environnementales telles que la température et le pH.
- Le mécanisme de production de gouttelettes de taille inférieure au micron et le rôle des tensioactifs et co-tensioactifs n'avaient pas été encore complètement élucidés.
- Il y avait un manque de démonstration des avantages des NEs et leur utilisation en comparaison avec les systèmes de macroémulsions classiques.
- Il existait un manque de compréhension de la chimie interfaciale qui est impliquée dans la production de NEs. Par exemple, seuls quelques chimistes connaissaient l'utilisation de la température d'inversion de phase (PIT), sa conception et comment cela pouvait être utilement appliqué pour la production de petites gouttelettes d'émulsion.

- Il y a un manque de connaissances sur le mécanisme de mûrissement d'Ostwald, qui est le problème d'instabilité la plus sérieuse pour les NEs.
- Il y a un manque de connaissance des ingrédients qui peuvent être incorporés pour surmonter le mûrissement d'Ostwald. Par exemple, l'ajout d'une deuxième phase d'huile avec une très faible solubilité dans la phase continue et/ou l'incorporation des émulsionnants polymères qui a fortement adsorbés à l'interface.
- La crainte de l'introduction de nouveaux systèmes sans une évaluation complète des coûts et des avantages.

Depuis lors, l'utilisation des NEs s'est développée, notamment dans différents domaines, comme nous pouvons le constater sur la Figure 10.

Le développement de l'utilisation des NEs a permis de lever un bon nombre de verrous sur les méthodes de préparation, de stabilisation et de mise en applications. Ainsi, dans la partie suivante nous allons développer la mise en œuvre des NEs spécifiquement dans le domaine pharmaceutique.

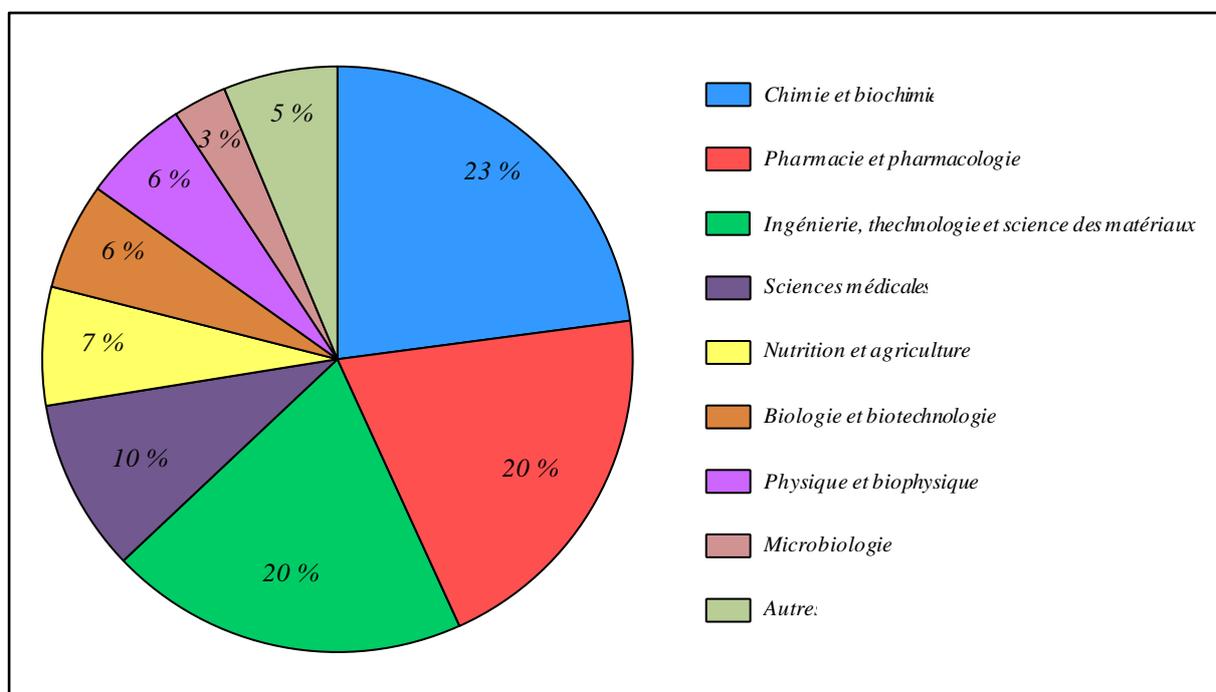


Figure 10 : Les proportions d'utilisation des NEs dans la recherche pour différents domaines (*Web of knowledge*, mot clé : *nanoemulsion*, 1997 – 2016, 1672 articles).

9 Nanoémulsions pour des applications pharmaceutiques

Les technologies nanométriques ou « les nanotechnologies » suscitent de plus en plus d'intérêt dans les domaines de la recherche et de l'industrie pharmaceutique. Une large gamme de formes pharmaceutiques conçues sur la base de nanotechnologies est en cours de développement en tant que systèmes de délivrance des SAs. Parmi ces formes pharmaceutiques, qui peuvent être appelées « formes nanopharmaceutiques », on trouve les nanoparticules, les NEs, les nanosuspensions, les nanosphères, les nanotubes, les nanobilles, les nanocapsules, et les dendrimères (Joy et *al.*, 2015). Les NEs pharmaceutiques, qui ont été très récemment développées et étudiées, sont des systèmes prometteurs pour l'administration des SAs pharmaceutiques. La Figure 11 montre l'évolution du nombre de publications sur le sujet se rapportant aux NEs dans le domaine pharmaceutique. On constate une progression rapide durant la dernière décennie. L'intérêt majeur dans ce domaine se concentre sur les NEs de type O/W pour l'encapsulation et la délivrance des principes actifs hydrophobes peu ou pas solubles dans l'eau. En effet, la solubilité des SAs est un grand défi dans la formulation pharmaceutique. Chaque SA, pour qu'elle soit absorbée, doit être présentée sous forme solubilisée. Cependant, environ 40 % des SAs commercialisées sont peu solubles dans l'eau et plus de 90 % des nouvelles SAs développées dans l'industrie pharmaceutique sont pratiquement insolubles dans l'eau (Gursoy et Benita, 2004; Hauss, 2007).

Les NEs O/W peuvent solubiliser ce genre de SAs dans leur phase dispersée. Le choix de la phase huileuse dispersée constitue une étape critique dans la formulation d'une nouvelle NE parce que l'huile sélectionnée doit répondre à la fois aux exigences de la formulation (taille de gouttelettes et stabilité physique du système) et aux exigences de l'encapsulation (solubilité et stabilité de la SA). Les huiles végétales, qui sont composées essentiellement des triglycérides à chaînes longues, sont utilisées en tant que phase huileuse. Cependant, à cause de leur pouvoir solubilisant limité, elles sont remplacées parfois par des huiles synthétiques (ou semi-synthétiques). Le Tableau 1 résume des exemples retrouvés dans la littérature des huiles végétales et synthétiques utilisées pour l'encapsulation de SAs dans des NEs.

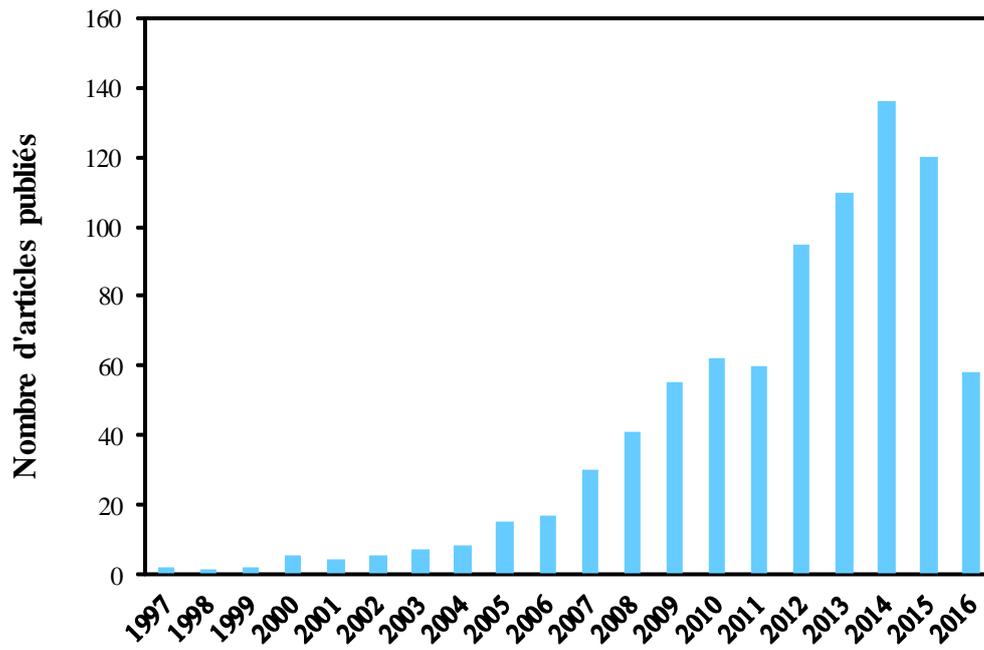


Figure 11 : Nombre d'articles publiés chaque année sur le sujet des nanoémulsions en pharmacie et en pharmacologie (*web of knowledge*, 1997-2016, mot clé : nanoemulsion).

Tableau 1 : Exemples des huiles utilisées dans la formulation des NEs pharmaceutiques O/W et les substances actives encapsulées.

Type d'huile	Nom commercial	Composition	SA	Références	
Végétale	Huile de soja	Triglycérides d'acides gras saturés (16 %), mono- (23 %) et poly-insaturés (58 %)	Glycyrrhizine	Harwansh et <i>al.</i> , 2011	
			Dacarbazine	Kakumanu et <i>al.</i> , 2011	
			Diclofénac	Kandadi et <i>al.</i> , 2012	
	Huile d'olive	Triglycérides d'acides gras saturés (15 %), mono- (76 %) et poly-insaturés (9 %)	Acéclofénac	Shakeel et <i>al.</i> , 2007	
	Huile de coco	Triglycérides d'acides gras saturés (86%), mono- (6 %) et poly-insaturés (2 %)	BSA – Artin M*	Suciati et <i>al.</i> , 2014	
	Huile de pignon de pin	Triglycérides d'acides gras saturés (9 %), mono- (30 %) et poly-insaturés (60 %)	Paclitaxel	Tiwari et <i>al.</i> , 2006	
Huile de carthame	Triglycérides d'acides gras saturés (6 %), mono- (14 %) et poly-insaturés (75 %)	Saquinavir	Vyas et <i>al.</i> , 2008		
Huile essentielle de cannelle	Hydrocarbures terpéniques (78%), terpénoïdes oxygénés (9%), α -bergamotène (27 %) et α -copaène (23 %)	Ramipril	Nirmala et <i>al.</i> , 2014		
Synthétique	Triacétine	Triacétate de glycéryl	Célécoxib	Shakeel et <i>al.</i> , 2008	
			Acéclofénac	Shakeel et <i>al.</i> , 2007	
			Valsartan	Malgope et <i>al.</i> , 2013	
	Sefsol 218	Monocaprato de propylène glycol	Celecoxib	Shakeel et <i>al.</i> , 2008	
				Baboota et <i>al.</i> , 2007	
	Capryol	Monocaprylate de propylène glycol		Ezétimibe	Bali et <i>al.</i> , 2010
				Clotrimazole	Borhade et <i>al.</i> , 2012
Labrafac	Triglycérides d'acides gras à chaînes moyennes caprylique et caprique		Acéclofénac	Shakeel et <i>al.</i> , 2007	
			Insuline	Li et <i>al.</i> , 2013	
Trioléine	Trioléate de glycéryl		Thymoquinone	Tubasha et <i>al.</i> , 2013	

* Albumine de sérum bovin avec adjuvant comme model de vaccin

Les NEs O/W constituent un outil approprié dans certains cas où la SA est une huile ou un composé naturel d'une huile (Mizrahi et *al.*, 2014; Mostafa et *al.*, 2015). Les SAs encapsulées à l'intérieur de la phase huileuse sont protégées des dégradations chimiques et enzymatiques puisque ce genre de réactions se passe en milieu aqueux.

En comparaison avec les macroémulsions, les NEs possèdent une surface spécifique beaucoup plus importante, ce qui donne une diffusibilité optimisée de la SA. Donc, grâce à l'amélioration de la solubilité, de la protection contre la dégradation enzymatique gastro-intestinale, et de la diffusibilité, les NEs augmentent la biodisponibilité des SAs administrées par la voie orale. De nombreuses études ont été effectuées pour montrer l'efficacité des NEs pour augmenter la biodisponibilité orale des SAs hydrophobes telles que le danazol (Devalapally et *al.*, 2013), la curcumine (Ganta et *al.*, 2010a) et le saquinavir (Vyas et *al.*, 2008). De plus, en raison de l'uniformité de la distribution de la SA dans la forme pharmaceutique, les NEs peuvent minimiser les variations d'absorption (Bali et *al.*, 2010). Les NEs améliorent la pénétration des SAs à travers la peau grâce à leur surface spécifique importante et aussi grâce à la réduction de la tension interfaciale des gouttelettes (Chime et *al.*, 2014). Pour ces raisons, un grand intérêt a été porté aux NEs pour la voie cutanée. Les recherches se sont concentrées sur la délivrance des anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que le célécoxib (Shakeel et *al.*, 2008; Baboota et *al.*, 2007), le méloxicam (Khurana et *al.*, 2013) et l'acéclofénac (Shakeel et *al.*, 2007), et d'autres SAs telles que le valsartan (Malgope et *al.*, 2013) et la curcumine (Rachmawati et *al.*, 2014).

Par voie parentérale, alors que les macroémulsions ($\geq 5 \mu\text{m}$) ne sont pas injectables (Wretlind, 1964), les NEs pour leur part peuvent être administrées si elles répondent aux autres exigences des préparations parentérales (stérilité, apyrogénicité, isotonie, etc.). Suite à une administration parentérale intraveineuse, les gouttelettes huileuses des NEs sont métabolisées ou éliminées par le foie et les phagocytes mononucléés en fonction de leurs tailles et de leur composition (Tamilvanan, 2004). Donc le ciblage de ces deux derniers est possible sans modifications de la surface des gouttelettes. Par ailleurs, le ciblage d'autres organes ou tissus a été étudié par l'incorporation de ligands appropriés tels que le cholestérol pour cibler les récepteurs des lipoprotéines de basse densité (Contente et *al.*, 2014), l'acide folique pour cibler les récepteurs des folates surexprimés dans les tissus tumoraux (Loureiro et *al.*, 2015b), les 1-O-alkylglycerols pour améliorer le ciblage au cerveau (Madhusudhan et *al.*, 2007) et l'albumine du sérum bovin pour cibler l'alboudine surexprimés dans les tissus

inflammés (Kandadi et *al.*, 2012). Généralement, l'élimination des gouttelettes des NEs de la circulation sanguine est rapide. Des études ont été menées pour montrer la possibilité de modifier la surface des gouttelettes des NEs par du poly(éthylène glycol) PEG. Ce dernier traitement, qui est généralement appliqué aux nanoparticules, rend la surface des gouttelettes plus hydrophile. Cela ralentit l'opsonisation et, par conséquent, allonge la durée de vie de ces gouttelettes dans la circulation sanguine et permet une libération prolongée de la SA encapsulée (Ganta et *al.*, 2010b). D'autres études ont évalué le potentiel des NEs pour la délivrance des SAs par voie parentérale sous-cutanée (Mbela et *al.*, 1998; Loureiro et *al.*, 2015a) et intramusculaire (Kakumanu et *al.*, 2011).

La voie oculaire est également une voie d'administration d'intérêt pour les nanomédicaments. En effet, le traitement des maladies de la surface oculaire nécessite souvent l'administration locale des SAs. L'administration des SAs sous forme de solution aqueuse est inefficace à cause du drainage nasolacrimal rapide. La formulation des formes pharmaceutiques oculaires présente un défi majeur à cause des considérations techniques (solubilité, stabilité, etc.) et cliniques (efficacité, toxicité locale, conformité) (Lallemand et *al.*, 2012). Les NEs cationiques sont des outils prometteurs pour la délivrance oculaire puisque la surface des cellules de la cornée est chargée négativement. Les gouttelettes chargées positivement vont être retenues sur cette surface par des interactions électrostatiques. Cela augmente le temps de résidence oculaire et permet une libération prolongée de la SA (Du Toit et *al.*, 2011). La problématique rencontrée avec les NEs oculaires est que la majorité des agents cationiques utilisés pour les préparer sont des tensioactifs de synthèse irritants et toxiques pour la voie oculaire (Lallemand et *al.*, 2012). Comme exemples de SAs encapsulées dans des NEs oculaires, on peut citer la terbinafine pour le traitement des kératites fongiques (Tayel et *al.*, 2013), l'indométacine pour le traitement des inflammations oculaires (Calvo et *al.*, 1996) et le timolol pour celui du glaucome (Gallarate et *al.*, 2013).

De la même façon, des NEs cationiques ont été développées pour allonger le temps de résidence dans la cavité nasale pour le ciblage cérébral (Yadav et *al.*, 2016). Dans d'autres études, des agents mucoadhésifs ont été intégrés à la surface des gouttelettes des NEs dans le même but (Kumar et *al.*, 2008). L'encapsulation des SAs dans les gouttelettes huileuses des NEs protège les SAs de la dégradation enzymatique qui constitue une des limitations de la voie intranasale (Harris, 1993).

Très récemment, des NEs O/W ont été étudiées pour la voie pulmonaire sous forme d'aérosols (Nasr et *al.*, 2012) ou sous forme d'inhalation sèche préparée par pulvérisation (Zhu et *al.*, 2015).

Malgré les nombreux avantages de ces systèmes pour les différentes voies d'administration, les NEs sont moins présentes à l'heure actuelle dans la recherche pharmaceutique en comparaison avec d'autres formes nanométriques telles que les nanoparticules et les liposomes (Figure 12). Les raisons principales de ce large écart est la disponibilité seulement récente des techniques de haute énergie pour la production des NEs et le manque de connaissances et de compréhensions sur les mécanismes d'émulsification de basse énergie. En plus des limites techniques et des contraintes thérapeutiques, des préjugés négatifs peuvent exister face à l'adaptation d'une nouvelle forme pharmaceutique.

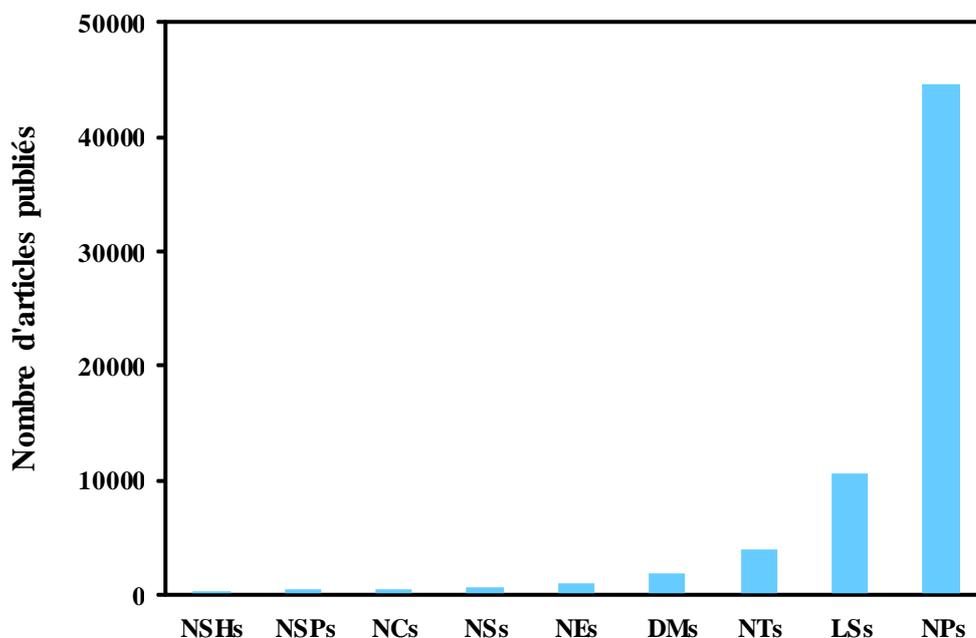


Figure 12 : Nombre d'articles publiés en pharmacie et en pharmacologie sur les différentes formes nano-pharmaceutiques : NSHs (Nanocoques), NSPs (nanosphères), NCs (nanocapsules), NEs (nanoémulsions), DMs (dendrimètres), LSs (liposomes) et NPs (nanoparticules) (*web of knowledge*, 1997 - 2016).

L'utilisation de tensioactifs constitue une problématique majeure dans le développement des NEs pharmaceutiques. La Figure 13 montre les principaux tensioactifs utilisés dans la plupart des recherches effectuées dans ce domaine ainsi que leur fréquence d'utilisation. Les tensioactifs utilisés, qui sont généralement des produits de synthèse

chimique, peuvent provoquer des réactions toxiques par différentes voies d'administration. Par exemple, pour la voie cutanée, les émulsions sont souvent utilisées pour traiter les troubles inflammatoires de la peau telles que l'eczéma ou la dermatite atopique, mais elles peuvent déclencher des réactions inflammatoires (Bárány *et al.*, 2000). Des études récentes ont démontré la relation entre la structure des tensioactifs et leur toxicité cutanée. Lémery *et al.* (2015) ont rapporté que les tensioactifs ioniques (anioniques et cationiques) sont plus toxiques s'ils sont solubles dans l'eau. Pour leur part, les tensioactifs non-ioniques révèlent un effet toxique plus ou moins marqué dépendant de la nature de leur tête polaire, de la longueur de leur chaîne aliphatique et de leurs liaisons chimiques. Pour la voie orale, des études *ex-vivo* ont traité la toxicité de ce type de tensioactifs sur les cellules Caco-2, les cellules constituant l'épithélium intestinal humain. He *et al.* (2011) ont trouvé que les émulsions stabilisées par le cremophor EL, le cremophor RH40, le polysorbate-80 ou le Solutol HS15 ont diminué la viabilité des cellules Caco-2 de plus de 50 % en comparaison avec un contrôle négatif. La problématique de la toxicité des tensioactifs est beaucoup plus importante avec les NEs qu'avec les émulsions conventionnelles, puisque la quantité de tensioactifs requise est plus importante avec les NEs en raison de l'aire interfaciale plus grande. Ceci peut donc limiter leurs applications thérapeutiques à long terme (en particulier pour le traitement de maladies chroniques).

Dans l'industrie pharmaceutique, les émulsions submicroniques administrées par voie intraveineuse sont commercialisées depuis cinq décennies dans la nutrition parentérale pour l'administration des acides gras essentiels aux malades critiques qui ne peuvent être nourris par voie orale. Il s'agit des émulsions grasses ou lipidiques. Par exemple, l'Intralipid[®], qui est approuvé en Europe depuis 1962, est une émulsion de triglycérides avec une taille de gouttelettes de 500 nm. Des NEs, avec une taille de gouttelettes moins de 200 nm, sont apparues sur le marché pharmaceutique depuis les deux dernières décennies. Le Tableau 2 montre des exemples des produits finis conçus sur la base des NEs et commercialisés sur le marché pharmaceutique (Wong, 2015).

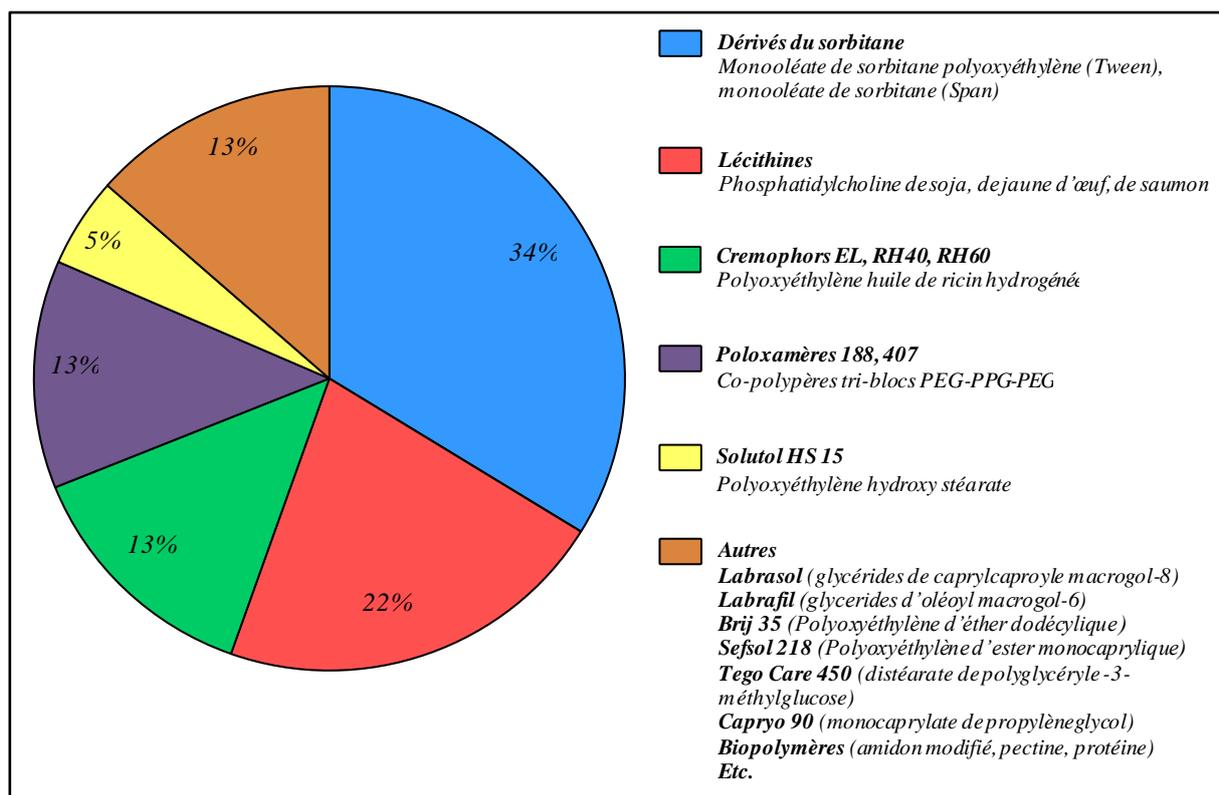


Figure 13 : Les principaux tensioactifs utilisés pour la stabilisation de NEs dans la recherche en pharmacologie, toxicologie et sciences pharmaceutiques (extrait de 314 publications sur *ScienceDirect*, sur le sujet de nanoémulsion, 1997 - 2016).

On constate que les émulsionnants utilisés sont dans la plupart des cas des tensioactifs de faible masse molaire, dans la partie suivante, nous discuterons la possibilité de formuler des NEs avec des protéines en remplacement des molécules de tensioactif.

Tableau 2 : Quelques exemples de NEs commercialisées dans le domaine pharmaceutique (Wong, 2015).

Nom commercial	SA	Fabricant/pays, année	Indications	Voie d'administration	Phase huileuse	Tensioactif	Diamètre de gouttelettes (nm)
Nesoral®	Cyclosporine A	Novartis pharm. /France, 1995	Immunosuppresseur	Orale	Huile de maïs	Cremophor RH 40	10 - 150
Durezol®	Difluprednate	Sirion ther. int./ FDA 2008	Inflammation et douleur associées à la chirurgie oculaire	Oculaire	Huile de ricin	Tween 80	110
Restasis®	Cyclosporine A	Allergan/USA, 2013	Immunomodulateur, sécheresse oculaire	Oculaire	Huile de ricin	Tween 80	100
Liple®	Alprostadil	Mitsubishi Pharma. Corp./ Japon, 1988	Vasodilatateur, antiagrégant plaquettaire	Intraveineuse	Huile de soja	Lécithine de jaune d'œuf	209
Focetria®	Vaccin ^(a)	Novartis pharm./union européenne, 2007-2016	Influenza A (H1N1)	Intramusculaire	Squalène ^(c)	Tween 80 + trioléate de sorbitan 85	165
Pandemrix®	Vaccin ^(b)	GlaxoAmithKline Biologicals/ union européenne, 2008	Influenza A (H1N1)	Intramusculaire	Squalène ^(c)	Tween 80	150 - 155

^(a) Antigène de surface (hémagglutinine et neuraminidase) de la souche A/California/07/2009 (H1N1) souche analogue utilisée NYMC X-181

^(b) Antigène de surface (hémagglutinine) de la souche A/California/7/2009 (H1N1) souche analogue utilisée X-179A

^(c) Huile extraite du foie de requin

10 Protéines en tant qu'agents émulsionnants

Les biopolymères tels que les protéines et les polysaccharides sont largement utilisés dans l'industrie des émulsions alimentaires et sont des candidats prometteurs pour les émulsions pharmaceutiques (Bouyer et *al.*, 2012). Au cours des deux dernières décennies, les NEs O/W ont attiré l'attention de l'industrie alimentaire pour l'encapsulation de composés bioactifs hydrophobes tels que les caroténoïdes (Mao et *al.*, 2009), les vitamines (A, D, E et K) (Relkin et *al.*, 2009), les polyphénols (Zambrano-Zaragoza et *al.*, 2014) et les lipides bioactifs (oméga-3, oméga-6 et acides gras polyinsaturés) (Komaiko et *al.*, 2016). Les NEs présentent plusieurs avantages dans ce domaine, à savoir : protéger les composés bioactifs contre les dégradations chimiques et enzymatiques au contact des autres ingrédients alimentaires (McClements, 1999), augmenter leur absorption au niveau intestinal (Acosta, 2009), augmenter leur solubilité et/ou leur dispersion, et par conséquent, leur biodisponibilité (Huang et *al.*, 2010), pouvoir les intégrer à des boissons ou à d'autres produits aqueux transparents (Lee et McClements, 2010) et masquer le goût, l'odeur ou la couleur de certains ingrédients nutritionnels (Qian et *al.*, 2012).

L'utilisation des biopolymères initialement appliquée aux émulsions conventionnelles a été transmise vers le domaine nanométrique. Pendant ces dernières années, de nombreuses recherches ont été effectuées pour étudier la capacité de polymères d'origine naturelle à former et à stabiliser des NEs alimentaires. Parmi ces biopolymères, les protéines (telles que les protéines végétales et les protéines du lait) sont les plus étudiées. Les protéines sont des polymères naturels qui peuvent être obtenus à partir d'une ressource abondante, peu coûteuse et renouvelable. Les propriétés interfaciales des protéines et leur efficacité en tant qu'agents émulsionnants ont été largement étudiées et démontrées. Dans les sections suivantes, nous allons traiter les activités interfaciales et émulsionnantes des protéines. Nous donnerons des exemples de protéines utilisées pour la stabilisation des NEs et nous ferons une comparaison entre les différentes protéines et les tensioactifs de synthèse d'une part, et entre les différentes protéines d'autre part, en termes de taille des gouttelettes et de stabilité de NEs obtenues.

10.1 Propriétés interfaciales et émulsionnantes des protéines

Les protéines, à l'instar des tensioactifs de faible masse molaire, ont une nature amphiphile. Celle-ci provient de leur structure polypeptidique (Foegeding et Davis, 2011). Les acides aminés formant la chaîne polypeptidique sont soit hydrophobes (alanine, valine, leucine, isoleucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine et proline) soit hydrophiles (glycine, sérine, thréonine, cystéine, asparagine, glutamine, méthionine aspartate, glutamate, histidine, lysine et arginine). Cette amphiphilie favorise leur adsorption à l'interface O/W et, par conséquent, la diminution de la tension interfaciale.

Lors de l'adsorption à l'interface, un changement de conformation de la protéine est souvent nécessaire afin d'exposer les résidus d'acides aminés hydrophobes à la surface de la molécule. Ensuite, les protéines se réarrangent pour orienter ses résidus d'acides aminés hydrophobes vers la phase huileuse et ses résidus d'acides aminés hydrophiles vers la phase aqueuse (Walstra, 2003). Ce mécanisme est appelé dans certaines références « la dénaturation interfaciale » (Beverung et *al.*, 1999; Bos et Vliet, 2001).

A partir des molécules de protéine adsorbées à l'interface, un film viscoélastique fort peut être formé grâce aux interactions intermoléculaires covalentes telles que les liaisons disulfure, et non-covalentes telles que les interactions hydrophobes. Monahan et *al.* (1993) et Dickinson et Matsumura, (1991) ont démontré que les protéines majeures du lactosérum (la β -lg et l' α -la) se polymérisent à l'interface O/W par des liaisons disulfure. De cette façon, une protéine appauvrie en groupement thiol (telle que la caséine) forme des films moins cohésifs qu'une protéine riche en ce groupement telle que la β -lg (Dickinson, 2001). Par ailleurs, d'autres études ont relevé la formation de feuillets β intermoléculaires sous l'effet d'interactions hydrophobes (Lefèvre et Subirade, 2003). Le film formé à l'interface fournit une stabilité mécanique contre la coalescence des gouttelettes lors de leur collision sous l'effet du mouvement brownien (Tcholakova et *al.*, 2006).

Par ailleurs, les fragments de protéine composés majoritairement de résidus hydrophiles restent ancrés d'un côté à l'interface et libres de l'autre côté dans la phase aqueuse. Le réseau créé par cette configuration empêche le rapprochement entre les gouttes par un mécanisme de stabilisation stérique (Damodaran, 1996; Tcholakova et *al.*, 2006).

Les protéines contiennent aussi des groupements carboxyle (-COOH) et amines (-NH₂) libres, autres que les groupements impliqués dans les liaisons peptidiques. L'acide aspartique et l'acide glutamique portent un groupement -COOH. La lysine, l'arginine et l'histidine portent un groupement -NH₂. Ces groupements peuvent être ionisés en fonction du pH du milieu. A pH acide, les groupements amine deviennent chargés positivement (NH₃⁺) alors que les groupements carboxyle sont neutres. En augmentant le pH du milieu, les groupements amine commencent à être neutralisés et les groupements carboxyle commencent à se dissocier et à devenir chargés négativement (-COO⁻) en fonction de la valeur du pKa de chaque groupement. A une valeur donnée de pH, la charge globale de la protéine devient égale à zéro. Cette valeur de pH est caractéristique de la protéine et est définie comme son point isoélectrique (pI). La valeur du pI dépend alors de la composition de la protéine en acides aminés et de la valeur de pKa de chaque acide aminé. La protéine est chargée positivement si pH < pI ou négativement si pH > pI. Lors de la formulation d'une émulsion O/W avec une protéine, la surface des gouttes peut être alors chargée. Avec les protéines, la stabilisation électrostatique joue un rôle crucial (Guzey et McClements, 2007). Par ailleurs, la charge de la protéine joue aussi un rôle dans son adsorption à l'interface. Plus la protéine est chargée, plus elle est soluble dans l'eau et plus les vitesses de diffusion et d'adsorption à l'interface sont importantes (Karaca et al., 2011).

La présence de protéine non-adsorbée et libre dans la phase continue contribue également à augmenter la viscosité de l'émulsion, ce qui réduit la mobilité et la diffusion de gouttelettes d'huile au sein de l'émulsion (Jafari et al., 2012).

Les propriétés émulsionnantes des protéines dépendent donc de l'ensemble de leurs propriétés physico-chimiques telles que leur taille, leur séquence d'acides aminés, leur flexibilité conformationnelle, leur hydrophobie, leur point isoélectrique, la présence de groupements thiol (-SH) libres, etc.

Cependant, la stabilisation des émulsions par les protéines présente quelques limites. Par exemple, la répulsion électrostatique, qui constitue l'un des principaux mécanismes de stabilisation avec les protéines, est sensible au changement du pH et à la force ionique du milieu. Il a été rapporté que les émulsions ont tendance à flocculer et ensuite à crêmer très rapidement au voisinage du point isoélectrique de la protéine (Qian et al., 2012). Egalement, une force ionique élevée peut limiter les forces répulsives en neutralisant la charge de surface (Qian et al., 2012; McClements, 2005).

D'autre part, bien que la tendance générale dans la littérature soit de considérer que la stabilité des émulsions est renforcée par la formation de liaisons disulfure intermoléculaires entre les molécules de protéine adsorbées à l'interface, Joshi et *al.* (2012) ont démontré le contraire. En effet, les liaisons disulfure peuvent se former entre les protéines adsorbées aux surfaces de deux gouttes différentes, ce qui favorise alors la coalescence et la déstabilisation. Dans cette étude, la stabilité des émulsions formées avec l'isolat de protéine de lentilles a été améliorée en réduisant les liaisons disulfure. Les interactions intermoléculaires non-covalentes peuvent aussi jouer un rôle déstabilisant si elles se forment entre les surfaces de différentes gouttes. Effectivement, au cours du vieillissement des émulsions, le changement structurel de la protéine à l'interface rend ce genre d'interactions plus probable (Fang et Dalgleish, 1997; Kim et *al.*, 2005; Tcholakova et *al.*, 2006).

Les émulsions stabilisées par des protéines sont sensibles aux changements de température. Il a été rapporté que la dénaturation thermique des protéines adsorbées peut augmenter l'hydrophobie de la surface de gouttelettes de l'émulsion, ce qui augmente l'attraction hydrophobe entre les gouttelettes. En outre, la dénaturation de la protéine adsorbée à l'interface, sous l'effet de la chaleur, expose ses groupements thiol dans la phase aqueuse, ce qui favorise la formation de liaisons disulfure entre les différentes gouttelettes d'émulsion (Kim et *al.*, 2002).

Alors que l'utilisation des polymères, tels que les protéines, est une des techniques proposées pour limiter le mûrissement d'Ostwald, ce mécanisme de déstabilisation demeure néanmoins présent dans des émulsions stabilisées par des protéines, lorsque la phase aqueuse possède une solubilité non négligeable dans la phase dispersée comme les triglycérides à chaînes courtes et les huiles essentielles (Ahmed et *al.*, 2012; Jafari et *al.*, 2007).

Plusieurs études ont proposé des traitements divers pour améliorer les propriétés émulsionnantes des protéines. Parmi elles on peut citer l'hydrolyse enzymatique partielle et la dénaturation partielle par chaleur ou par haute pression (Adjonu et *al.*, 2014; Lam et *al.*, 2013; Jafari et *al.*, 2007).

Les protéines peuvent donc être une alternative aux tensioactifs synthétiques. Leur pouvoir émulsionnant a été démontré pour les émulsions conventionnelles. Elles peuvent être des candidates intéressantes pour la stabilisation des NEs pharmaceutiques. A notre

connaissance, peu de travaux ont été réalisés dans ce domaine et une seule publication pharmaceutique a été publiée sur ce thème (He et *al.*, 2011).

10.2 Protéines utilisées pour la formulation des nanoémulsions

Nous allons, dans cette partie, récapituler les principales protéines qui ont déjà été étudiées pour la stabilisation des NEs.

10.2.1 Protéines d'origine animale

a) Caséines

Les caséines sont présentes dans la grande majorité du lait des mammifères. Elles constituent, par exemple, 80 % des protéines du lait de vache. Il y a plusieurs types de caséines dans le lait de vache. Les plus présentes sont les caséines α_{S1} et α_{S2} (48,7 %), β (33,8 %), κ (9,5 %), γ (4,9 %) (Barry et Donnelly, 1980). Les caséines dans le lait forment des complexes dits « micelles » qui donnent la couleur blanche au lait. Ces micelles consistent en différentes caséines maintenues ensemble par des ponts phosphate de calcium à l'intérieur, et qui sont entourées d'une couche de κ -caséine qui contribue à stabiliser la micelle en solution.

Les α -caséines et la β -caséine, étant abondantes dans le lait de vache, ont été étudiées dans le domaine alimentaire pour la préparation des NEs. Elles sont un exemple de protéines non-globulaires. En effet, la structure tertiaire est quasi inexistante dans ces deux protéines, en raison de l'absence de liaisons disulfure, contrairement à la κ -caséine qui en contient une. Les α -caséines et β -caséine contiennent peu de structure secondaire. Les α -caséines possèdent 10 % d'hélices α et 20 % de feuillets β , alors que la β -caséine possède 1 à 10 % d'hélices α et 13 à 16 % de feuillets β (Paulsson, 1990). Le reste de ces protéines se trouve sous forme de pelotes aléatoires. Cela en fait les rendre peu structurées et flexibles.

Les deux principales caséines, α_{S1} (23 500 g/mol) et β (24 000 g/mol), sont des agents émulsifiants extrêmement efficaces. Elles sont capables de diminuer la tension interfaciale au

cours de l'émulsification et de protéger les fines gouttelettes récemment formées contre la floculation et la coalescence par une combinaison de répulsions électrostatiques et stériques (Dickinson et Davies, 1999). L'efficacité interfaciale des caséines provient de leur structure. Les caséines sont composées d'une seule chaîne polypeptidique. Par exemple, la β -caséine est une chaîne polypeptidique de 224 acides aminés. Son premier tiers (l'extrémité N-terminale) est hautement phosphorylée (cinq résidus dans les premiers 18 résidus) et donc hydrophile, tandis que les deux autres tiers (l'extrémité C-terminale) contiennent essentiellement des résidus hydrophobes (Zhai *et al.*, 2013).

L'étude de la couche interfaciale formée par les caséines a révélé que la couverture de surface était de 1 à 3 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$ avec une épaisseur de 5 à 10 nm (Fang et Dalgleish, 1993). Dalgleish (1993) a rapporté que les variations des épaisseurs de la couche interfaciale dépendent du type de caséine. Par exemple, l' α_{S1} -caséine et la β -caséine occupent respectivement des épaisseurs de 5,4 et 11,1 nm.

Les caséines sont solubilisées dans l'hydroxyde de sodium pour produire le caséinate de sodium, la forme commerciale des caséines largement utilisée dans l'industrie alimentaire. Le tableau suivant (Tableau 3), qui résume les principaux résultats obtenus sur la stabilisation des NEs par les caséines, montre la possibilité d'obtenir des NEs O/W avec une taille de gouttelettes inférieure à 200 nm avec les caséines. Les efforts se sont concentrés sur l'optimisation du procédé principalement par l'HPH et l'HPM. Dans la majorité de ces travaux, un ratio massique des quantités caséine/huile de l'ordre de 1 a été requis pour obtenir ces NEs.

b) Protéines du lactosérum

Les protéines du lactosérum sont des protéines globulaires qui constituent environ 20 % des protéines du lait. La majorité de ces protéines sont la β -lactoglobuline (β -lg) ($\approx 50\%$) et l' α -lactalbumine α -la ($\approx 20\%$), avec des quantités inférieures d'immunoglobulines ($\approx 11\%$), d'albumine de sérum bovin (BSA : *bovin serum albumin*) ($\approx 6\%$) et de protéose peptone ($\approx 12\%$) (Walstra et Jenness, 1984). Dans l'industrie alimentaire, l'ensemble des protéines du lactosérum se trouve sous deux formes : le concentré de protéines du lactosérum WPC (*whey protein concentrate*), et l'isolat de protéines du lactosérum WPI (*whey protein isolate*). Les deux fractions de protéines du lactosérum diffèrent par la méthode de purification, et par conséquent, leur teneur en protéines. Le WPC contient 80 % de

protéines. Pour sa part, le WPI subit une étape supplémentaire d'ultrafiltration pour enlever davantage de matières grasses et de glucides : la teneur en protéines est alors plus importante (90 %).

Les protéines du lactosérum sont largement utilisées dans le domaine alimentaire pour la production des émulsions (Lam et Nickerson, 2013). Des études récentes ont démontré le potentiel de protéines de lactosérum en tant qu'émulsifiants pour la formulation de NEs adaptées aux applications alimentaires. Le tableau suivant (Tableau 4) résume les conditions et les résultats obtenus pour la formulation de NEs avec les protéines du lactosérum WPI et WPC.

Tableau 3 : Les conditions et les principaux résultats de quelques études effectuées sur les NEs stabilisées par les caséines.

Concentration en caséines (m/m%)	Phase huileuse	Procédé et conditions	Diamètre de gouttelettes (nm)	Stabilité	Mécanisme de déstabilisation	Références
10 ^(a)	D-limonène	HPM (105 MPa, 1 - 3 cycles)	350 - 400	nd	nd	Jafari <i>et al.</i> , 2007
3,6	TCL (HMT)	HPH (60 MPa, 6 cycles)	255	nd	nd	Relkin <i>et al.</i> , 2009
	TCL (LMT)		304	nd	nd	
5	Huile de maïs	HPM (1400 MPa, 6 cycles)	179	nd	nd	Qian et McClements, 2011
2,5	Huile de tournesol	HPM (70 MPa)	187 - 199	Non stable	Coalescence	Maher <i>et al.</i> , 2011
5				Non stable	Coalescence	
7,5				stables contre la séparation (par centrifugation)	stable	
10					Stable	
4	n-hexadecane	HPM (300 MPa)	150	nd	nd	Ye <i>et al.</i> , 2013
2	TCM	HPH (150 MPa, 5 cycles)	175	nd	nd	Zeeb <i>et al.</i> , 2014

^(a) + 30 m/m% de maltodextrine

nd : non déterminé

HPM : Microfluidisation à haute pression

HPH : Homogénéisation à haute pression

TCL (HMT): Triglycérides à chaînes longues à température de fusion élevée

TCL (LMT) : Triglycérides à chaînes longues à température de fusion basse

TCM : Triglycérides à chaînes moyennes

Tableau 4 : Les conditions et les principaux résultats de quelques études effectuées sur les NEs stabilisées par les protéines du lactosérum.

Protéine	Concentration (m/m%)	Phase huileuse	Procédé et conditions	Diamètre de gouttelettes (nm)	Stabilité	Références
WPI	4,5	Huile de palme	HPH (30 à 120 MPa, 12 cycles)	200 - 500	60 jours à 4°C.	Relkin <i>et al.</i> , 2011
	6,1	Huile d'arachide	HPH (200 MPa, 2 cycles)	< 200	9 jours à 4°C.	Benzaria <i>et al.</i> , 2013
	2	TCM	HPH (150 MPa, 5 cycles)	175	nd	Zeeb <i>et al.</i> , 2014
	5	TCM	HPH (60 MPa, 3 cycles)	200	45 jours	Li <i>et al.</i> , 2014
	1	TCM	HPH (140 MPa, 3 cycles)	160	12 heures	Mao <i>et al.</i> , 2009
	4,5	Huile d'arachide	HPH (200 à 300 MPa, 1 à 2 cycles)	≈ 200	9 jours	Cortés-Muñoz <i>et al.</i> , 2009
	1	Huile de maïs	HPM (≈ 82 MPa)	180	nd	Lee et McClements, 2010
Huile de maïs + acétate d'éthyle		Dissolution / évaporation / HPM (≈ 82 MPa)	80	nd		
WPC	1,5	Huile de tournesol	HPH (20 à 300 MPa).	Submicronique (> 200)	nd	Floury <i>et al.</i> , 2000
	10 ^(a)	D-limonène	HPM (60 à 70 MPa, 1 à 2 cycles)	130	nd	Jafari <i>et al.</i> , 2006
			Ultrasonication (24 KHz, 20-60 s)	243 - 298		

^(a) + 30 m/m% de maltodextrine

nd : non déterminé

WPI : Isolat de protéines de lactosérum

WPC : Concentré de protéines de lactosérum

HPH : Homogénéisation à haute pression

HPM : Microfluidisation à haute pression

TCM : Triglycérides à chaînes moyennes

c) β -Lactoglobuline

La β -lactoglobuline (β -lg) est la protéine majeure du lactosérum du lait des ruminants. Elle est présente chez la majorité des mammifères sauf dans le lait humain et celui des rongeurs. Elle représente environ 3 g/L dans le lait de vache et environ 50 % des protéines totales du lactosérum. Elle appartient à une grande famille de transporteurs protéiques appelés protéines de liaison aux molécules hydrophobes ou lipocalines en raison de sa séquence d'acides aminés et de sa structure tridimensionnelle (Kontopidis et *al.*, 2004). Au moins deux variants génétiques (A et B) ont été mentionnées chez la vache et aussi chez le cheval et le chat. La différence entre ces variants se traduit par des différences d'acides aminés dans les positions 64 et 118. La β -lg A contient l'acide aspartique et la valine, tandis que la β -lg B contient l'acide glutamique et l'alanine respectivement dans ces deux positions.

La β -lg est une petite protéine globulaire formée dans sa structure primaire d'une seule chaîne peptidique composée de 162 acides aminés par monomère avec une masse molaire de 18 350 g/mol et une valeur de *pI* de 5,2 (Brownlow et *al.*, 1997). La structure secondaire comporte 15 % d'hélices α , 50 % de feuillets β , 15% de coudes et 15 % de structures désordonnées (Sawyer et *al.*, 2000). La Figure 14 représente les structures secondaire et tertiaire d'un monomère de β -lg.

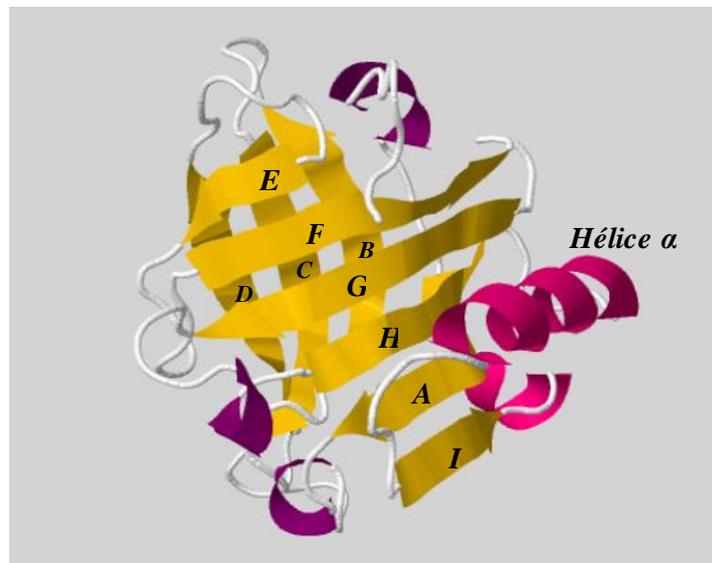


Figure 14 : Schéma représentant les structures secondaire (9 feuillets β (A à I) et une hélice α) et tertiaire (cœur lipocaline) d'un monomère de la β -lactoglobuline (Brownlow et *al.*, 1997; *Protein Data Bank*).

Dans la structure tertiaire on trouve deux liaisons disulfure (S-S) entre quatre cystéines, Cys, contenues dans la structure : la première (Cys⁶⁶-Cys¹⁶⁰) qui maintient la structure tertiaire, et une deuxième (Cys¹⁰⁶-Cys¹¹⁹), qui se trouve à la surface extérieure de la molécule. La β -lg possède aussi un groupement thiol libre (-SH) provenant de la cinquième Cys en position Cys¹²¹. L'activité de ce groupement est dépendante du pH et est impliquée dans la dénaturation et l'agrégation de la protéine par des interactions intermoléculaires (Kontopidis et *al.*, 2004).

La β -lg est largement utilisée pour produire des émulsions conventionnelles (Bouyer et *al.*, 2012). L'efficacité remarquable de cette protéine dans ce domaine a conduit à un grand nombre d'études pour produire des NEs stabilisées par la β -lg. Le Tableau 5 résume les conditions et les principaux résultats de ces études.

Tableau 5 : Les conditions et les principaux résultats de quelques études effectuées sur les NEs stabilisées par la β -lactoglobuline.

Concentration (m/m%)	Phase huileuse	Procédé et conditions	Diamètre de gouttelettes (nm)	Stabilité	Mécanisme de déstabilisation	références
5	Huile de maïs	HPM (1400 MPa, 6 cycles)	162	nd	nd	Qian et McClements, 2011
1	TCM	HPM (\approx 62 MPa, 5 cycles)	174	Non stables	Mûrissement d'Ostwald	Ahmed et al., 2012
	TCL		181	24 heures	nd	
	TCC		> 1000	24 heures	nd	
2	Huile essentielle d'orange	HPM (\approx 62 MPa, 3 cycles)	156	15 jours	nd	Qian et al., 2012
1 ^(a)	TCM	HPH (80 MPa, 20 cycles)	\approx 200	Stable contre la séparation gravitationnelle	nd	He et al., 2011
0,4	n-hexadécane	HPH (52 MPa, 5 cycles)	\approx 10 000	Non stables	coalescence	Kim et al., 2004
1			\approx 200	24 heures	nd	

^(a) β -lg dénaturée par la chaleur (30 minutes à 85°C)

nd : non déterminé

HPM : Microfluidisation à haute pression

HPH : Homogénéisation à haute pression

TCC : Triglycérides à chaînes courtes

TCM : Triglycérides à chaînes moyennes

TCL : Triglycérides à chaînes longues

d) α -Lactalbumine

L' α -lactalbumine (α -la) est la deuxième protéine majeure du lactosérum ($\approx 20\%$). C'est une petite protéine globulaire composée de 123 acides aminés avec une masse molaire de 12 400 g/mol et un point isoélectrique de 4,4. La structure secondaire contient 29,9 % d'hélice α et 18,0 % de feuillets β (Zhai et al., 2012). La structure tertiaire est maintenue par quatre liaisons disulfure (Cys⁶-Cys¹²⁰, Cys⁶¹-Cys⁷⁷, Cys⁷³-Cys⁹¹, et Cys²⁸-Cys¹¹¹), et il n'y a pas de groupements thiol libre (McKenzie et White, 1991).

Il existe peu de travaux effectués sur des NEs stabilisées par l' α -la. Zhai et al. (2012) ont rapporté la formulation d'émulsions submicroniques (diamètre moyen ≈ 600 nm) stabilisées par cette protéine et produites par l'homogénéisateur à HP (70 MPa). Ce système contenait 0,3 m/m% d' α -la et 30 m/m% de trioctanoate de glycérol en tant que phase huileuse. D'autres études pharmaceutiques ont traité la formulation des NEs contenant à la fois l' α -la et un tensioactif traditionnel. La protéine dans ces NEs n'était pas un agent émulsionnant mais un ligand à la surface des gouttelettes pour cibler l'albumine dans les tissus enflammés (Kandadi et al., 2012; Loureiro et al., 2015b).

e) Albumine de sérum bovin

L'albumine de sérum est la protéine plasmatique la plus abondante chez les mammifères. L'albumine de sérum bovin BSA (*bovine serum albumin*) est une protéine globulaire composée de 583 acides aminés avec une masse molaire de 66 000 g/mol et un point isoélectrique de 4,7. Sa structure tertiaire est composée majoritairement ($\approx 74\%$) d'hélices α et contient 17 liaisons disulfure et un groupement thiol libre (Majorek et al., 2012). La BSA a de bonnes propriétés émulsionnantes. Il a été rapporté que le clivage des liaisons disulfure augmente la flexibilité de la BSA et, par conséquent, améliore ses propriétés émulsionnantes (Tang et Shen, 2013). Une seule étude portant sur des émulsions submicroniques a montré que la taille minimale des gouttelettes formées avec l'ultrasonication est de l'ordre de 500 nm et les émulsions obtenues ne sont pas stables contre la coalescence (Tabibiazara et al., 2015).

f) Gélatine

La gélatine est un mélange de protéines non globulaires obtenu par hydrolyse partielle du collagène animal (porc, vache ou poisson). Il existe deux méthodes pour obtenir la gélatine à partir de peaux et des os : un procédé acide (gélatine A au point isoélectrique de 6 à 9) et un procédé alcalin (gélatine B avec un point isoélectrique de 5) (Stainsby, 1987). La gélatine a été très utilisée dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique, particulièrement la gélatine de mammifères (gélatines bovine et porcine). La gélatine de poisson constitue une alternative à celle de mammifères pour répondre à des préoccupations sanitaires et socio-culturelles (Karim et Bhat, 2009). La composition de la gélatine dépend de son origine et de la méthode d'extraction. En général, la teneur en protéines est de l'ordre de 20 – 25 % (Cheow et *al.*, 2007; Jakhar et *al.*, 2012), et la masse molaire moyenne est de 60 000 g/mol. La gélatine possède une activité interfaciale modérée et peut stabiliser des émulsions O/W (Lobo, 2002). Zeeb et *al.* (2014) ont étudié la production de NEs de triglycérides à chaînes moyennes stabilisées par la gélatine de poisson et préparées par HPH. Des gouttelettes nanométriques (≈ 220 nm) ont été obtenues avec 2 m/m % de gélatine, 10 m/m % de phase huileuse et 5 cycles à la pression de 150 MPa de pression. Néanmoins, dans cette étude, des gouttelettes plus petites ont été obtenues avec le WPI et le caséinate de sodium dans les mêmes conditions.

10.2.2 Protéines d'origine végétale

Dans le domaine alimentaire, les protéines végétales sont une alternative aux protéines d'origine animale en raison de leur valeur nutritionnelle comparable. Elles peuvent aussi les remplacer dans la fabrication des émulsions puisqu'elles possèdent les mêmes propriétés interfaciales. Les protéines végétales, qui ont été étudiées pour la stabilisation des NEs, sont les protéines de soja et les protéines de petit pois.

L'isolat de protéine de soja, SPI (*Soybean protein isolate*), est composé majoritairement de deux fractions de protéines globulaires : la β -conglycinine (7S, 18 000 à 21 000 g.mol⁻¹) et la glycinine (11S, 300 000 à 380 000 g.mol⁻¹) (Adachi et *al.*, 2001; Chen et Subirade, 2009). La quantité de résidus d'acides aminés non polaires est de 62,5% (% en mole) et 34,8% pour 7S et 11S, respectivement (Riblett et *al.*, 2001).

Les protéines de petit pois, PP (*Pea protein*), sont composées principalement de deux protéines : la légumine (11S, 360 000 g/mol) et la vaciline (7S, 180 000 g/mol). Ces sont des protéines globulaires dont la structure primaire est similaire à celle de la glycine et de la β -conglycinine (les protéines principales du soja) (Derbyshire et *al.*, 1976). L'efficacité de la protéine de petit pois en tant qu'agent émulsionnant a été démontrée pour la stabilisation des émulsions huile dans eau par la formation d'un film interfacial rigide (Ducel et *al.*, 2004a,b).

Nikiforidis et *al.* (2011) ont rapporté la formation d'une NE de l'huile de maïs dans l'eau lors de l'extraction de cette huile par l'ultrafiltration. L'extrait était sous forme de NEs stabilisées par la protéine de maïs extraite simultanément. La taille des gouttelettes était inférieure à 100 nm, ces NEs étaient stables pendant au moins 70 jours dans des conditions différentes de température. Les protéines de maïs sont composées de quatre groupes de protéines globulaires, à savoir : les albumines, les globulines, les prolamines et les glutélines.

Le Tableau 6 résume les travaux et les principaux résultats obtenus dans l'étude de la stabilisation de NEs par les protéines végétales.

Tableau 6 : Les conditions et principaux résultats de quelques études effectuées sur les NEs stabilisées par des protéines végétales.

Protéine	Concentration	Phase huileuse	Procédé et conditions	Diamètre de gouttelettes (nm)	Stabilité	Mécanisme de déstabilisation	Références
SPI	8 m/v% ^(a)	TCM	HPH (80 MPa, 20 cycles)	≈ 200	Stable contre la séparation gravitationnelle	nd	He et <i>al.</i> , 2011
	0,5 m/v%	Huile de soja	HPH (85 MPa, 3 min)	251	7 jours	Crémage	Yin et <i>al.</i> , 2012
	0,5 m/v% ^(b)			230	2 mois	nd	
PP	2,7 – 2,9 m/m%	Huile de tournesol	HPH (300 MPa, 5 cycles)	< 200	nd	nd	Donsi et <i>al.</i> , 2010
	3 m/m%	D-limonène, cinnamaldéhyde ou carvacrol	HPH (300 MPa, 5 cycles)	≈ 200	nd	nd	Donsi et <i>al.</i> , 2012

^(a) protéine dénaturée par la chaleur (30 minutes à 85°C)

^(b) + 2,5 m/v polysaccharide de soja

SPI : Isolat de protéine de soja

PP : protéine de petit pois

TCM : Triglycérides à chaînes moyennes

HPH : Homogénéisation à haute pression

10.3 Comparaison des propriétés émulsifiantes des différentes protéines

Bien que l'activité interfaciale des protéines dépende de leurs propriétés physico-chimiques, on peut classer les protéines utilisées dans ce domaine en deux grands groupes : les protéines globulaires (telles que les protéines du lactosérum) et non-globulaires (telles que les caséines et la gélatine). Dans la littérature, on trouve aussi d'autres termes pour désigner ce deuxième groupe tels que « protéine flexible », « protéine désordonnée », « pelote statistique » ou « *random coil* » (Mitropoulos et *al.*, 2014). Cette classification est basée sur la présence ou l'absence de structure tertiaire. Par exemple, les protéines du lactosérum ont une structure tertiaire rigide stabilisée par des liaisons disulfure. Cependant, ce niveau de structure est absent dans les caséines α_{s1} et β , donc, elles sont plus flexibles.

Les protéines flexibles présentent un état intermédiaire entre les protéines globulaires et les tensioactifs de faible masse molaire en ce qui concerne leur activité interfaciale. Par exemple, les protéines flexibles s'adsorbent plus facilement et plus rapidement à l'interface O/W (Seta et *al.*, 2014; Benjamins, 2000). En raison de l'adsorption rapide à l'interface O/W, les protéines flexibles possèdent un pouvoir émulsionnant (quantité maximale d'huile qui peut être émulsionnée dans un volume donné d'une solution de protéine) plus important que celui des protéines globulaires (Benjamins, 2000). En revanche, les interactions intermoléculaires sont moins fortes et les propriétés viscoélastiques interfaciales sont donc moins importantes que celles des protéines globulaires (Seta et *al.*, 2014).

Il était attendu, lors de la préparation des NEs par HPM ou HPH, d'obtenir des tailles de gouttelettes plus petites mais moins stables avec les protéines flexibles par rapport aux protéines globulaires en raison de la différence de la vitesse d'adsorption à l'instar des tensioactifs de faible masse molaire. Néanmoins, des études comparatives ont montré que la taille de gouttelettes des NEs préparées par HPM ou HPH et stabilisées par des protéines flexibles (la β -caséine ou le caséinate de sodium) a été similaire ou plus importante que celle obtenue avec les protéines globulaires du lactosérum (Smulders, 2000; Jafari et *al.*, 2007; Zeeb et *al.*, 2014). Ces résultats peuvent être expliqués par la différence entre les protéines globulaires et les protéines flexibles concernant les effets de l'HPH ou de l'HPM sur leurs structures et leurs activités interfaciales (Benjamins, 2000). Ces aspects ne sont pas encore clairement élucidés.

De la même façon, le film interfacial obtenu avec des protéines globulaires est censé donner une meilleure stabilité contre la coalescence que les protéines flexibles. Cela avait été confirmé pour l'interface air/eau lors de la formation de mousses (Graham et Phillips 1976). Néanmoins, Mohan et Narsimhan (1997) ont rapporté que des NEs stabilisées par le caséinate de sodium ont été plus stables contre la coalescence que celles stabilisées par des protéines du lactosérum (WPI). Cela pourrait être expliqué par la stabilisation électrostatique conférée par la charge de la protéine. Dans cette étude, le potentiel Zêta des NEs stabilisées par le caséinate de sodium était le plus élevé en valeur absolue.

D'un autre côté, les protéines du lait (la caséine ou les WPI) ont donné de meilleurs résultats pour la stabilisation des NEs en comparaison avec la gélatine de poisson (Zeeb et *al.*, 2014). Également, l'efficacité des WPI était légèrement meilleure que celle des protéines de soja en termes de taille de gouttelettes des NEs obtenues et leurs stabilités contre la séparation gravitationnelle (He et *al.*, 2011). Parmi les protéines du lait, la β -lg possède le pouvoir émulsionnant le plus élevé (Benjamins, 2000). Elle permet d'obtenir la taille des gouttelettes la plus petite lors de la préparation par l'HPH (Smulders, 2000; He et *al.*, 2011). Ses propriétés interfaciales sont plus importantes que celles des caséines (Seta et *al.*, 2014) et d'autres protéines globulaires telles que la BSA, l'ovalbumine et du lysozyme (Kiss et Borbás, 2003).

10.4 Comparaison des propriétés émulsifiantes des tensioactifs et des protéines

Les tensioactifs de faible masse molaire et les protéines sont donc des molécules amphiphiles qui s'adsorbent à l'interface O/W en réduisant la tension interfaciale et rendent possible la dispersion d'une de ces deux phases dans l'autre. Les différences entre ces deux classes d'émulsionnants en ce qui concerne leurs activités interfaciales ont été amplement étudiées et revues (Benjamins, 2000; Bos et Vliet, 2001; Fainerman et *al.*, 2003; McClements, 2005; Mackie et *al.*, 2007; Bouyer et *al.*, 2012; Lam et *al.*, 2013). On peut les regrouper de façon générale comme suit :

- Les protéines, étant des biopolymères, s'adsorbent aux interfaces O/W plus lentement que les tensioactifs de faible masse molaire.
- Les tensioactifs de faible masse molaire s'adsorbent à l'interface O/W sous forme de monocouche d'épaisseur variant en fonction de la longueur de leurs chaînes aliphatiques. Les protéines peuvent former une ou plusieurs couches à l'interface en fonction de leur concentration dans la phase aqueuse.
- L'abaissement de la tension interfaciale obtenue avec les protéines est de l'ordre de 15 à 20 mN.m^{-1} , ce qui est moins important que celui obtenu avec les petits tensioactifs synthétiques (30 à 50 mN.m^{-1}).
- Les protéines adsorbées à l'interface subissent des changements de conformation pour exposer les différentes parties hydrophobes et hydrophiles vers les surfaces appropriées. Ce n'est pas le cas des petits tensioactifs.
- Les interactions intermoléculaires à l'interface dans le cas des tensioactifs de faible masse molaire sont seulement des interactions non-covalentes, alors que des interactions covalentes peuvent aussi se produire entre les différentes molécules de protéine.
- Les protéines à l'interface, grâce aux interactions intermoléculaires et à l'enchevêtrement des leurs polypeptides, forment des films interfaciaux cohérents. Dans le cas des tensioactifs de faible masse molaire, on ne peut pas parler d'un véritable film cohésif.
- Les tensioactifs de faible masse molaire à l'interface sont mobiles et leur adsorption peut être réversible, alors que l'adsorption des protéines est partiellement irréversible.
- En raison de la mobilité des tensioactifs de petite masse molaire, les émulsions stabilisées par ce genre de tensioactifs sont moins stables à long terme contre la coalescence en comparaison avec celles stabilisées par des protéines.

Des études ont été effectuées pour comparer ces deux classes de molécules amphiphiles en ce qui concerne leur pouvoir à créer des émulsions nanométriques restant stables à long terme. Suite aux différences de cinétique d'adsorption et de l'abaissement de la tension interfaciale entre les protéines et les tensioactifs de faible masse molaire, les protéines

sont moins efficaces pour la production de nano-gouttelettes. Cela est expliqué comme suit : lors d'un procédé d'émulsification à haute énergie, le procédé consiste dans une première étape à rompre les grosses gouttes. Cette étape est plus facile dans le cas de tensioactifs de faible masse molaire puisque la tension interfaciale est moins élevée en comparaison avec les protéines. Deuxièmement, les tensioactifs de faible masse molaire s'adsorbent rapidement aux nouvelles interfaces des gouttelettes récemment créées en empêchant leur re-coalescence. Les protéines s'adsorbent moins rapidement, et donc, la re-coalescence est plus probable. Le résultat final est de la production des gouttelettes plus grosses avec les protéines (Mao *et al.*, 2009). Dans cette dernière étude, les protéines du lactosérum ont été efficaces pour produire des émulsions nanométriques (≈ 200 nm). En revanche, des gouttelettes plus petites ont été obtenues avec la même concentration de Tween 20 ou de mono-laurate de glycérol dans les mêmes conditions opératoires. Donsi *et al.* (2012) ont obtenu le même résultat en comparant les protéines de petit pois avec un mélange en égales proportions de Tween 20 et mono-oléate de glycérol, bien que la concentration de la protéine soit 3 fois plus importante que celle du mélange des tensioactifs. He *et al.* (2011) ont rapporté des résultats similaires pour les protéines de soja et celles de lactosérum en comparaison avec quatre tensioactifs différents.

D'un autre côté, les protéines sont plus efficaces que les tensioactifs de faible masse molaire pour empêcher la coalescence durant la conservation des formulations. Ceci peut être expliqué par la formation progressive d'un film interfacial viscoélastique grâce aux interactions intermoléculaires covalentes, pendant que les molécules de petits tensioactifs restent à l'état moléculaire et adsorbées de façon réversible à l'interface (Dickinson, 1997; McClements, 2004). Qian *et al.* (2012) ont démontré, par une étude de stabilité en temps réel pendant 15 jours, que les NEs stabilisées par la β -lg sont plus stables contre la coalescence que celles stabilisées par le Tween 20.

11 Conclusion

En conclusion de cette synthèse bibliographique, rappelons que les NEs comportent deux phases liquides non miscibles dispersées l'une dans l'autre sous forme de gouttes

nanométriques d'un diamètre inférieur ou égal à 200 nm avec une distribution de taille étroite. Cela présente un net avantage en terme de stabilité physique par rapport aux macroémulsions.

Les NEs huile dans eau présentent un intérêt certain pour l'encapsulation et la délivrance de SAs hydrophobes peu ou pas solubles dans l'eau en permettant d'améliorer leur solubilité. La stabilité chimique des SAs contre la dégradation chimique et enzymatique est également améliorée grâce à l'encapsulation dans la phase huileuse. La diffusibilité de la SA à partir des gouttelettes des NEs est optimisée en raison de l'interface O/W accrue et, par conséquent, leur biodisponibilité est améliorée. Ainsi, les NEs sont utilisables pour les différentes voies d'administration et adaptables par des modifications de surface dans le cadre de la libération prolongée et du ciblage.

Néanmoins, les NEs ayant une interface plus importante que les macroémulsions, il faut donc utiliser une quantité plus importante de tensioactifs pour leur formulation. Comme les agents tensioactifs utilisés sont généralement des produits de synthèse chimique, cela peut se révéler irritant, voire toxique notamment pour le traitement à longue durée des maladies chroniques.

Pour pallier cet inconvénient majeur, il est possible de remplacer ces tensioactifs de synthèse par des biopolymères pour la stabilisation des NEs. Ces biopolymères sont actuellement largement utilisés dans le domaine alimentaire pour stabiliser les macroémulsions. Ainsi, les protéines possèdent de bonnes activités interfaciales et émulsionnantes de par leur structure. Récemment, de nombreuses études ont été réalisées sur leur utilisation pour la stabilisation des NEs. Les bons résultats obtenus montrent que les protéines peuvent être des candidates intéressantes pour l'application et la stabilisation des NEs dans l'industrie pharmaceutique.

Dans le domaine alimentaire, parmi les protéines étudiées, la β -lg possède les meilleures propriétés émulsionnantes et donne de meilleurs résultats par rapport aux autres protéines en termes de taille des gouttelettes et de stabilité physique des NEs. Par ailleurs, sa structure est bien caractérisée.

Parmi les différents procédés de fabrication des NEs, les méthodes à haute énergie sont les seules possibles pour les NEs stabilisées par des protéines. Les HPH et HPM, dont le principe de fonctionnement est le même, se révèlent être parmi les méthodes les plus efficaces

et les plus adaptées pour la transposition de l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle. Leur efficacité est même plus importante que la méthode d'ultrasonication pour ces usages.

Pour mener notre travail expérimental conduisant à développer des NEs d'intérêt pharmaceutique nous avons donc choisi comme protéine la β -lg comme agent émulsionnant et le procédé d'HPH pour fabriquer les NEs.

Références

- Acosta, A., 2009. Bioavailability of Nanoparticles in Nutrient and Nutraceutical Delivery. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 14, 3-15.
- Adachi, M., Kanamori, J., Masuda, T., Yagasaki, K., Kitamura, K., Mikami, B., Utsumi, S., 2001. Crystal Structure of Soybean 11S Globulin: Glycinin A3B4 homohexamer. *Journal of Molecular Biology* 305(2), 291-305.
- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., Agboola, S., 2014. Formation of Whey Protein Isolate Hydrolysate Stabilised Nanoemulsion. *Food Hydrocolloids* 41, 169-177.
- Ahmed, K., Li, Y., McClements, D. J., Xiao, H., 2012. Nanoemulsion - and Emulsion - Based Delivery Systems for Curcumin: Encapsulation and Release Properties. *Food Chemistry* 132, 799-807.
- Anton, N., Vandamme, T. F., 2011. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharmaceutical Research* 28, 978-985.
- Anu Bhushania, J., Karthik, P., Anandharamakrishnan, C., 2016. Nanoemulsion Based Delivery System for Improved Bioaccessibility and Caco-2 Cell Monolayer Permeability of Green Tea Catechins. *Food Hydrocolloids* 56, 372-382.
- Baboota, S., Shakeel, F., Ahuja, A., Ali, J., Shafiq S., 2007. Design, Development and Evaluation of Novel Nanoemulsion Formulations for Transdermal Potential of Celecoxib. *Acta Pharmaceutica* 57, 315-332.
- Bali, V., Ali, M., Ali J., 2010. Study of Surfactant Combinations and Development of a Novel Nanoemulsion for Minimising Variations in Bioavailability of Ezetimibe. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 76, 410-420.
- Bárány, E., Lindberg, M., Lodén, M., 2000. Unexpected Skin Barrier Influence from Nonionic Emulsifiers. *International Journal of Pharmaceutics* 195, 189-195.
- Barradas, T. N., Bucco de Campos, V. E., Senna, J. P., Coutinho, C. d. S. C., Tebaldi, B. S., Gyselle de Holanda e Silva, K., Mansura, C. R. E., 2015. Development and Characterization of Promising o/w Nanoemulsions Containing Sweet Fennel Essential Oil and Non-ionic Sufactants. *Colloids and Surfaces A: Phy Physicochemical and Engineering Aspects* 480, 214-221.

- Barry, J. G. Donnelly, W. J., 1980. Casein compositional studies: 1. The Composition of Casein from Friesian Herd Milks. *Journal of Dairy Research* 47(03), 451-451.
- Bazylińska, U., Kulbacka, J. Wilk, K. A., 2014. Dicephalic Ionic Surfactants in Fabrication of Biocompatible Nanoemulsions: Factors Influencing Droplet Size and Stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 460, 312-320
- Benita, S., Levy, M. Y., 1993. Submicron Emulsions as Colloidal Drug Carriers for Intravenous Administration: Comprehensive Physicochemical Characterization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 82, 1069-1079.
- Benjamins, J., 2000. Static and Dynamic Properties of Proteins Adsorbed at Liquid Interfaces. PhD Thesis. University of Wageningen, Netherlands.
- Benzaria, A., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Hue, P., López-Pedemonte, T., Dumay E., 2013. Intracellular Fate of Retinyl Acetate-loaded Submicron Delivery Systems By In Vitro Intestinal Epithelial Cells: A Comparison Between Whey Protein-stabilised Submicron Droplets and Micelles Stabilised with Polysorbate 80. *Food Research International* 51, 679-692.
- Beverung, C. J., Radke, C. J., Blanch H.W., 1999. Protein Adsorption at the Oil/water Interface: Characterization of Adsorption Kinetics by Dynamic Interfacial Tension Measurements. *Biophysical Chemistry* 81, 59-80.
- Bingham, E. C., 1922. Fluidity and Plasticity. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Binks, B. P., Lumsdon, S. O., 2000. Influence of Particle Wettability on the Type and Stability of Surfactant-free Emulsions. *Langmuir* 16, 8622-8631.
- Borhade, V., Pathak, S., Sharma, S., Patravale, V., 2012. Clotrimazole Nanoemulsion for Malaria Chemotherapy. Part I: Preformulation Studies, Formulation Design and Physicochemical Evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 431, 138-148.
- Bos M. A., Vliet T. V., 2001. Interfacial Rheological Properties of Adsorbed Protein Layers and Surfactants: a Review. *Advances in Colloid and Interface Science* 91, 437-471.
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J. L., Agnely, F., 2012. Proteins, Polysaccharides, and their Complexes Used as Stabilizers for Emulsions: Alternatives to Synthetic Surfactants in the Pharmaceutical Field ?. *International Journal of Pharmaceutics* 436, 359-378.
- Brochette, P., 1999. Elaboration et Etude des Emulsions, Techniques de l'Ingénieur. Génie des Procédés 2J2150, J2150.1-J2150.22.
- Brownlow, S., Cabral, J. H. M., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. T., Polikarpov, I., North, A. C. T., Sawyer, L., 1997. Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å Resolution - Still an Enigmatic Lipocalin. *Structure* 5(4), 481-495.
- Buege, J. A., Aust, S. D., 1978. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology* 52, 302-310.
- Calligaris, S., Plazzotta, S., Bot, F., Grasselli, S., Malchiodi, A., Anese, M., 2016. Nanoemulsion Preparation by Combining High Pressure Homogenization and High Power Ultrasound at Low Energy Densities. *Food Research International* 83, 25-30.

- Calvo, P., Vila-Jato, J. L., Alonso, M. J., 1996. Comparative In Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85(5), 530-536.
- Cavazos-Garduño, A., Ochoa Flores, A. A., Serrano-Niño, J. C., Martínez-Sánchez, C. E., Beristain, C. I., García, H. S., 2015. Preparation of Betulinic Acid Nanoemulsions Stabilized by α -3 Enriched Phosphatidylcholine. *Ultrasonics Sonochemistry* 24, 204-213.
- Chebil, A., Desbrières, J., Nouvel, C., Six, J. L., Durand, A., 2013. Ostwald Ripening of Nanoemulsions Stopped by Combined Interfacial Adsorptions of Molecular and Macromolecular Nonionic Stabilizers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 425, 24-30.
- Chen H., Khemtong C., Yang X., Chang X., Gao J., 2011. Nanonization Strategies for Poorly Water-soluble Drugs. *Drug Discov Today* 16,(7-8), 354-360.
- Chen, L., Subirade, M., 2009. Elaboration and Characterization of Soy/Zein Protein Microspheres for Controlled Nutraceutical Delivery. *Biomacromolecules* 10(12), 3327-3334.
- Cheong, A. M., Nyam, K. L., 2016. Improvement of Physical Stability of Kenaf Seed Oil-in-water Nanoemulsions by Addition of β -cyclodextrin to Primary Emulsion Containing Sodium Caseinate and Tween 20. *Journal of Food Engineering* 183, 24-31.
- Cheong, A. M., Tan, K. W., Tan, C. P., Nyam, K. L., 2016. Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Seed Oil-in-water Pickering Nanoemulsions Stabilised by Mixture of Sodium Caseinate, Tween 20 and β -cyclodextrin. *Food Hydrocolloids* 52, 934-941.
- Cheow, C. S., Norizah, M. S., Kyaw, Z. Y., Howell, N. K., 2007. Preparation and Characterisation of Gelatins from the Skins of Sin Croaker (*Johnius dussumieri*) and Shortfin Scad (*Decapterus macrosoma*). *Food Chemistry* 101, 386-391.
- Chime, S. A., Kenechukwu, F. C., Attama, A. A., 2014. Nanoemulsions - Advances in Formulation, Characterization and Applications in Drug Delivery. In: Sezer, A. D., Application of Nanotechnology in Drug Delivery. InTech, Rijeka, Croatia, 77-126.
- Choudhury, H., Gorain, B., Karmakar, S., Biswas, E., Dey, G., Barik, R., Mandal, M., Pal, T. K., 2014. Improvement of Cellular Uptake, In Vitro Antitumor Activity and Sustained Release Profile with Increased Bioavailability from a Nanoemulsion Platform. *International Journal of Pharmaceutics* 460, 131-143.
- Clares, B., Calpena, A. C., Parra, A., Abrego, G., Alvarado, H., Fanguero, J. F., Souto, E. B., 2014. Nanoemulsions (NEs), Liposomes (LPs) and Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) for Retinyl Palmitate: Effect on Skin Permeation. *International Journal of Pharmaceutics* 473, 591-598.
- Contente, T. C., Kretzer, I. F., Filippin-Monteiro, F. B., Maria, D. A., Maranhão, R. C., 2014. Association of Daunorubicin to a Lipid Nanoemulsion that Binds to Low-density Lipoprotein Receptors Enhances the Antitumour Action and Decreases the Toxicity of the Drug in Melanoma-bearing Mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 66, 1698-1709.

- Cortés-Muñoz, M., Chevalier-Lucia, D., Dumay, E., 2009. Characteristics of Submicron Emulsions Prepared by Ultra-high Pressure Homogenisation: Effect of Chilled or Frozen Storage. *Food Hydrocolloids* 23, 640-654.
- Cross, M. M., 1965. Rheology of Non-newtonian Fluids. a New Flow Equation for Pseudoplastic Systems. *Journal of Colloid Sciences* 20, 417-437.
- Dalgleish, D. G., 1993. The Sizes and Conformations of the Proteins in Adsorbed Layers of Individual Caseins on Lattices and in Oil-in-water Emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1, 1-8.
- Damodaran, S. (1996). Amino Acids, Peptides and Proteins. In: Fennema, O. R., *Food chemistry* (3rd ed., pp. 321-430). New York: Marcel Dekker.
- Dario, M. F., Santos, M. S. C. S., Viana, A. S., Arêas, E. P. G., Bou-Chacra, N. A., Conceição Oliveira, M., Minas da Piedade, M. E., Baby, A. R., Velasco, M. V. R., 2016. A High Loaded Cationic Nanoemulsion for Quercetin Delivery Obtained by Sub-PIT Method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 489, 256-264.
- Deminiere, B., Colin, A., Leal-Calderon, F., Muzy, J. F., Bibette, J., 1999. Cell Growth in a 3d Cellular System Undergoing Coalescence. *Physical Review Letters* 82(1), 229-232.
- Derbyshire, E., Wright, D. J., Boulter, D., 1976. Legumin and Vicilin, Storage Proteins of Legume Seeds. *Phytochemistry* 15, 3-24.
- Devalapally, H., Silchenko, S., Zhou, F., McDade, J., Goloverda, G., Owen, A., Hidalgo, I. J., 2013. Evaluation of a Nanoemulsion Formulation Strategy for Oral Bioavailability Enhancement of Danazol in Rats and Dogs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 102(10), 3808-3815.
- Devarajan, V., Ravichandran, V., 2011. Nanoemulsions: As Modified Drug Delivery Tool. *International Journal of Comprehensive Pharmacy* 4(01).
- Dickinson, E., 1989. A Model of a Concentrated Dispersion Exhibiting Bridging Flocculation and Depletion Flocculation. *Journal of Colloid and Interface Science* 132(1), 274-278.
- Dickinson, E., 1997. Properties of Emulsions Stabilized with Milk Proteins: Overview of Some Recent Developments. *Journal of Dairy Science*, 80, 2607-2619.
- Dickinson, E., 2001. Milk Protein Interfacial Layers and the Relationship to Emulsion Stability and Rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 20, 197-210.
- Dickinson, E., Davies, E., 1999. Influence of Ionic Calcium on Stability of Sodium Caseinate Emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 12, 203-212.
- Dickinson, E., Matsumura, Y., 1991. Time-dependent Polymerization of β -lactoglobulin Through Disulfide Bonds at the Oil-water Interface in Emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13, 26-30.
- Dickinson, E., Walstra, P., 1993. *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*. Woodhead Publishing, UK.
- Donsì, F., Annunziata, M., Vincenzi, M., Ferrari, G., 2012. Design of Nanoemulsion-based Delivery Systems of Natural Antimicrobials: Effect of the Emulsifier. *Journal of Biotechnology* 159, 342-350.

- Donsì, F., Senatore, B., Huang, Q., Ferrari, G., 2010. Development of Novel Pea Protein-based Nanoemulsions for Delivery of Nutraceuticals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 10653-10660.
- Du Toit, L. C., Pillay, V., Choonara, Y. E., Govender, T., Carmichael, T., 2011. Ocular Drug Delivery - A look Yowards Nanobioadhesives. *Expert Opinion on Drug Delivery* 8, 71-94.
- Ducel, V., Richard, J., Popineau, Y., Boury, F., 2004a. Adsorption kinetics and rheological interfacial properties of plant proteins at the oil-water interface. *Biomacromolecules* 5(6), 2088-2093.
- Ducel, V., Richard, J., Saulnier, P., Popineau, Y., Boury, F., 2004b. Evidence and Characterization of Complex Coacervates Containing Plant Proteins: Application to the Microencapsulation of Oil Droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 232, 239-247.
- Durand A., Marie E., Rotureau E., Leonard M., Dellacherie E., 2004. Amphiphilic Polysaccharides: Useful Tools for the Preparation of Nanoparticles with Controlled Surface Characteristics. *Langmuir* 20, 6956-6963.
- El-Aasser, M. S., Sudol, E. D., 2004. Miniemulsions: Overview of Research and Applications. *The Tess Award Symposium, Boston, Massachusetts, U.S.A. (08/2002)* (1), 20-31.
- Fainerman V. B., Lucassen-Reynders, E.H., Miller R., 2003. Description of the Adsorption Behaviour of Proteins at Water/Fluid Interfaces in the Framework of a Two-dimensional Solution Model. *Advances in Colloid and Interface Science* 106, 237-259.
- Fang, J. Y., Leu, Y. L., Chang, C. C., Lin, C. H., Tsai, Y. H., 2004. Lipid Nano/Submicron Emulsions as Vehicles for Topical Flurbiprofen Delivery. *Drug Delivery* 11, 97-105.
- Fang, Y., Dalgleish, D. G., 1993. Dimensions of the Adsorbed Layers in Oil-in-water Emulsions Stabilized by Caseins. *Journal of Colloid and Interface Science* 156, 329-334.
- Fang, Y., Dalgleish, D. G., 1997. Conformation of Beta-lactoglobulin Studied by FTIR: Effect of pH, Temperature, and Adsorption to the Oil-water Interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 196, 292-298.
- Feng, J., Shi, Y., Yu, Q., Sun, C., Yang, G., 2016. Effect of Emulsifying Process on Stability of Pesticide Nanoemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 497, 286-292.
- Floury, J., Desrumaux, A., Lardières, J., 2000. Effect of High-pressure Homogenization on Droplet Size Distributions and Rheological Properties of Model Oil-in-water Emulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 1, 127-134.
- Foegeding, E. A., Davis, J. P. (2011). Food Protein Functionality: A Comprehensive Approach. *Food Hydrocolloids*, 25, 1853-1864.
- Fofaria, N. M., Qhattal, H. S. S., Liu, X., Srivastava, S. K., 2016. Nanoemulsion Formulations for Anti-cancer Agent Piplartine — Characterization, Toxicological, Pharmacokinetics and Efficacy Studies. *International Journal of Pharmaceutics* 498, 12-22.

- Gallarate, M., Chirio, D., Bussano, R., Peira, E., Battaglia, L., Baratta, F., Trotta, M., 2013. Development of O/W Nanoemulsions for Ophthalmic Administration of Timolol. *International Journal of Pharmaceutics* 440, 126-134.
- Ganta, S., Devalapally, H., Amiji, M., 2010a. Curcumin Enhances Oral Bioavailability and Anti-tumor Therapeutic Efficacy of Paclitaxel Upon Administration in Nanoemulsion Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99(11), 4630-4641.
- Ganta, S., Sharma, P., Paxton, J. W., Baguley, B. C., Garg, S., 2010b. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Chlorambucil Delivered in Long-circulating Nanoemulsion. *Journal of Drug Targeting* 18, 125-133.
- Gimeno Sandiga, A., Calpena Campmanyb, A. C., Fernández Camposb, F., Martín Villenac, M. J., Clares Naverosc, B., 2013. Transdermal Delivery of Imipramine and Doxepin from Newly Oil-in-water Nanoemulsions for an Analgesic and Anti-allodynic Activity: Development, Characterization and In Vivo Evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 103, 558-565.
- Grace, H. P., 1982. Dispersion Phenomena in High Viscosity Immiscible Fluid Systems and Application of Static Mixers as Dispersion Devices in Such Systems. *Chemical Engineering Communications* 14, 225-277.
- Graham, D. E., Phillips, M. C., 1976. The Conformation of Proteins at the Air/water Interface and their Role in Stabilizing Foams. In "Foams", Akersed, R. J.. Academic Press, London. UK.
- Guerra-Rosas, M. I., Morales-Castro, J., Ochoa-Martínez, L. A., Salvia-Trujillo, L., Martín-Belloso, O., 2016. Long-term Stability of Food-grade Nanoemulsions from High Methoxyl Pectin Containing Essential Oils. *Food Hydrocolloids* 52, 438-446.
- Gupta, A., Burak Eral, H., Alan Hattona, T., Doyle, P. S., 2016. Nanoemulsions: Formation, Properties and Applications. *Soft Matter* 12, 2826-2841.
- Gursoy, R. N., Benita, S., 2004. Self-emulsifying Drug Delivery Dystems (SEDDS) for Improved Oral Delivery of Lipophilic Drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 58(3), 173-182.
- Guzey, D., McClements, D. J., (2007). Impact of Electrostatic Interactions on Formation and Stability of Emulsions Containing Oil Droplets Coated by β lactoglobulin-pectin Complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 475-485.
- Harris, A., 1993. Clinical Opportunities Provided by the Nasal Administration of Peptides. *Journal of Drug Targeting* 1(2), 101-116.
- Harwansh, R. K., Mukherjee, P. K., Bahadur, S., Biswas, R., 2015. Enhanced Permeability of Ferulic Acid Loaded Nanoemulsion Based Gel Through Skin Against UVA Mediated Oxidative Stress. *Life Sciences* 141, 202-211.
- Harwansh, R. K., Patra, K. Ch., Pareta, S. K., Singh, J., Rahman, M. A., 2011. Nanoemulsions as Vehicles for Transdermal Delivery of Glycyrrhizin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 47(4), 769-778.
- Hauss, D. J., 2007. Oral Lipid-based Formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59(7), 667-676.
- He, W., Tan, Y., Tian, Z., Chen, L., Hu, F., Wu, W., 2011. Food Protein-stabilized Nanoemulsions as Potential Delivery Systems for Poorly Water-soluble Drugs:

- Preparation, In Vitro Characterization, and Pharmacokinetics in Rats. *International Journal of Nanomedicine* 6, 521-533.
- Herschel, W. H., Bulkley, R., 1926). Konsistenzmessungen von Gummi-benzollösungen. *Kolloid Zeitschrift* 39, 291-300.
- Howe, A. M., Pitt, A. R., 2008. Rheology and Stability of Oil-in-water Nanoemulsions Stabilised by Anionic Surfactant and Gelatin 2) Addition of Homologous Series of Sugar-based Co-surfactants. *Advances in Colloid and Interface Science* 144(1-2), 24-29.
- Huang, Q., Yu, H., Ru, Q., 2010. Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology. *Journal of Food Science* 75, R50-R57.
- Israelachvili, J. N., 1992. Aggregation of Amphiphilic Molecules into Micelles, Bilayers, Vesicles and Biological Membranes in Intermolecular and Surface Forces 2nd. Academic Press, London, UK.
- Jackson, N. E., Tucker, C. L., 2003. A Model for Large Deformation of an Ellipsoidal Droplet with Interfacial Tension. *Journal of Rheology* 47, 659-682.
- Jafari, S. M., Beheshti, P., Assadpoor, E., 2012. Rheological Behavior and Stability of D-limonene Emulsions Made by a Novel Hydrocolloid (Angum gum) Compared with Arabic Gum. *Journal of Food Engineering* 109, 1-8.
- Jafari, S. M., He, Y., Bhandari, B., 2006. Nano-emulsion Produced by Sonication and Microfluidization: A Comparison. *International Journal of Food Properties* 9, 475-485.
- Jafari, S. M., He, Y., Bhandari, B., 2007. Optimization of Nano-emulsions Production by Microfluidization. *European Food Research and Technology* 225, 733-741.
- Jakhar, J. K., Reddy, A. D., Maharia, S., Devi, H. M., Reddy, G. V. S., Venkateshwarlu, G., 2012. Characterization of Fish Gelatin from Blackspotted Croaker (*Protonibea diacanthus*). *Archives of Applied Science Research* 4(3), 1353-1358.
- Jamting, Å. K., Cullen, J., Coleman, V. A., Lawn, M., Herrmann J., Miles, J., Ford, M. J., 2011. Systematic Study of Bimodal Suspensions of Latex Nanoparticles Using Dynamic Light Scattering. *Advanced Powder Technology* 22(2), 290-293.
- Joscelyne, S. M., Trägårdh, G., 1999. Food Emulsions Using Membrane Emulsification: Conditions for Producing Small Droplets. *Journal of Food Engineering* (39), 59-64.
- Joscelyne, S. M., Trägårdh, G., 2000. Membrane Emulsification - a Literature Review. *Journal of Membrane Science* (169), 107-117.
- Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J. F., Kasapis, S., Barrow, C. J., 2012. Interfacial and Emulsifying Properties of Lentil Protein Isolate. *Food Chemistry* 134, 1343-1353.
- Joy, J., Krishnakumar, K., John, A., Dineshkumar, B., 2015. Nano-emulsion in Pharmaceuticals: A Review. *Current Research in Drug Targeting* 5(1), 1-4.
- Kakumanu, S., Tagne, J. B., Wilson, T. A., Nicolosi, R. J., 2011. A Nanoemulsion Formulation of Dacarbazine Reduces Tumor Size in a Xenograft Mouse Epidermoid Carcinoma Model Compared to Dacarbazine Suspension. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 7, 277-283.

- Kandadi, P., Syed, M. A., Goparaboina, S., Veerabrahma, K., 2012. Albumin Coupled Lipid Nanoemulsions of Diclofenac for Targeted Delivery to Inflammation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8, 1162-1171.
- Karaca, A. C., Low, N., Nickerson, M., 2011. Emulsifying Properties of Chickpea, Faba Bean, Lentil and Pea Proteins Produced by Isoelectric Precipitation and Salt Extraction. *Food Research International*, 44, 2742-2750.
- Karim, A. A., Bhat, R., 2009. Fish Gelatin: Properties, Challenges, and Prospects as an Alternative to Mammalian Gelatins. *Food Hydrocolloids* 23(3), 563-576.
- Khurana, S., Jain, N. K., Bedi, P. M. S., 2013. Nanoemulsion Based Gel for Transdermal Delivery of Meloxicam: Physico-chemical, Mechanistic Investigation. *Life Sciences* 92, 383-392.
- Kim H. J., Decker E. A., McClements D. J., 2002. Role of Postadsorption Conformation Changes of β -lactoglobulin on its Ability to Stabilize Oil Droplets Against Flocculation During Heating at Neutral pH. *Langmuir* 18,7577-7583.
- Kim H. J., Decker E. A., McClements D. J., 2004. Influence of Free Protein on Flocculation Stability of β -lactoglobulin Stabilized Oil-in-water Emulsions at Neutral pH and Ambient Temperature. *Langmuir* 20,10394-10398.
- Kim, H. J., Decker, E. A., McClements, D. J., 2005. Influence of Protein Concentration and Order of Addition on the Thermal Stability of Beta-lactoglobulin Stabilized n-Hexadecane Oil-in-water Emulsions at Neutral pH. *Langmuir* 21, 134-139.
- Kiss, E., Borbás, R., 2003. Protein Adsorption at Liquid/Liquid Interface with Low Interfacial Tension. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 31, 169-176.
- Klang, V., Matskob, N. B., Valenta, C., Hofer, F., 2012. Electron Microscopy of Nanoemulsions: An Essential Tool for Characterisation and Stability Assessment. *Micron* 43, 85-103.
- Klang, V., Valenta, C., 2011. Lecithin-based Nanoemulsions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 21(1), 55-76.
- Komaiko, J., Sastrosubroto, A., McClements, D. J., 2016. Encapsulation of ω -3 Fatty Acids in Nanoemulsion-based Delivery Systems Fabricated From Natural Emulsifiers: Sunflower Phospholipids. *Food Chemistry* 203, 331-339.
- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L., 2004. Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science* 87(4), 785-796.
- Kumar, M., Misra, A., Babbar, A. K., Mishra, A. K., Mishra, P., Pathak, K., 2008. Intranasal Nanoemulsion Based Brain Targeting Drug Delivery System of Risperidone. *International Journal of Pharmaceutics* 358, 285-291.
- Lallemant, F., Daull, Ph., Benita, S., Buggage, R., Garrigue, J. S., 2012. Successfully Improving Ocular Drug Delivery Using the Cationic Nanoemulsion, Novasorb. *Journal of Drug Delivery* 2012, 1-16.
- Lam, R. S. H., Nickerson, M. T., 2013. Food Proteins: A Review on their Emulsifying Properties Using a Structure-function Approach. *Food Chemistry* 141, 975-984.
- Landfester, K., Bechthold, N., Tiarks, F., Antonietti, M., 1999. Formulation and Stability Mechanisms of Polymerizable Miniemulsions. *Macromolecules* 32(16), 5222-5228.

- Lante, A., Friso, D., 2013. Oxidative Stability and Rheological Properties of Nanoemulsions with Ultrasonic Extracted Green Tea Infusion. *Food Research International* 54, 269-276.
- Laouini, A., Fessi, H., Charcosset, C., 2012. Membrane Emulsification: A Promising Alternative for Vitamin E Encapsulation Within Nano-emulsion. *Journal of Membrane Science* 423-424, 85-96.
- Lee, S. J., Choi, S. J., Nli, Y., Decker, E. A., McClements, D. J., 2011. Protein-stabilized Nanoemulsions and Emulsions: Comparison of Physicochemical Stability, Lipid Oxidation, and Lipase Digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 415-427.
- Lee, S. J., McClements, D. J., 2010. Fabrication of Protein-stabilized Nanoemulsions Using a Combined Homogenization and Amphiphilic Solvent Dissolution/Evaporation Approach. *Food Hydrocolloids* 24, 560-569.
- Lefèvre, Th., Subirade, M., 2003. Formation of Intermolecular β -sheet Structures: A Phenomenon Relevant to Protein Film Structure at Oil-water Interfaces of Emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 263, 59-67.
- Lémery, E., Briançon, S., Chevalier, Y., Bordes, C., Oddos, T., Gohier, A., Bolzinger, M. A., 2015. Skin Toxicity of Surfactants: Structure/Toxicity Relationships. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 469, 166-179.
- Li, M., Ma, Y., Cui, J., 2014. Whey-protein-stabilized Nanoemulsions as a Potential Delivery System for Water-insoluble Curcumin. *LWT - Food Science and Technology* 59, 49-58.
- Li, X., Qi, J., Xie, Y., Zhang, X., Hu, S., Xu, Y., Lu, Y., Wu, W., 2013. Nanoemulsions Coated with Alginate/Chitosan as Oral Insulin Delivery Systems: Preparation, Characterization, and Hypoglycemic Effect in Rats. *International Journal of Nanomedicine* 8, 23-32.
- Liang, R., Shoemaker, C. F., Yang, X., Zhong, F., Huang, Q., 2013. Stability and Bioaccessibility of β -carotene in Nanoemulsions Stabilized by Modified Starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(6), 1249-1257.
- Liang, R., Xu, Sh., Shoemaker, C. F., Li, Y., Zhong, F., Huang, Q., 2012. Physical and Antimicrobial Properties of Peppermint oil Nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(30) 7548-7555.
- Lifshitz, I. M., Slyozov, V. V., 1961. The Kinetics of Precipitation from Supersaturated Solid Solutions. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 19, 35-50.
- Lobo, L., 2002. Coalescence During Emulsification; 3. Effect of Gelatin on Rupture and Coalescence. *Journal of Colloid and Interface Science* 254, 165-174.
- López-Montilla, J. C., Herrera-Morales, P. E., Pandey, S., Shah, D. O., 2002. Spontaneous Emulsification: Mechanisms, Physicochemical Aspects, Modeling, and Applications. *Journal of Dispersion Science and Technology* 23(1-3), 219-268.
- Loureiro, A., Bernardes, G. J. L., Shimanovich, U., Sárria, M. P., Nogueira, E., Preto, A., Gomes, A. C., Cavaco-Paulo A., 2015a. Folic Acid-tagged Protein Nanoemulsions Loaded with CORM-2 Enhance the Survival of Mice Bearing Subcutaneous A20

- Lymphoma Tumors. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 11, 1077-1083.
- Loureiro, A., Nogueira, E., Azoia, N. G., Sárria, M. P., Abreu, A. S., Shimanovich, U., Rollett, A., Härmarke, J., Heberte, H., Guebitz, G., Bernardes, G. J. L., Preto, A., Gomes, A. C., Cavaco-Paulo, A., 2015b. Size Controlled Protein Nanoemulsions for Active Targeting of Folate Receptor Positive Cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 135, 90-98.
- Lovelyn, C., Attama, A. A., 2011. Current State of NEs in Drug Delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 2, 626-639.
- Mackie, A. R., Ridout, M. J., Moates, G., Husband, F. A., Wilde, P. J., 2007. Effect of the Interfacial Layer Composition on the Properties of Emulsion Creams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5611-5619.
- Madhusudhan, B., Rambhau, D., Apte, S.S., Gopinath, D., 2007. 1-O-Alkylglycerol Stabilized Carbamazepine Intravenous o/w Nanoemulsions for Drug Targeting in Mice. *Journal of Drug Targeting* 15, 154-161.
- Maher, P. G., Fenelon, M. A., Zhou, Y., Kamrul, H. M., Roos, Y. H., 2011. Optimization of β -casein Stabilized Nanoemulsions Using Experimental Mixture Design. *Journal of Food Science* 76(8), C1108-C1117.
- Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayala, A., Zimmerman, M. D., Jablonska, K., Stewart, A. J., Chruszcz, M., Minor, W., 2012. Structural and Immunologic Characterization of Bovine, Horse, and Rabbit Serum Albumins. *Molecular Immunology* 52, 174-182.
- Malgope, A., Murthy, P. N., Ramani R., Dey, S., 2013. Development of Nanoemulsion as Carrier for Transdermal Delivery of Valsartan. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences* 2(4), 1655-1665.
- Mao, L., Xu, D., Yang, J., Yuan, F., Gao, Y., Zhao, J., 2009. Effects of Small and Large Molecule Emulsifiers on the Characteristics of β -carotene Nanoemulsions Prepared by High Pressure Homogenization. *Food Technology Biotechnology* 47(3), 336-342.
- Marxer, E. E., Brussler, J., Becker, A., Schummelfeder, J., Schubert, R., Nimsky, C., Bakowsky, U., 2011. Development and Characterization of New Nanoscaled Ultrasound Active Lipid Dispersions as Contrast Agents. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 77, 430-437.
- Mason, T. G., Wilking J. N., Meleson K., Chang, C. B., Graves, S. M., 2006. Nanoemulsions: Formation, Structure, and Physical Properties. *Journal of Physics: Condensed Matter* (18), R635-R666.
- Mbela, T. K. M., Deharo, E., Haemers, A., Ludwig, A., 1998. Biopharmaceutics: Submicron Oil-in-water Emulsion Formulations for Mefloquine and Halofantrine: Effect of Electric-Charge Inducers on Antimalarial Activity in Mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50(11), 1221-1225.
- McClements D. J., Rao J. I., 2011. Food-grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51, 285-330.
- McClements, D. J., 1999. *Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques*, (2nd ed.). Boca Raton, Florida, U.S.A.: CRC Press.

- McClements, D. J., 2004. Protein-stabilized Emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 9, 305-313.
- McClements, D. J., 2005. *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques* (2nd ed.). Boca Raton, Florida, U.S.A.: CRC Press Taylor & Francis Group.
- McClements, D.J., 2011. Edible nanoemulsions: Fabrication, Properties, and Functional Performance. *Soft Matter* 7, 2297-2316.
- McDonald, R. E., Hultin, H. O., 1987. Some Characteristics of the Enzymic Lipid Peroxidation System in the Microsomal Fraction of Flounder Skeletal Muscle. *Journal of Food Science* 52(1), 15-21.
- McKenzie, A., White, F. H. Jr., 1991. Lysozyme and α -lactalbumin: Structure, Function, and Interrelationships. *Advanced in Protein Chemistry* 41, 173-315.
- Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K., Snabre, P., 1999a. Characterisation of Instability of Concentrated Dispersions by a New Optical Analyser: the TURBISCAN MA 1000. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 152, 111-123.
- Mengual, O., Meunier, G., Cayré, I., Puech, K., Snabre, P., 1999b. TURBISCAN MA 2000: Multiple Light Scattering Measurement for Concentrated Emulsion and Suspension Instability Analysis. *Talanta* 50, 445-456.
- Mitropoulos V., Mütze A., Fischer P., 2014. Mechanical Properties of Protein Adsorption Layers at the Air/Water and Oil/Water Interface: A Comparison in Light of the Thermodynamical Stability of Proteins. *Advances in Colloid and Interface Science* 206, 195-206.
- Mizrahi, M., Friedman-Levi, Y., Larush, L., Frid, K., Binyamin, O., Dori, D., Fainstein, N., Ovadia, H., Ben-Hur, T., Magdassi, S., Gabizon, R., 2014. Pomegranate Seed Oil Nanoemulsions for the Prevention and Treatment of Neurodegenerative Diseases: The Case of Genetic CJD. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 10, 1353-1363.
- Mohan, S., Narsimhan, G., 1997. Coalescence of Protein-stabilized Emulsions in a High-pressure Homogenizer. *Journal of Colloid and Interface Science* 192(1), 1-15.
- Monahan, F. J., McClements, D. J., Kinsella, J. E., 1993. Polymerization of Whey Proteins in Whey Protein-stabilized Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41(11), 1826-1829.
- Morais Diane, J. M., Burgess, J., 2014. Vitamin E Nanoemulsions Characterization and Analysis. *International Journal of Pharmaceutics* 465, 455-463.
- Mostafa, D. M., Abd El-Alim, S. H., Asfour, M. H., Al-Okbi, S. Y., Mohamed, D. A., Awad, G., 2015. Transdermal Nanoemulsions of *Foeniculum Vulgare* Mill. Essential Oil: Preparation, Characterization and Evaluation of Antidiabetic Potential. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 29, 99-106.
- Nasr, M., Nawaz, S., Elhissi, A., 2012. Amphotericin B Lipid Nanoemulsion Aerosols for Targeting Peripheral Respiratory Airways via Nebulization. *International Journal of Pharmaceutics* 436, 611-616.
- Nazarzadeh, E., Anthonypillai, T., Sajjadi, S., 2013. On the Growth Mechanisms of Nanoemulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 397, 154-162.

- Nikiforidis C. V., Karkani O. A., Kiosseoglou V., 2011. Exploitation of Maize Germ for the Preparation of a Stable Oil-body Nanoemulsion Using a Combined Aqueous Extraction-ultrafiltration Method. *Food Hydrocolloids* 25, 1122-1127.
- Nirmala, M. J., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2014. A Nanoemulsion Drug Delivery System for an Aqueous Insoluble Drug, Ultrasonication Technique for Ramipril Preparation. *International Journal of Chemical Technology Research* 6(3), 2020-2022.
- Oh, D. H., Balakrishnan, P., Oh, Y. K., Kim, D. D. Yong, C. S., Choi, H. G., 2011. Effect of Process Parameters on Nanoemulsion Droplet Size and Distribution in SPG Membrane Emulsification. *International Journal of Pharmaceutics* 404(1-2), 191-197.
- Ostwald W., 1925. *Kolloid Zeitschrift* 36, 99-117.
- Paulsson, M., 1990. Thermal Denaturation of Whey Proteins and Adsorption at the Air/Water Interface. PhD Thesis. University of Lund, Sweden.
- Persson, K. H., Blute, I. A., Mira, I. C., Gustafsson, J., 2014. Creation of Well-defined Particle Stabilized Oil-in-water Nanoemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 459, 48-57.
- Porras, M., Martínez, A., Solans, C., González, C., Gutiérrez, J. M., 2005. Ceramic Particles Obtained Using W/O Nano-emulsions as Reaction Media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 270 271, 189-194.
- Porras, M., Solans, C., González, C., Gutiérrez, J. M., 2008. Properties of Water-in-oil (W/O) Nano-emulsions Prepared by a Low-energy Emulsification Method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 324, 181-188.
- Porras, M., Solans, C., González, C., Martínez, A., Guinart, A., Gutiérrez, J. M., 2004. Studies of Formation of W/O Nano-emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 249, 115-118.
- Preetz, C., Hauser, A., Hause, G., Kramer, A., Mader, K., 2010. Application of Atomic Force Microscopy and Ultrasonic Resonator Technology on Nanoscale: Distinction of Nanoemulsions from Nanocapsules. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 39, 141-151.
- Qian, C., McClements, D. J., 2011. Formation of Nanoemulsions Stabilized by Model Food-grade Emulsifiers Using High-pressure Homogenization: Factors Affecting Particle Size. *Food Hydrocolloids* 25, 1000-1008.
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., McClements D. J., 2012. Physical and Chemical Stability of β -carotene-enriched Nanoemulsions: Influence of pH, Ionic Strength, Temperature, and Emulsifier Type. *Food Chemistry* 132, 1221-1229.
- Rachmawati, H., Budiputra, D. K., Mauludin, R., 2014. Curcumin Nanoemulsion for Transdermal Application: Formulation and Evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 41(4), 560-566.
- Rahn-Chique, K., Puertas, A. M., Romero-Cano, M. S., Rojas, C., Urbina-Villalba, G., 2012. Nanoemulsion Stability: Experimental Evaluation of Theflocculation Rate from Turbidity Measurements. *Advances in Colloid and Interface Science* 178, 1-20.
- Relkin, P., Jung, J. M., Ollivon, M., 2009. Factors Affecting Vitamin Degradation in Oil-in-water Nano-emulsions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 98, 13-18.

- Relkin, P., Shukat, R., Bourgaux, C., Meneau, F., 2011. Nanostructures and Polymorphisms in Protein Stabilised Lipid Nanoparticles, as Food Bioactive Carriers: Contribution of Particle Size and Adsorbed Materials. *Procedia Food Science* 1, 246-250.
- Riblett, A. L., Herald, T. J., Schmidt, K. A., Tilley, K. A., 2001. Characterization of Beta-conglycinin and Glycinin Soy Protein Fractions from Four Selected Soybean Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10), 4983-4989.
- Ridel, L., 2015. Pickering Emulsions: Theoretical Approach and Applications. Interfacial Physico-chemical Analysis. Obtention of Pickering Nanoemulsions by Spontaneous Emulsification and Pickering Aerated Emulsions. PhD Thesis. Villeurbanne, France.
- Rosen M. J., Kunjappu, J. T., 2012. Characteristic Features of Surfactants. In: *Surfactants and Interfacial Phenomena* (4th ed.). John Wiley and Sons. New Jersey.
- Ru, Q., Yu, H., Huang, Q., 2010. Encapsulation of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Using Oil-in-water (O/W) Submicrometer Emulsions Stabilized by ι -Carrageenan and β -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 10373-10381.
- Saberi, A. H., Fang, Y., McClements, D. J., 2013a. Effect of Glycerol on Formation, Stability, and Properties of Vitamin-E Enriched Nanoemulsions Produced Using Spontaneous Emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science* 411, 105-113.
- Saberi, A. H., Fang, Y., McClements, D. J., 2013b. Fabrication of Vitamin E-Enriched Nanoemulsions by Spontaneous Emulsification: Effect of Propylene Glycol and Ethanol on Formation, Stability, and Properties. *Food Research International* 54, 812-820.
- Salager, J. L., Forgiarini, A., Lopez, J. C., Marfisi, S., Alvarez, G., 2004. Dynamics of Near-zero Energy Emulsification. CD Proceedings 6th World Surfactant Congress CESIO, Berlin, Germany, June 21-23, 2004.
- Salager, J. L., Forgiarini, A., Marquez, L., 2006. Nanoemulsions. FIRP Booklet n°E237A Laboratorio FIRP, Escuela De Ingenieria Quimica, Universidad de Los Andes, Venezuela.
- Salager, J.-L., Antón, R., Andérez, J. M., Aubry, J. M., 2001. Formulation des Microémulsions par la Méthode du HLD. In: *Technique de l'Ingénieur. Génie des Procédés J2 157*, 1-20.
- Salvia-Trujillo, L., Decker, E. A., McClements, D. J., 2016. Influence of an Anionic Polysaccharide on the Physical and Oxidative Stability of Omega-3 Nanoemulsions: Antioxidant Effects of Alginate. *Food Hydrocolloids* 52, 690-698.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, A., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O., 2015. Physicochemical Characterization and Antimicrobial Activity of Food-grade Emulsions and Nanoemulsions Incorporating Essential Oils. *Food Hydrocolloids* 43, 547-556.
- Santos-Magalhães, N. S., Pontes, A., Pereira, V. M. W., Caetano, M. N. P., 2000. Colloidal Carriers for Benzathine Penicillin G: Nanoemulsions and Nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics* 208, 71-80.
- Sawyer, L., Kontopidis, G., 2000. The Core Lipocalin, Bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1482, 136-148.

- Schuster, D., 1996. *Encyclopedia of Emulsion Technology* 4. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Schwarz, J. C., Klang, V., Karall, S., Mahrhauser, D., Resch, G. P., Valenta, C., 2012. Optimisation of Multiple W/O/W Nanoemulsions for Dermal Delivery of Acyclovir. *International Journal of Pharmaceutics* 435, 69-75.
- Seta, L., Baldino, N., Gabriele, D., Lupi, F. R., de Cindio, B., 2014. Rheology and Adsorption Behaviour of β -casein and β -lactoglobulin Mixed Layers at the Sunflower Oil/water Interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 441, 669-677.
- Ševčíková, P., Kašpárková, V., Vltavská, P., Krejčí, J., 2012. On the Preparation and Characterization of Nanoemulsions Produced by Phase Inversion Emulsification. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 410, 130-135.
- Shafiq, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ahmad, F. J., Khar, R. K., Ali, M., 2007. Development and Bioavailability Assessment of Ramipril Nanoemulsion Formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66, 227-243.
- Shah P., Bhalodia, D., Shelat, P., 2010. Nanoemulsions: A Pharmaceutical Review. *Systematic Reviews in Pharmacy* 1(1), 24-32.
- Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Aqil, M., Shafiq, S., 2007. Nanoemulsions as Vehicles for Transdermal Delivery of Aceclofenac. *AAPS PharmSciTech* 8(4), Article 104.
- Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Shafiq, S., 2008. Skin Permeation Mechanism and Bioavailability Enhancement of Celecoxib from Transdermally Applied Nanoemulsion. *Journal of Nanobiotechnology*, 6:8.
- Shantha, N. C, Decker, E. A., 1994. Rapid, Sensitive, Iron-based Spectrophotometric Methods for Determination of Peroxide Values of Food Lipids. *Journal of AOAC International* 77(2), 421-424.
- Shaw, D. J., 1992. *Introduction to Colloid and Surface Chemistry* (4th ed.). Butterworth-Heinemann, Oxford, UK.
- Sigward, E., 2014. *Conception et Evaluation de Nanoémulsions Multiples Autoémulsionnables Comme Vecteurs de Molécules d'Intérêt Thérapeutique*. PhD Thesis. University of Paris 6, Paris, France.
- Sjöblom, J., 1992. *Emulsions: A Fundamental and Practical Approach*, Springer Science & Business Media, Berlin, Germany.
- Smulders, P. E. A., 2000. *Formation and Stability of Emulsions Made with Proteins and Peptides*. PhD Thesis. University of Wageningen, Netherlands.
- Solans C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., Garcia-Celma, M. J., 2005. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10, 102-110.
- Solans, C., Esquena, J., Forgiarini, A. M., Usón, N., Morales, D., Izquierdo, P., Azemar, N., 2002. Nano-Emulsions: Formation, Properties, and Applications. In: Mittal, K. L.,

- Shah, D., O., Adsorption and Aggregation of Surfactants in Solution. Marcel Dekker, Inc. New York/Basel. 525-554.
- Sotomayor-Gerding, D., Dave Oomah, B., Acevedo, F., Morales, E., Bustamante, M., Shene, C., Rubilar, M., 2016. High Carotenoid Bioaccessibility Through Linseed Oil Nanoemulsions with Enhanced Physical and Oxidative Stability. *Food Chemistry* 199, 463-470.
- Stainsby, G., 1987. Gelatin gels. In: *Advances in Meat research.*, Pearson, A. M., Dutson, T. R., Bailey, A. J., (Eds.), Vol. 4. New York: Van Nostrand Reinhold Company Inc., 209-222.
- Suciati, T., Aliyandi, A., Satrialdi, 2014. Development of Transdermal Nanoemulsion Formulation for Simultaneous Delivery of Protein Vaccine and Artin-M Adjuvant. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6(6), 536-546.
- Tabibiazara, M., Davaran, S., Hashemi, M., Homayonirad, A., Rasoulzadeh, F., Hamishehkar, H., Mohammadifar, M. A., 2015. Design and Fabrication of a Food-grade Albumin-stabilized Nanoemulsion. *Food Hydrocolloids* 44, 220-228.
- Tadros, T. F., 2013. *Emulsion Formation, Stability, and Rheology.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany.
- Tadros, T., 2009. Polymeric Surfactants in Disperse Systems. *Advances in Colloid and Interface Science* 147-148, 281-299.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C., 2004. Formation and Stability of Nano-Emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 108-109, 303-318.
- Tamilvanan, S., 2004. Oil-in-water Lipid Emulsions: Implications for Parenteral and Ocular Delivering Systems. *Progress in Lipid Research* 43, 489-533.
- Tang, C. H., Shen, L. 2013. Role of Conformational Flexibility in the Emulsifying Properties of Bovine Serum Albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(12), 3097-3110.
- Tayel, S. A., El-Nabarawi, M. A., Tadros, M. I., Abd-Elsalam, W. H., 2013. Promising Ion-sensitive in Situ Ocular Nanoemulsion Gels of Terbinafine Hydrochloride: Design, In Vitro Characterization and In Vivo Estimation of the Ocular Irritation and Drug Pharmacokinetics in the Aqueous Humor of Rabbits. *International Journal of Pharmaceutics* 443, 293-305.
- Taylor, G. I., 1934. The Formation of Emulsions in Definable Fields of Flow. *Proceeding of the Royal Society* A146, 501.
- Taylor, P., 1998. Ostwald Ripening in Emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 75, 107-185.
- Tcholakova, S., Denkov, N. D., Ivanov, I. B., Campbell, B., 2006. Coalescence Stability of Emulsions Containing Globular Milk Proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123-126, 259-293.
- Thakur, N., Garg, G., Sharma, P. K., Kumar, N., 2012. Nanoemulsions: A Review on Various Pharmaceutical Application. *Global Journal of Pharmacology* 6(3), 222-225.
- Tiwari, S. B., Shenoy, D. B., Amiji, M. M., 2006. Nanoemulsion Formulations for Improved Oral Delivery of Poorly Soluble Drugs. *NSTI-Nanotech* 2006, 1, 475-478.

- Tscharnuter, W., 2000. Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing. In: Meyers, R. A., Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation 7, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 5469-5485.
- Tubasha, Z., Bakar, Z. A., Ismail, M., 2013. Characterization and Stability Evaluation of Thymoquinone Nanoemulsions Prepared by High-pressure Homogenization. *Journal of Nanomaterials* 2013, Article 126.
- Uluata, S., McClements, D. J., Decker, E. A., 2015. Physical Stability, Autoxidation, and Photosensitized Oxidation of ω -3 Oils in Nanoemulsions Prepared with Natural and Synthetic Surfactants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 9333-9340.
- Vyas, T. K., Shahiwala, A., Amiji, M. M., 2008. Improved Oral Bioavailability and Brain Transport of Saquinavir Upon Administration in Novel Nanoemulsion Formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 347(1-2), 93-101.
- Wagner, C., 1961. Theorie der Alterung von Niederschlägen Durch Umlösen (Ostwald-reifung). *Zeitschrift Fur Elektrochemie* 65(7-8), 581-591.
- Walker, R. M., Decker, E. A., McClements, D. J., 2015. Physical and Oxidative Stability of Fish Oil Nanoemulsions Produced by Spontaneous Emulsification: Effect of Surfactant Concentration and Particle Size. *Journal of Food Engineering* 164, 10-2.
- Walstra, P., 2003. *Physical Chemistry of Foods*. Marcel Dekker, New York, USA.
- Walstra, P., Jenness, R., 1984. *Dairy Chemistry and Physics*. John Wiley and Sons, New York.
- Wang, Y.-H., Wan, Z.-L., Yang, X.-Q., Wang, J.-M., Guo, J., Lin, Y., 2016. Colloidal Complexation of Zein Hydrolysate with Tannic Acid: Constructing Peptides-based Nanoemulsions for Alga Oil Delivery. *Food Hydrocolloids* 54, 40-48.
- Wong, J., 2015. *Nanotherapeutics in: Escoffier L., Ganau, M., Wong J., Nanotherapeutics in Commercializing Nanomedicine: Industrial applications, patents, and ethics*. Pan Stanford Publishing, Singapore.
- Wretling, A., 1964. The Pharmacological Basis for the Use of Fat Emulsions in Intravenous Nutrition. *Acta Chirurgica Scandinavica* 325, Suppl. 325-325:31+.
- Wulff-Pérez, M., Torcello Gómez, A., Gálvez Ruíz, M. J., Martín-Rodríguez, A., 2009. Stability of Emulsions for Parenteral Feeding: Preparation and Characterization of o/w Nanoemulsions with Natural Oils and Pluronic f68 as Surfactant. *Food Hydrocolloids* 23, 1096-1102.
- Yadav, S., Gandham, S. K., Panicucci, R., Amiji, M. M., 2016. Intranasal Brain Delivery of Cationic Nanoemulsion-encapsulated TNF α siRNA in prevention of Experimental Neuroinflammation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 12(4), 987-1002.
- Ye, A., Zhu X., Singh H., 2013. Oil-in-water Emulsion System Stabilized by Protein-coated Nanoemulsion Droplets. *Langmuir* 29, 14403-14410.
- Yilmaz, E., Borchert, H.-H., 2005. Design of a Phytosphingosine-containing, Positively-charged Nanoemulsion as a Colloidal Carrier System for Dermal Application of Ceramides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60, 91-98.

- Yin, B., Deng, W., Xu, K., Huang, L., Yao, P., 2012. Stable Nano-sized Emulsions Produced from Soy Protein and Soy Polysaccharide Complexes. *Journal of Colloid and Interface Science* 380, 51-59.
- Yoshida, Y., Niki, E., 1992. Oxidation of Methyl Linoleate in Aqueous Dispersions Induced by Copper and Iron. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 295, 107-114.
- Zambrano-Zaragoza, M. L., Gutiérrez-Cortez, E., Real, A. D., González-Reza, R. M., Galindo-Pérez, M. J., Quintanar-Guerrero, D., 2014. Fresh-cut Red Delicious Apples Coating Using Tocopherol/Mucilage Nanoemulsion: Effect of Coating on Polyphenol Oxidase and Pectin Methyltransferase Activities. *Food Research International* 62, 974-983.
- Zeeb, B., Herz, E., McClements, D. J., Weiss, J., 2014. Impact of Alcohols on the Formation and Stability of Protein-stabilized Nanoemulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 433, 196-203.
- Zhai, J. M., Day L., Aguilar, M. I., Wooster, T. J., 2013. Protein Folding at Emulsion Oil/water Interfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 18, 257-271.
- Zhai, J., Hoffmann, S. V., Day, L., Lee, T. H., Augustin, M. A., Aguilar, M. I., Wooster, T. J., 2012. Conformational Changes of α -Lactalbumin Adsorbed at Oil-water Interfaces: Interplay Between Protein Structure and Emulsion Stability. *Langmuir* 28, 2357-2367.
- Zhang, J., Bing, L., Reineccius, G. A., 2015. Formation, Optical Property and Stability of Orange Oil Nanoemulsions Stabilized by Quillaja Saponins. *LWT - Food Science and Technology* 64, 1063-1070.
- Zhang, J., Bing, L., Reineccius, G. A., 2016. Comparison of Modified Starch and Quillaja Saponins in the Formation and Stabilization of Flavor Nanoemulsions. *Food Chemistry* 192, 53-59.
- Zhu, L., Li, M., Dong, J., Jin, Y., 2015. Dimethyl Silicone Dry Nanoemulsion Inhalations: Formulation Study and Anti-Acute Lung Injury Effect. *International Journal of Pharmaceutics* 491, 292-298.

CHAPITRE II

Nanoémulsions stabilisées par la β -lactoglobuline : effet des paramètres de formulation et de procédé sur la taille des gouttelettes et sur la stabilité des nanoémulsions

Introduction - résumé

L'objectif de ce Chapitre est d'étudier la faisabilité de la stabilisation des NEs par une protéine laitière qui est la β -lg. La formulation des NEs a été réalisée en deux étapes. Dans un premier temps, des émulsions primaires ont été préparées à l'aide d'un mélangeur haute vitesse. Ensuite, les NEs finales ont été obtenues après un nombre de cycles variable dans un homogénéisateur à HP. Nous nous sommes attachés dans ce Chapitre à comprendre l'effet de la composition des deux phases (concentration en protéine, nature et fraction volumique de l'huile) et les paramètres du procédé (pression, nombre de cycles d'homogénéisation) sur la taille des gouttelettes des NEs et sur leur stabilité. Ainsi, trois huiles différentes ont été retenues pour cette étude en tant que phase huileuse (le Miglyol 812, l'huile d'amande douce raffinée et l'huile de germe de blé raffinée). Les NEs obtenues ont été caractérisées par la mesure de la taille et du potentiel Zêta des gouttelettes et de leur comportement rhéologique. La stabilité de ces NEs a été étudiée en temps réel par observation de leur apparence et par le suivi de l'évolution de la taille, du potentiel Zêta et du comportement rhéologique. D'autre part, les propriétés physico-chimiques des deux phases ont également été déterminées, à savoir, la densité, la viscosité, la tension de surface et la tension interfaciale. La viscosité de la phase huileuse a un effet prépondérant sur la taille des gouttelettes par rapport à la tension interfaciale. En effet, la taille des gouttelettes la plus petite a été obtenue avec l'huile ayant la viscosité la plus faible (Miglyol 812) bien que

la tension interfaciale de la phase aqueuse avec cette huile soit la plus élevée. Une pression appliquée de 100 MPa et quatre cycles dans l'homogénéisateur à HP sont les conditions optimales pour obtenir des NEs avec des tailles de gouttelettes d'environ de 200 nm et qui ont été les plus stables sur au moins un mois. En effet, les valeurs de pression plus élevées (200 et 300 MPa) ont conduit à des gouttelettes plus grosses et un potentiel Zêta plus faible en valeur absolue. Une concentration minimale de 1 m/m% de β -lg est requise pour recouvrir la surface des gouttelettes huileuse et permettre leur stabilisation, pour une fraction massique de la phase huileuse de 5 m/m%. En effet, à concentration fixe en β -lg, l'augmentation de la fraction massique de l'huile a donné lieu à une augmentation de la taille des gouttelettes car la quantité de protéine dans la phase aqueuse est insuffisante par rapport à la quantité d'huile. De plus, ces formulations ont montré une déstabilisation par coalescence au cours du temps.

Nous avons procédé à une étude de l'effet de l'HPH dans des conditions extrêmes (300 MPa, 5 cycles) sur l'activité interfaciale de la β -lg. La tension interfaciale et la rhéologie interfaciale de la protéine ne semblent pas être modifiées par ce traitement. La réduction de la capacité émulsionnante n'a donc pas pu être expliquée à l'issue de ce premier travail. L'effet du traitement par l'HPH sur la structure de la β -lg et sur son activité interfaciale requière donc des études complémentaires qui sont abordées au Chapitre III.

Les résultats principaux de ce travail ont été publiés dans *International Journal of Pharmaceutics* :

Ali, A., Mekhloufi, G*, Huang, N., Agnely, F., 2016. Volume 500, 291-304.

Des résultats supplémentaires mentionnés et non publiés dans cette publication sont présentés en annexes I et II (effet de la composition et des conditions de procédé sur le potentiel Zêta et la viscosité des NEs et la mesure de la protéine libre).

PUBLICATION 1

β -Lactoglobulin stabilized nanemulsions - Formulation and process factors affecting droplet size and nanoemulsion stability

Ali ALI¹, Ghozlene MEKHLOUFI¹, Nicolas HUANG¹, Florence AGNELY¹

¹ Institut Galien Paris-Sud, UMR 8612, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay,
Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296, Châtenay-Malabry Cedex, France

CHAPITRE III

Effet de l'homogénéisation à haute pression sur la structure, les propriétés interfaciales et les propriétés émulsionnantes de la β -lactoglobuline

Introduction – résumé

Lors de l'optimisation du procédé de la formulation des NEs stabilisées par la β -lg et préparées au moyen de l'HPH, nous avons constaté que la formulation optimale a été obtenue avec une valeur de pression proportionnellement modérée (100 MPa). Avec des valeurs de pression plus élevées (200 et 300 MPa), des gouttelettes plus grosses et des NEs moins stables au cours du temps ont été obtenues. Une des hypothèses proposées pour expliquer la réduction du pouvoir émulsionnant des protéines lors de l'HPH est la dénaturation des protéines sous l'effet de ce traitement (Bader et *al.*, 2011; Lee et *al.*, 2009; Yuan et *al.*, 2012). L'objectif de ce Chapitre est donc d'étudier l'effet du traitement dans l'homogénéisateur à HP sur la structure de la β -lg, ses propriétés interfaciales et sur son efficacité émulsionnante. La β -lg est une petite protéine globulaire qui appartenant à la famille des lipocalines et sa structure est bien connue comme nous l'avons déjà vu dans le Chapitre I. Dans la Partie A de ce Chapitre, nous avons étudié l'effet du traitement à l'homogénéisateur à HP sur les différents niveaux de structure de la β -lg par une combinaison de techniques spectroscopiques, chromatographiques et électrophorétiques. La chromatographie liquide haute performance en phase inverse a été utilisée dans un premier temps pour vérifier la composition et la pureté du lot de β -lg utilisée. Le dichroïsme circulaire, qui est une technique spectroscopique simple à appliquer, a permis d'évaluer à la fois la structure secondaire (dans l'UV lointain) et la structure tertiaire (dans l'UV proche). La chromatographie d'exclusion stérique et l'électrophorèse sur gel de poly(acrylamide) en présence de dodécylsulfate de sodium ont

permis d'étudier la structure quaternaire de la β -lg, c'est-à-dire, son état d'agrégation et la nature des interactions intermoléculaires impliquées dans ces agrégats. Une étude des propriétés interfaciales a été également menée à l'aide d'un tensiomètre dynamique à goutte. Les modifications de structure et des propriétés interfaciales de la β -lg lors du traitement à l'homogénéisateur à HP dans les conditions optimales trouvées lors de la formulation des NEs (100 MPa/4 cycles) et aussi dans des conditions de traitement sévère (300 MPa/5 cycles), où la protéine avait montré une réduction d'efficacité émulsionnante, ont été quantifiées et comparées avec la protéine dans son état initial, et aussi avec la protéine largement dénaturée par la chaleur. Cette étude a été menée sur des solutions aqueuses de la β -lg à 1 m/m% et non sur la nanoémulsion en raison de la présence de phase huileuse et de la dénaturation de la protéine due à son adsorption à l'interface O/W dans le cas d'une nanoémulsion.

Les résultats de ce travail montrent que la β -lg, sous l'effet de l'HPH dans les conditions optimales, a conservé ses structures secondaire, tertiaire et quaternaire et qu'elle a montré une activité interfaciale identique à celle de la protéine avant ce traitement. Cependant, le traitement à 300 MPa/5 cycles a conduit à des changements significatifs sur la structure de la protéine, à savoir : une transformation des éléments de structure secondaire en structures désordonnées, une large perte de la structure tertiaire et l'ouverture du cœur hydrophobe de la protéine, ainsi qu'une agrégation importante par des liaisons disulfure intermoléculaires. En conséquence de ces changements structurels, la β -lg dénaturée par l'HPH a présenté une hydrophobie de surface accrue et une cinétique d'adsorption à l'interface O/W accélérée. L'adsorption rapide de la β -lg dénaturée a permis une formation plus précoce d'un film élastique à l'interface par rapport à la protéine non traitée. Les modifications de structure induites par l'HPH apparaissent comparables à celles observées par la dénaturation par chaleur selon les techniques utilisées dans cette étude.

Les principaux résultats de la Partie A de ce Chapitre sont présentés sous forme d'une publication à soumettre dans une revue internationale. Les co-auteurs sont :

Ali Ali, Isabelle Le Potier, Nicolas Huang, Véronique Rosilio, Monique Cheron, Vincent Faivre, Isabelle Turbica, Florence Agnely, Ghazlene Mekhloufi.

L'objectif de la Partie B de ce Chapitre est d'étudier l'effet des traitements discutés précédemment sur les propriétés émulsionnantes de cette protéine et de mettre en évidence

la relation entre les changements de structure et des propriétés interfaciales avec l'efficacité émulsionnante.

Au cours de ce travail, quatre types de solutions de protéine ayant subi des traitements différents ont été préparées et utilisées en tant que phase aqueuse pour préparer des NEs dans les conditions optimales de formulation (5 m/m% du Miglyol 812 en tant que phase huileuse, 4 cycles d'homogénéisation à 100 MPa). Les quatre solutions aqueuses sont : la β -lg homogénéisée à 100 MPa/4 cycles, la β -lg homogénéisée à 300 MPa/5 cycles, la β -lg non homogénéisée et la β -lg dénaturée par la chaleur (à 85° C pendant 30 min). Une cinquième nanoémulsion a été formulée avec une solution de β -lg non traitée (non homogénéisée et non dénaturée par la chaleur) en appliquant une pression de 300 MPa avec 5 passages dans l'homogénéisateur à HP. Les NEs obtenues ont été caractérisées par la mesure de la taille et de la charge des gouttelettes. La stabilité de ces NEs au cours du temps a été évaluée par le suivi de la taille et du potentiel Zêta des gouttelettes et par la technique de balayage optique (Turbiscan®).

Les résultats obtenus montrent que l'homogénéisation préalable de la β -lg à la pression de 100 MPa/4 cycles ne modifie pas l'efficacité émulsionnante de la β -lg. Les NEs obtenues ont eu les mêmes valeurs de taille et de potentiel Zêta des gouttelettes et montré la même stabilité physique sur 30 jours de stockage que les NEs préparées avec des solutions de β -lg non traitées. A l'instar de la dénaturation par la chaleur, le traitement à 300 MPa/5 cycles donne lieu à des NEs ayant la même taille de gouttelettes mais avec un potentiel Zêta plus faible et une stabilité moindre. Cependant, ces dernières NEs ont été plus stables que celles préparées à 300 MPa/5 cycles à partir des solutions de protéine non traitées en raison de la différence de taille de gouttelettes.

Références

Bader, S., Bez, J., Eisner, P., 2011. Can Protein Functionalities be Enhanced by High-Pressure Homogenization? – A Study on Functional Properties of Lupin Proteins. *Procedia Food Science* 1, 1359-1366.

- Lee, S.H., Lefèvre, T., Subirade, M., Paquin, P., 2009. Effects of Ultra-High Pressure Homogenization on the Properties and Structure of Interfacial Protein Layer in Whey Protein-Stabilized Emulsion. *Food Chemistry* 113, 191-195.
- Yuan, B., Ren, J., Zhao, M., Luo, D., Gu, L., 2012. Effects of Limited Enzymatic Hydrolysis with Pepsin and High-Pressure Homogenization on the Functional Properties of Soybean Protein Isolate. *LWT- Food Science and Technology* 46, 453-459.

PARTIE A

Projet de publication :

Effect of high pressure homogenization on the structure and the interfacial properties of β -lactoglobulin

Ali Ali,[†] Isabelle Le Potier,[†] Nicolas Huang,[†] Véronique Rosilio,[†] Monique Cheron,[‡]

Vincent Faivre,[†] Isabelle Turbica,[§] Florence Agnely,^{†,¶} Ghazlene Mekhloufi,^{†,¶}

[†]Institut Galien Paris-Sud, UMR 8612, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296, Châtenay-Malabry Cedex, France

[‡]Pierre et Marie Curie University, Laboratoire Jean Perrin, Paris, France

[§]INSERM, UMR-S 996, Cytokines, Chemokines and Immunopathology, Châtenay-Malabry, France.

[¶]Equal contribution

PARTIE B

Effect of high pressure homogenization on the emulsifying properties of β -lactoglobulin

1 Introduction

The HPH is widely used in the pharmaceutical, chemical, biotechnological, and food industries for many purposes such as the fabrication of fine and homogeneous emulsions (Floury et al., 2000), the disruption of milk lipid globules (Zamora et al., 2012), the microbial inactivation (Donsì et al., 2006, 2009; Georget et al., 2014), and the reduction of the particle size of solids (Kluge et al., 2012; Kaialy and Al Shafiee, 2016).

Over the past decade there has been a growing interest in the effect of the structural modifications of proteins induced by HPH on their functionality. The effects of HPH were studied on proteins in milk in order to evaluate the alteration in its enzymatic activities (Datta et al., 2005) or to improve its coagulation properties (Zamora et al., 2012). The effect of this treatment was also studied on milk caseins (Sørensen et al., 2014,) and whey proteins (Sørensen et al., 2015) to improve the structure of food ingredients. The applicative properties of whey proteins such as their viscosity and colour were found to be altered by high pressure values during the homogenization (Grácia-Juliá et al., 2008). Protein unfolding induced by HPH was found to improve its susceptibility to tryptic hydrolysis and consequently its digestibility such as in the case of whey proteins (Blayo et al., 2016) and soybean proteins (Toro-funes et al., 2014, 2015). The mechanical properties of soybean proteins, which are important to formulate edible films, were also found to be enhanced by the HPH treatment (Song et al., 2013). The decrease in the viscosity of egg white proteins by treatment with HPH could allow fractionation processes such as filtration (Brand et al., 2014). Protein aggregation induced by HPH was also useful to reduce the immunoreactivity of egg white proteins (Panozzo et al., 2014).

However, the effect of HPH on emulsifying and foam efficiencies of proteins has only been barely studied. The exposure of the buried hydrophobic groups of whey proteins was found to enhance the visco-elasticity of air/water interfaces and thus improve foam stability (Bouaouina et al., 2006). HPH could enhance the interaction between protein molecules and consequently improve their emulsifying efficiency such as in the case of soybean protein (Yuan et al., 2012) and lupin protein (Bader et al., 2011).

In Chapter II, we found that NEs stabilized with β -lg prepared by HPH at 300 MPa/5 cycles displayed the highest droplet size and were thus less stable than the ones prepared at 100 MPa/4 cycles. In Part A of the present Chapter, we studied the effect of this process on the structure of β -lg. We demonstrated that the HPH at 300 MPa/5 cycles applied on a β -lg solution before emulsification induced protein unfolding, protein aggregation by intermolecular disulphide bridges, and an improvement in its interfacial properties. These effects were similar to a heat denaturation treatment at 85° C during 30 min. Nevertheless, at 100 MPa/4 cycles the protein structure and its interfacial properties were not modified. The current work aimed to supplement the previous study by evaluating the effect of HPH treatment in different conditions on the emulsifying properties of this protein regarding to the size and the ζ -potential of droplets and the physical stability of the resulting NEs.

2 Materials and methods

2.1 Materials

We used the same materials as the ones described in Part A.

2.2 Preparation of the nanoemulsions

β -lg solutions at concentration of 1 wt% in 10 mM potassium phosphate buffer solution (PBS, pH 7.0) were prepared by the method previously described in Chapter II. The

solutions were then divided into four aliquots and treated differently to obtain (Figure 1): homogenized β -lg at 100 MPa for 4 cycles, homogenized β -lg at 300 MPa for 5 cycles, heat-denatured β -lg at 85° C for 30 min, and non-treated β -lg. Then NEs were prepared with those different β -lg solutions as the aqueous phase using the optimal conditions of formulation determined in Chapter II (5 w/w% Miglyol 812 as the oily phase and 100 MPa of homogenization pressure for 4 cycles) (Figure 1). A fifth nanoemulsion was prepared with 300 MPa of homogenization pressure and 5 cycles using non-treated β -lg solution as aqueous phase (non-homogenized and non-heated). Each formulation was prepared in triplicate. Methods and apparatus used for the treatment of the β -lg solutions and for the preparation of the NEs were the same as the ones described in Chapter II and Chapter III.

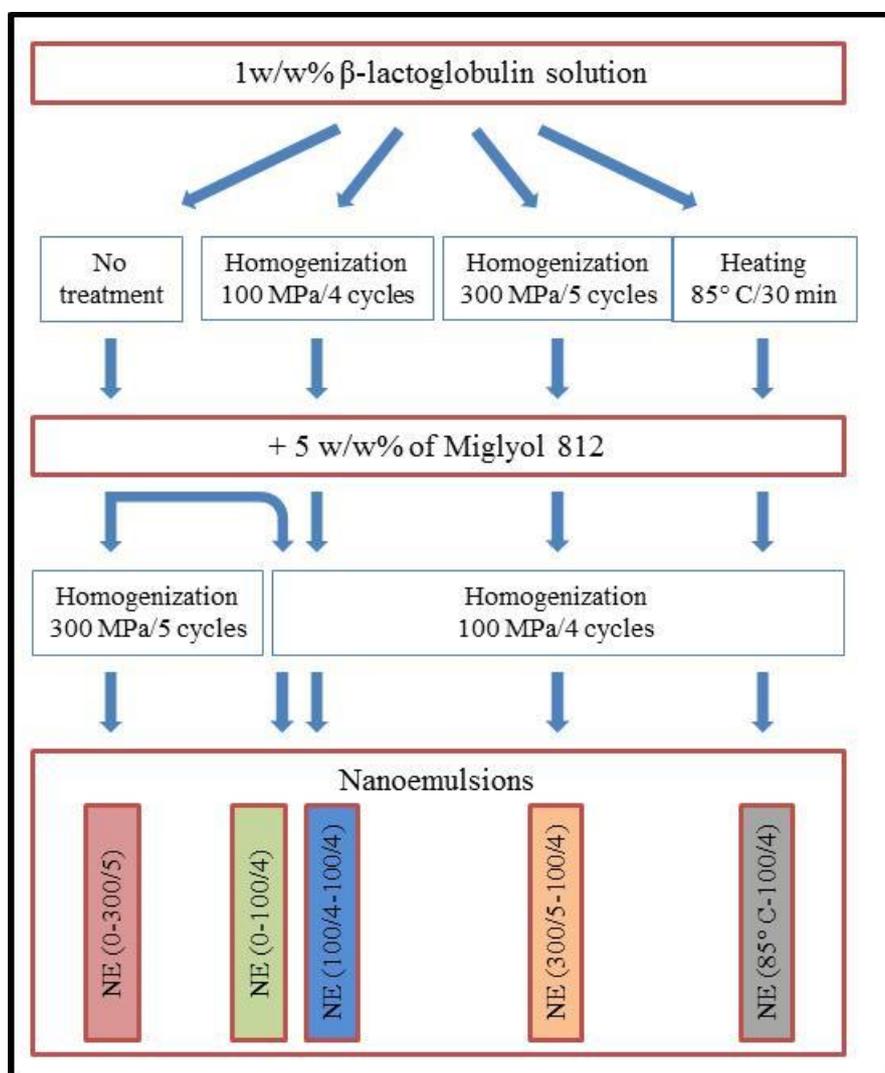


Figure 1: Conditions of the different treatments of the 1 w/w% β -lactoglobulin solutions and of the nanoemulsion preparation.

2.3 Nanoemulsion characterization and physical stability study

The mean droplet size (Z-average diameter), size distribution, polydispersity index (PDI), and ζ -potential of NEs were measured using a Nanosizer instrument (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, Malvern, U.K.) as described previously (Chapter II).

The stability of NEs was assessed at 25°C by visual observation and by measurements of droplet size and ζ -potential over time at days 3, 7, 15, and 30. Additionally, nanoemulsion stability was studied at the same time intervals by optical scanning analyzer (Turbiscan[®] classic MA2000, Formulaction SA, France).

3 Results and discussion

All NE formulations had a milky colour and texture, and there was no visual difference between these formulations. Figures 2 and 3 show the mean droplet diameter and the size distribution of the different formulations, respectively, at day 0. The reference formulation NE (0-100/4) had a droplet size of 201 ± 7 nm with a narrow droplet size distribution (PDI = 0.133 ± 0.062), while the formulation NE (0-300/5) prepared at 300 MPa/5 cycles had a higher droplet size (265 ± 20 nm) with a bimodal distribution (PDI = 0.283 ± 0.014).

All NE formulations prepared at 100 MPa/4 cycles with previously treated β -lg solutions showed similar mean droplet diameters to that of NE formulation prepared at 100 MPa/4 cycles with untreated β -lg solution. The last formulations (NE (100/4-100/4); NE (300/5-100/4); NE (85° C-100/4)) showed an unimodal distribution slightly larger than that of the reference formulation NE (0-100/4) as seen in Figure 3.

The protein denaturation by homogenization or heating, when performed before the nanoemulsion preparation, had no significant effect during the emulsifying process.

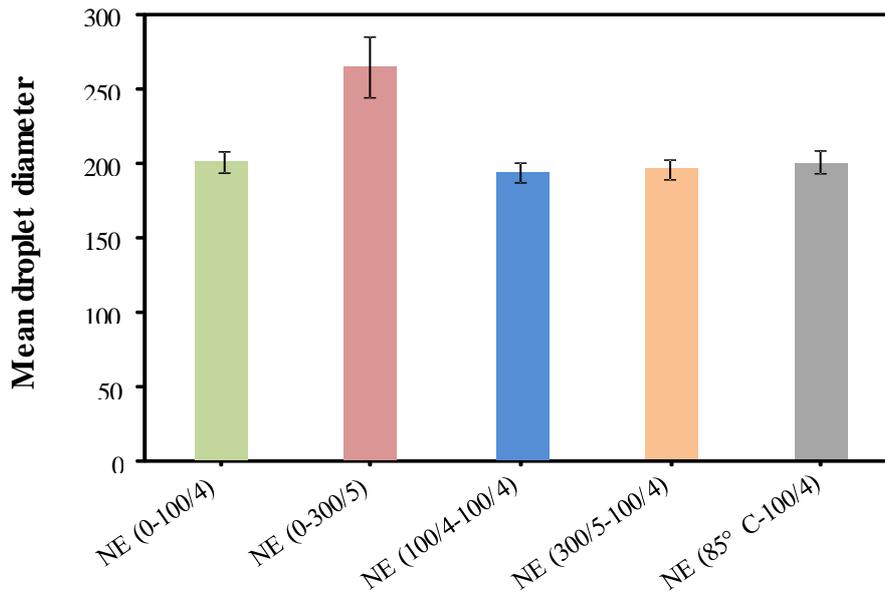


Figure 2: Mean droplet diameter of different NE formulations at day 0: NE (0-100/4) (NE prepared at 100 MPa/4 cycles with untreated β -lg solution), NE (0-300/5) (NE prepared at 300 MPa/5 cycles with untreated β -lg solution), NE (100/4-100/4) (NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 100 MPa/4 cycles homogenized β -lg solution), NE (300/5-100/4) (NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 300 MPa/5 cycles homogenized β -lg solution), and NE (85° C-100/4) (NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 85° C/30 min heat-treated β -lg solution). Results are expressed as mean \pm standard deviation.

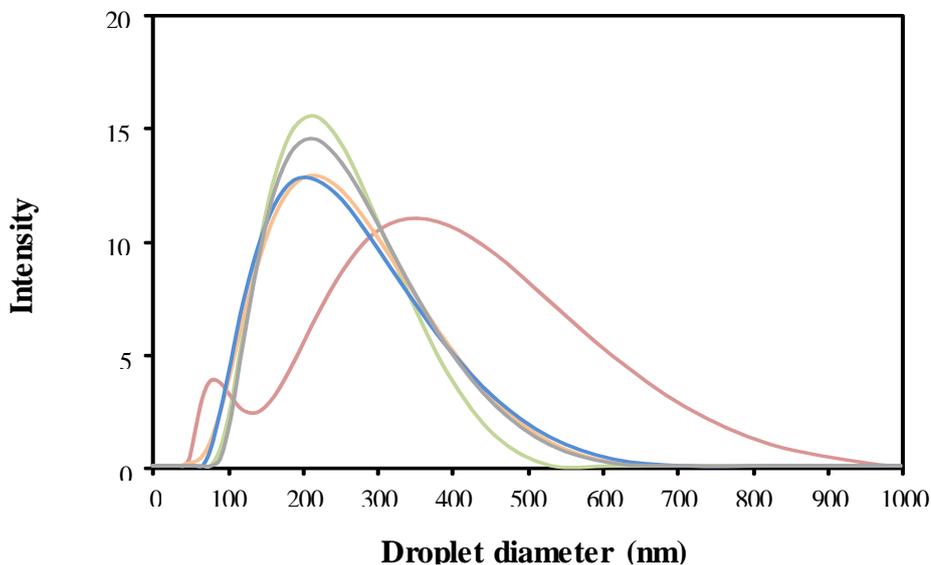


Figure 3: Droplet diameter distribution of different NE formulations at day 0: NE (0-100/4): NE prepared at 100 MPa/4 cycles with untreated β -lg solution (green), NE (0-300/5): NE prepared at 300 MPa/5 cycles with untreated β -lg solution (red), NE (100/4-100/4): NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 100 MPa/4 cycles homogenized β -lg solution (blue), NE (300/5-100/4): NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 300 MPa/5 cycles homogenized β -lg solution (orange), and NE (85° C-100/4): NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 85° C/30 min heat-treated β -lg solution (grey).

On the other hand, the higher droplet size obtained when emulsification was performed at 300 MPa/5 cycles (NE (0-300/5)) could not be attributed only to the over-processing phenomenon as the droplet size did not remain constant but increased from 1 to 5 cycles (Chapter II). The higher droplet size of the formulation NE (0-300/5) could be explained by the re-coalescence of droplets during homogenization.

Indeed, the highly turbulent flow under the high pressure conditions could be sufficient to induce strong collisions between previously formed droplets and, consequently, induce their re-coalescence. In this case, protein denaturation might not be involved in the droplet growth mechanism. Another explanation can be also proposed. The protein denaturation during the emulsification could induce inter-droplets disulfide bridges between the β -lg molecules adsorbed onto the surface of different droplets. These intermolecular disulfide bridges could not be formed between droplets when protein denaturation was performed before emulsification as the bridges would already be formed between free β -lg molecules in solution. This would explain why no size increase was observed when the denaturing treatment (300 MPa/5 cycles) was applied before the nano-emulsification process (at 100 MPa/4 cycles).

Figure 4 displays the ζ -potential of the different NE formulations at day 0. When β -lg solutions did not undergo any treatment, the values of ζ -potential of the formulations NE (0-100/4) and NE (0-300/5) were of -51 ± 2 and -46 ± 1 mV, respectively. For NE (100/4 -100/4) prepared with β -lg solutions homogenized before emulsification at 100 MPa/4 cycles the ζ -potential value was close to the one of the reference formulation, NE (0-100/4). Similarly, when NEs were prepared with homogenized β -lg solutions at 300 MPa for 5 cycles (NE (300/5-100/4)), the values of ζ -potential were similar to that of the formulation NE (0-300/5) prepared at 300 MPa/5 cycles. The formulation NE (85° C-100/4) prepared with the heat-denatured β -lg solution had the smallest absolute value of ζ -potential. It is clear that protein denaturation, in solution or during emulsification, is responsible for ζ -potential changes. The absolute value of ζ -potential decreased in the order 100 MPa/4 cycles > 300 MPa/5 cycles > 85° C/30 min and this decrease could be induced by the protein aggregation (in solution or at the droplet surface).

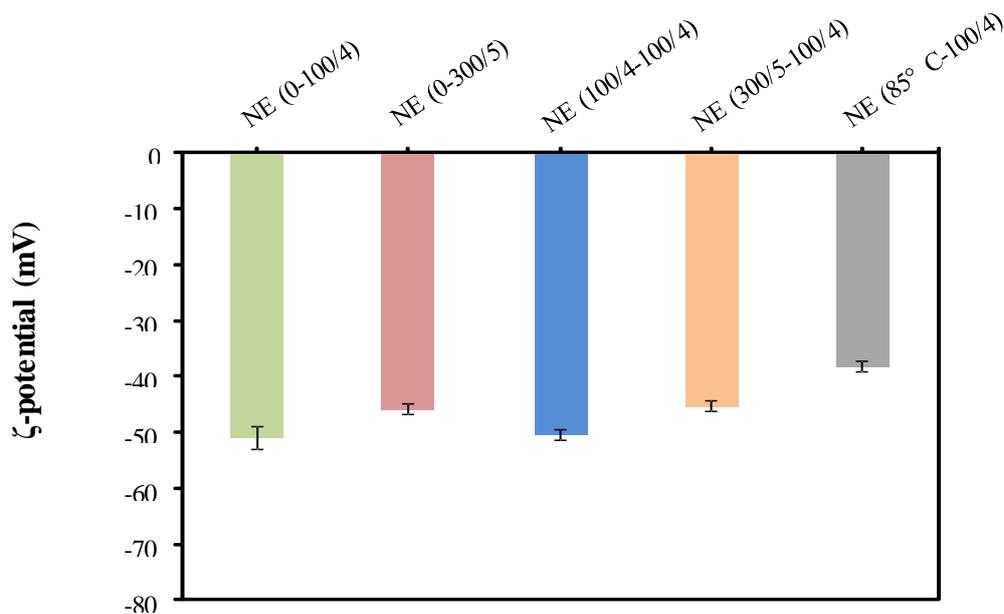


Figure 4: ζ -potential of different NE formulations at day 0: NE (0-100/4) (NE prepared at 100 MPa/4 cycles with untreated β -lg solution), NE (0300/5) (NE prepared at 300 MPa/5 cycles with untreated β -lg solution), NE (100/4-100/4) (NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 100 MPa/4 cycles homogenized β -lg solution), NE (300/5-100/4) (NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 300 MPa/5 cycles homogenized β -lg solution), and NE (85° C-100/4) (NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 85° C/30 min heat-treated β -lg solution). Results are expressed as mean \pm standard deviation.

Figure 5 shows the effect of the storage time on the droplet size of the different formulations. The droplet size was almost unchanged for all formulations during 30 days. All these formulations were prepared with a concentration of β -lg in the aqueous phase at 1 m/m% with 5 m/m% of the oily phase. This ratio of protein/oily phase was found to be sufficient to form the interfacial film that insures the stability of droplets against the irreversible growth phenomena such as coalescence (Chapter II). These results could be explained by the nature of the interfacial film of β -lg. Beside the difference in the adsorption kinetic of protein to the O/W interface and the resulting difference in the interfacial properties during the first hours (Chapter III, Part A), the interfacial film is likely to have the same nature at $t \approx 4$ h for untreated, homogenized, and heat denatured β -lg solution.

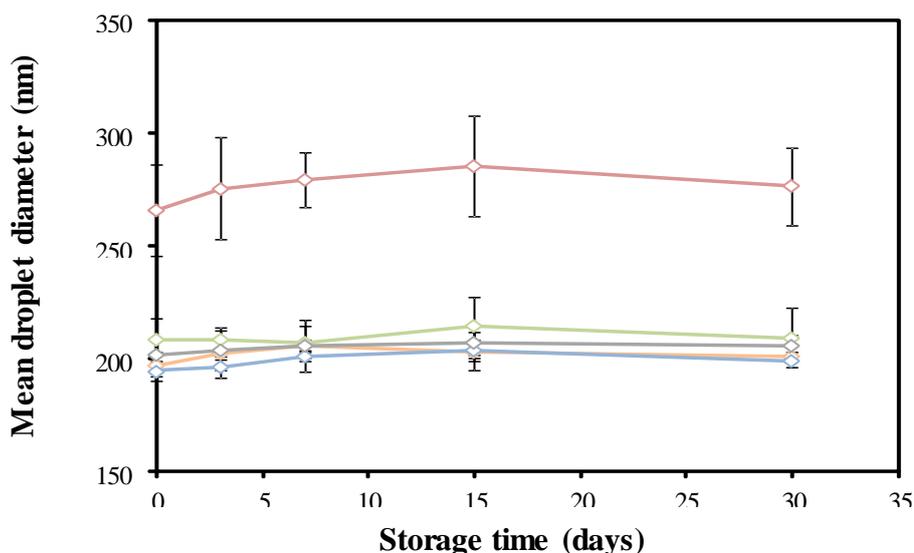


Figure 5: Mean droplet diameter stability of the NE formulations: NE (0-100/4): NE prepared at 100 MPa/4 cycles with untreated β -lg solution (green), NE (0-300/5): NE prepared at 300 MPa/5 cycles with untreated β -lg solution (red), NE (100/4-100/4): NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 100 MPa/4 cycles homogenized β -lg solution (blue), NE (300/5-100/4): NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 300 MPa/5 cycles homogenized β -lg solution (orange), and NE (85° C-100/4): NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 85° C/30 min heat-treated β -lg solution (grey). Results are expressed as mean \pm standard deviation.

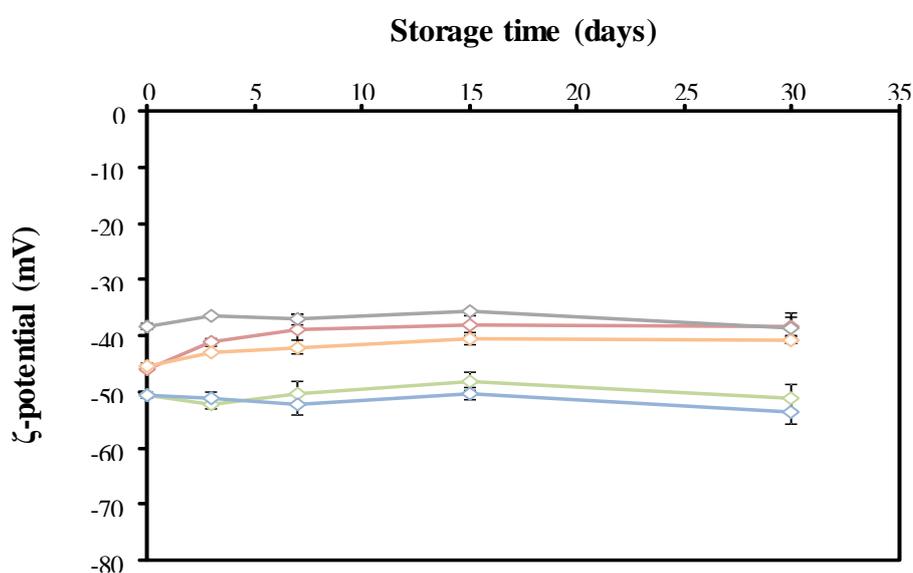


Figure 6: ζ -potential stability of the NE formulations: NE (0-100/4): NE prepared at 100 MPa/4 cycles with untreated β -lg solution (green), NE (0-300/5): NE prepared at 300 MPa/5 cycles with untreated β -lg solution (red), NE (100/4-100/4): NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 100 MPa/4 cycles homogenized β -lg solution (blue), NE (300/5-100/4): NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 300 MPa/5 cycles homogenized β -lg solution (orange), and NE (85° C-100/4): NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 85° C/30 min heat-treated β -lg solution (grey). Results are expressed as mean \pm standard deviation.

Figure 6 shows the effect of storage time on the ζ -potential of the different formulations. The formulations NE (0-100/4), NE (100/4-100/4), and (85° C-100/4) showed unchanged ζ -potential values during the storage period. The formulations that were subjected to a severe homogenization treatment (300 MPa/5 cycles) either on the aqueous phase (NE (300/5-100/4)) or during the NE preparation (NE (0-300/5)), displayed a slight decrease in the absolute value of ζ -potential during the first 7 days of storage, probably due to further protein aggregation during this period. The ζ -potential values then seemed stable and close to the ones of the NE (85° C-100/4).

Macroscopically, all NE formulation appeared stable over 30 days except the NE (0-300/5) which showed a visible creaming between days 15 and 30. Physical stability of the NEs was also evaluated using optical scanning analyzer (Turbiscan®). Figure 7 presents the backscattered intensity as a function of the height of the sample.

All formulations presented variations of the backscattered intensity over time indicating the presence of a destabilization phenomenon in all these formulations. The formulations NE (0-100/4) and NE (100/4-100/4) (Figures 7(A) and 7(C), respectively) showed a similar progressive increase in the backscattered intensity in the top of the sample together with a simultaneous decrease in the backscattered intensity at the bottom while this intensity remained stable in the intermediate region of the sample. These features are characteristic to a creaming phenomenon. The extent of creaming in NE (0-300/5) (Figure 7(B)) was more important and it affected the entire height of the sample. The main reason of the stability reduction in this formulation was clearly attributed to the higher droplet size in accordance with Stokes' law. The formulations NE (300/5-100/4) and NE (85° C-100/4) (Figures 7(D) and 7(E), respectively) showed similar variations in the backscattering intensity. The extent of the creaming present in these formulations seemed to be as an intermediate state between the most stable formulations (NE (0-100/4) and NE (100/4-100/4)) and the least stable one (NE (0-300/5)). Formulations NE (300/5-100/4) and NE (85° C-100/4) also showed a slight uniform increase in backscattering intensity which affected a vast region in the intermediate height of these samples. Such variation is characteristic of an increase in the droplet size. Yet, no growth phenomenon in droplet (coalescence or Ostwald ripening) was detected by the mean droplet size measurement by nanosizer analysis (Figure 5). Thus, the most probable explanation for the backscattering variations is a reversible destabilization mechanism such as the reversible flocculation of droplets.

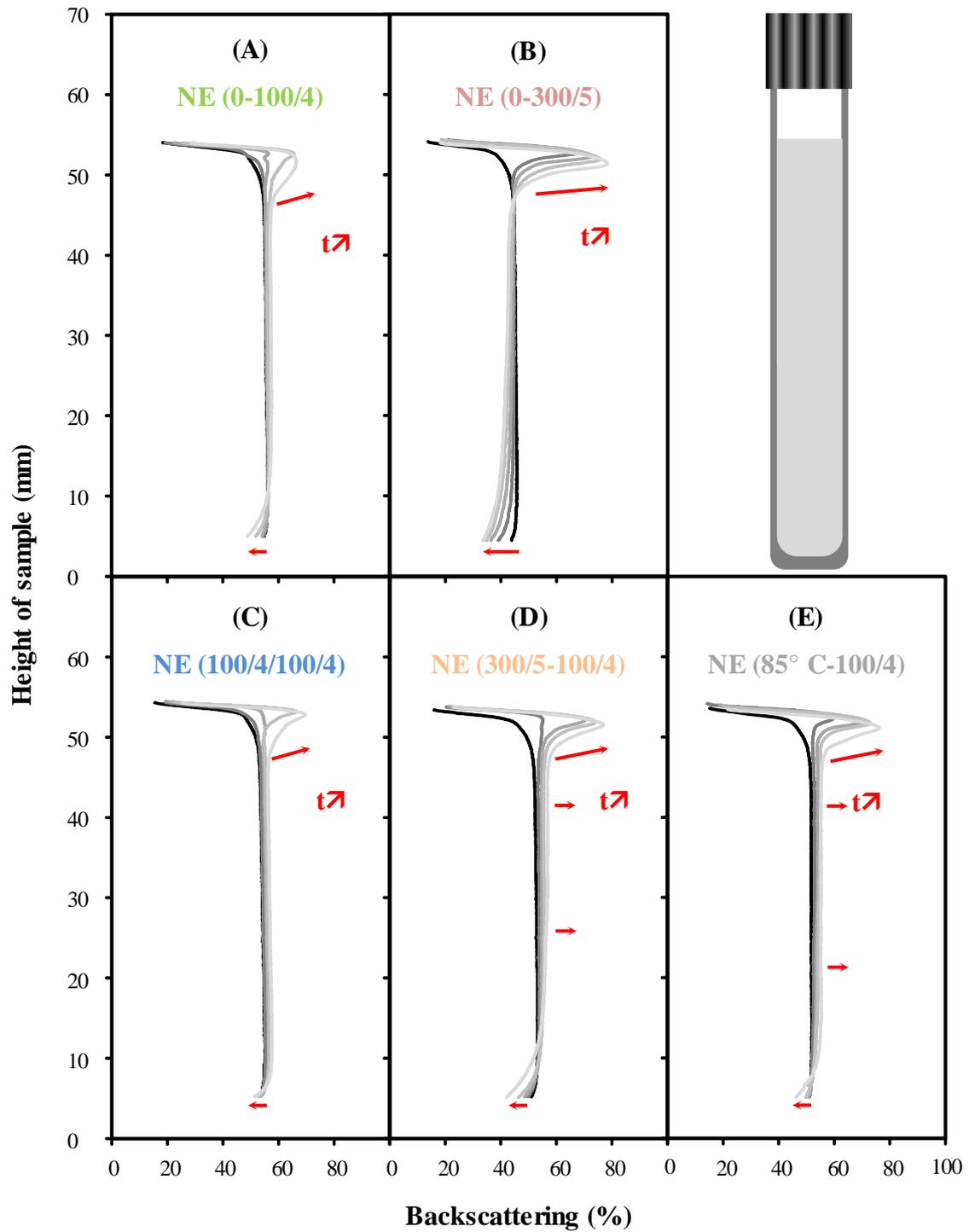


Figure 7: Evolution of backscattering of different NE formulation over time; (—) day 0, (—) day 3, (—) day 7, (—) day 15, (—) day 30; for: (A) NE (0-100/4) (NE prepared at 100 MPa/4 cycles with untreated β -lg solution), (B) NE (0-300/5) (NE prepared at 300 MPa/5 cycles with untreated β -lg solution), (C) NE (100/4-100/4) (NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 100 MPa/4 cycles homogenized β -lg solution), (D) NE (300/5-100/4) (NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 300 MPa/5 cycles homogenized β -lg solution), and (F) NE (85° C-100/4) (NE prepared at 100 MPa/4 cycles with 85° C/30 min heat-treated β -lg solution).

This mechanism could be observed by the size measurement as the samples were 50-fold diluted and redispersed manually before measurements. Flocculation can be induced by depletion because of the presence of free protein aggregates in the aqueous phase (Asakura et Oosawa, 1954 et 1958) or by bridging flocculation induced by non-covalent interactions between droplets and protein aggregates. In both cases, droplet flocculation is enhanced by the reduction in the absolute value of ζ -potential as seen previously. Finally, formulations which were subjected to the same severe treatment during the NE preparation (NE (0-300/5)) or on the aqueous phase (NE (300/5-100/4)) showed a remarkable difference in stability (Figures 7(B) and 7(D), respectively). The extent of the creaming was higher and affected a larger region in NE (0-300/5) compared to NE (300/5-100/4) because of the difference in the droplet size between these formulations (265 ± 20 nm and 196 ± 6 nm, respectively).

4 Conclusion

The objective of this study was to evaluate the effect of a previous HPH of the β -lg solution under different homogenization conditions on the nano-emulsifying efficiency of the protein. β -lg solutions homogenized at 100 MPa/cycles showed a similar nano-emulsifying efficiency to the one of the untreated solution. However, the nano-emulsifying efficiency was reduced when β -lg solutions were homogenized at 300 MPa/5 cycles. Under these conditions of nanoemulsion preparation (300 MPa/5 cycles of homogenization on the aqueous phase), the NEs obtained displayed a similar droplet size but a lower droplet charge and a lower stability compared to the NEs prepared with untreated protein. The reduction in the emulsifying efficiency of the β -lg induced by the HPH (at 300 MPa) appears similar to that induced by heat-denaturation. Overall, no improvement in the emulsifying efficiency of β -lg could be achieved by protein denaturation either by HPH or by heat under the selected conditions. On the contrary, the previous protein denaturation rather alters the emulsifying of β -lg properties compared to the untreated protein.

References

- Asakura, S., Oosawa, F., 1954. On Interaction between Two Bodies Immersed in a Solution of Macromolecules. *The Journal of Chemical Physics* 22(7), 1255-1256.
- Asakura, S., Oosawa, F., 1958. Interaction between Particles Suspended in Solutions of Macromolecules. *Journal of Polymer Science* 33, 183-192.
- Bader, S., Bez, J., Eisner, P., 2011. Can Protein Functionalities Be Enhanced by High-Pressure Homogenization? – A Study on Functional Properties of Lupin Proteins. *Procedia Food Science* 1, 1359-1366.
- Blayo, C., Vidcoq, O., Lazennec, F., Dumay, E., 2016. Effects of High Pressure Processing (Hydrostatic High Pressure and Ultra-High Pressure Homogenization) on Whey Protein Native State and Susceptibility to Tryptic Hydrolysis at Atmospheric Pressure. *Food Research International* 79, 40-53.
- Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C., Legrand, J., 2006. Functional Properties of Whey Proteins as Affected by Dynamic High-Pressure Treatment. *International Dairy Journal* 16, 275-284.
- Brand, J., Pichler, M., Kulozik, U., 2014. Enabling Egg White Protein Fractionation Processes by Pre-Treatment with High-Pressure Homogenization. *Journal of Food Engineering* 132, 48-54.
- Datta, N., Hayes, M. G., Deeth, H. C., Kelly, A. L., 2005. Significance of Frictional Heating for Effects of High Pressure Homogenisation on Milk. *Journal of Dairy Research* 72, 393-399.
- Donsì, F., Ferrari, G., Lenza, E., Maresca, P., 2009. Main Factors Regulating Microbial Inactivation by High-Pressure Homogenization: Operating Parameters and Scale of Operation. *Chemical Engineering Science* 64, 520–532.
- Donsì, F., Ferrari, G., Maresca, P., 2006. High-Pressure Homogenisation for Food Sanitisation. In: *Proceedings of 13th world congress of food science and technology "food is life" Nantes, France, 1811-1822.*
- Floury, J., Desrumaux, A., Lardieres, J., 2000. Effect of High-Pressure Homogenization on Droplet Size distributions and Rheological Properties of Model Oil-in-Water Emulsions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1, 127-134.
- Georget, E., Miller, B., Callanan, M., Heinz, V., Mathys, A., 2014. (Ultra) High Pressure Homogenization for Continuous High Pressure Sterilization of Pumpable Foods - A Review. *Frontiers in Nutrition* 1 (15), 1-6.
- Gràcia Julià, A., René, M., Cortés Muñoz, M., Picart, L., López Pedemonte, T., Chevalier, D., Dumay, E., 2008. Effect of Dynamic High Pressure on Whey Protein Aggregation: A Comparison with the Effect of Continuous Short Time Thermal Treatments. *Food Hydrocolloids* 22, 1014-1032.

- Kaialy, W., Al Shafiee, M., 2016. Recent Advances in the Engineering of Nanosized Active Pharmaceutical Ingredients: Promises and Challenges. *Advances in Colloid and Interface Science* 228, 71-91.
- Kluge, J., Muhrer, G., Mazzotti, M., 2012. High Pressure Homogenization of Pharmaceutical Solids. *The Journal of Supercritical Fluids* 66, 380-388.
- Panozzo, A., Manzocco, L., Calligaris, S., Bartolomeoli, I., Maifreni, M., Lippe, G., Nicoli, M. C., 2014. Effect of High Pressure Homogenisation on Microbial Inactivation, Protein Structure and Functionality of Egg White. *Food Research International* 62, 718-725.
- Song, X., Zhou, C., Fu, F., Chen, Z., Wub, Q., 2013. Effect of High-Pressure Homogenization on Particle Size and Film Properties of Soy Protein Isolate. *Industrial Crops and Products* 43, 538-544
- Sørensen, H., Mortensen, K., Sørland, G. H., Larsen, F. H., Paulsson, M., Ipsen, R., 2015. Dynamic Ultra-High Pressure Homogenisation of Whey Protein depleted Milk Concentrate. *International Dairy Journal* 46, 12-21.
- Sørensen, H., Mortensen, K., Sørland, G. H., Larsen, F. H., Paulssone, M., Ipsen, R., 2014. Dynamic Ultra-High Pressure Homogenisation of Milk Casein Concentrates: Influence of Casein Content. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 26, 143-152.
- Toro-Funes, N., Bosch-Fusté, J., Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, M. T., Vidal-Carou, M. C., 2015. Isoflavone Profile and Protein Quality During Storage of Sterilised Soymilk Treated by Ultra High Pressure Homogenisation. *Food Chemistry* 167, 78-83.
- Toro-Funes, N., Bosch-Fusté, J., Veciana-Nogués, M. T., Vidal-Carou, M. C., 2014. Changes of Isoflavones and Protein Quality in Soymilk Pasteurised by Ultra-High-Pressure Homogenization Throughout Storage. *Food Chemistry* 162, 47-53.
- Yuan, B., Ren, J., Zhao, M., Luo, D., Gu, L., 2012. Effects of Limited Enzymatic Hydrolysis With Pepsin and High-Pressure Homogenization on the Functional Properties of Soybean Protein Isolate. *LWT- Food Science and Technology* 46, 453-459.
- Zamora, A., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A. J., 2012. Changes in the Surface Protein of the Fat Globules During Ultra-High Pressure Homogenization and Conventional Treatments of Milk. *Food Hydrocolloids* 29, 135-143.

CHAPITRE IV

Etude préliminaire en vue de l'encapsulation et de la délivrance cutanée d'une substance active hydrophobe modèle : l'isotrétinoïne

1 Introduction

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de la formulation développée au cours du travail de cette thèse en tant que système de délivrance d'une SA modèle pour une application topique cutanée. La SA sélectionnée pour ce travail est l'isotrétinoïne (acide 13-*Cis*-rétinoïque), un dérivé synthétique de la vitamine A, largement utilisé pour le traitement de l'acné sévère. Il s'agit d'une molécule fortement hydrophobe, pratiquement insoluble dans l'eau. L'isotrétinoïne est également une substance sensible à la lumière et à l'oxydation. L'encapsulation de l'isotrétinoïne dans ce système nanométrique pourrait avoir l'avantage d'augmenter sa solubilité et sa stabilité et d'améliorer sa pénétration à travers la couche cornée de l'épiderme « *stratum corneum* », l'obstacle principal à l'absorption cutanée.

Dans ce Chapitre, sera présenté tout d'abord le contexte bibliographique concernant l'acné et l'isotrétinoïne. Dans cette étude préliminaire, des méthodes de quantification de l'isotrétinoïne ont été développées, à savoir, la spectrophotométrie UV/vis et la chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. La solubilité de l'isotrétinoïne dans les différentes huiles étudiées au Chapitre II a été déterminée. L'effet de l'encapsulation de l'isotrétinoïne sur les NEs et leur stabilité physique au cours du temps a également été étudié par le suivi de la taille et de la charge des gouttelettes et par la technique de balayage optique (Turbiscan[®]).

2 Contexte bibliographique

2.1 L'acné

La molécule sélectionnée pour cette étude d'encapsulation étant utilisée principalement pour le traitement de l'acné, nous rappelons dans cette partie les caractéristiques, les causes et les traitements de cette pathologie cutanée.

L'acné est une maladie inflammatoire multifactorielle affectant l'unité pilo-sébacée de la peau, l'ensemble du follicule pileux et la glande sébacée associée. L'acné constitue un des désordres cutanés les plus communs lors de la puberté. Elle touche principalement les adolescents ($\approx 85\%$), y compris les jeunes adultes et les enfants préadolescents (Knutsen-Larson et *al.*, 2012). Étant donné que l'acné peut persister pendant des années et jusqu'à l'âge adulte et nécessiter des traitements à long terme, il y a une tendance à la classer comme une maladie chronique (Gollnick et *al.*, 2008). L'acné touche essentiellement les parties du corps ayant la plus grande densité d'unités pilo-sébacées, c'est-à-dire le visage, le cou, la poitrine, le haut du dos, et l'arrière-bras (Brown et Shalita, 1998).

L'acné se caractérise par l'éruption de plusieurs types de lésions non inflammatoires (les comédons) ou inflammatoires (les papules, les pustules, les nodules et les kystes). Le comédon est une lésion superficielle résultant de l'accumulation excessive de sécrétions de la glande sébacée, le sébum, en remplissant les pores de la peau. Les comédons peuvent être fermés et donc blancs ou ouverts et noirs en raison de l'oxydation des kératinocytes contenus dans le sébum. Les comédons non traités peuvent évoluer vers des formes inflammatoires dans lesquelles une infection par une bactérie, le *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), est impliquée. La papule est une inflammation non purulente contrairement à la pustule qui est une inflammation cellulaire nécrotique accompagnée d'un liquide purulent visible. Le nodule et le kyste sont les formes évolutives qui suivent la pustule avec progression de l'infection vers le derme et l'hypoderme. Le nodule est généralement dur pendant que le kyste est rempli de liquide et plus mou. Les formes inflammatoires de l'acné peuvent produire des cicatrices cutanées et d'hyperpigmentation qui persistent longtemps après la guérison (Brown et Shalita, 1998).

L'acné est généralement classée par ordre de gravité en trois niveaux : acné légère, moyenne et sévère. La forme légère ou bénigne se manifeste par l'apparition de comédons blancs et noirs limitée au visage avec occasionnellement quelques lésions inflammatoires (acné comédonienne). L'acné moyenne est définie par la présence d'un grand nombre de papules et des pustules sur le visage ou aussi sur le tronc du corps (acné papulo-pustuleuse). La forme sévère est caractérisée par l'évolution vers des nodules sous-cutanés douloureux et des kystes avec une implication vaste du tronc du corps (acné nodulo-kystique) (Dawson et Dellavalle, 2013).

2.1.1 Pathogénicité de l'acné

La pathogénèse de l'acné est le résultat de processus multifactoriels affectant l'unité pilo-sébacée de la peau, l'ensemble du follicule pileux et la glande sébacée associée. Le mécanisme exact de l'acné n'est pas entièrement clarifié. Les hypothèses les plus solides, résumées dans la Figure 1, consistent en la contribution de plusieurs pathogénèses affectant la kératinisation et la prolifération folliculaires, l'effet des hormones, la production de sébum, la colonisation microbienne par *P. acnes*, et la libération de médiateurs inflammatoires. Néanmoins, la séquence de ces pathogénèses, leur importance et leurs effets mutuels ont besoin de plus d'éclaircissement (Kurokawa et al., 2009; Knutsen-Larson et al., 2012; Williams et al., 2012).

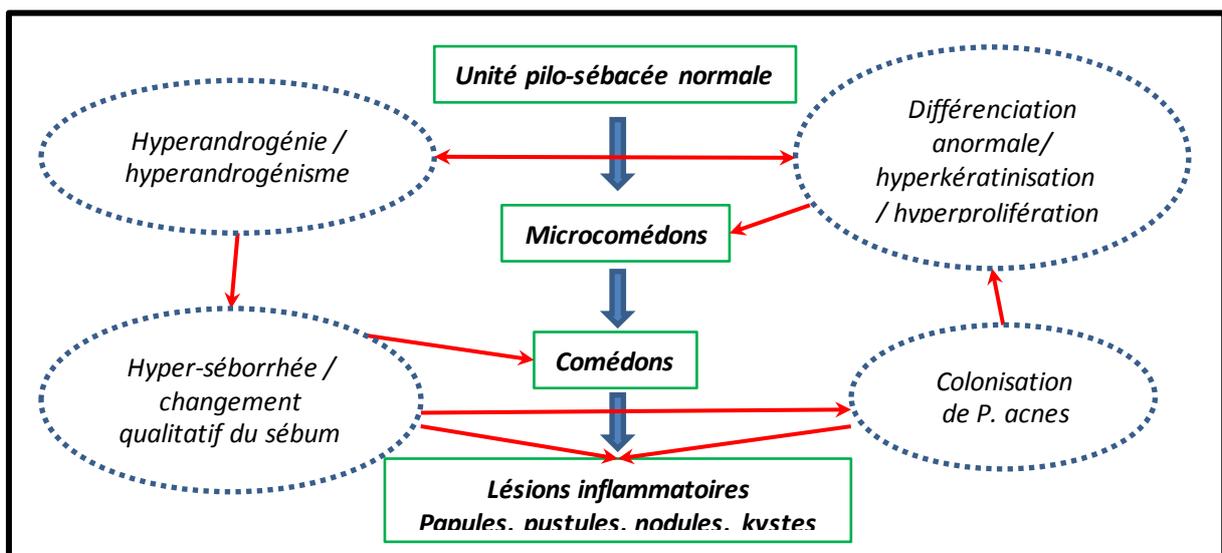


Figure 1 : Schéma représentant l'évolution de l'acné et les pathogénèses supposées.

a) Kératinisation et prolifération folliculaires

Un follicule pileux peut être divisé en 3 régions (Figure 2) : le segment inférieur (le bulbe et le supra bulbe), le segment médian (l'isthme) et le segment supérieur résultant de la fusion de l'orifice folliculaire avec le canal des glandes sébacées et appelé l'infundibulum. L'épithélium de l'infundibulum constitue la continuité de l'épiderme et possède une structure cellulaire similaire à l'épiderme, c'est-à-dire, qu'elle est constituée de kératinocytes riches en kératine et en granules kératohyalines.

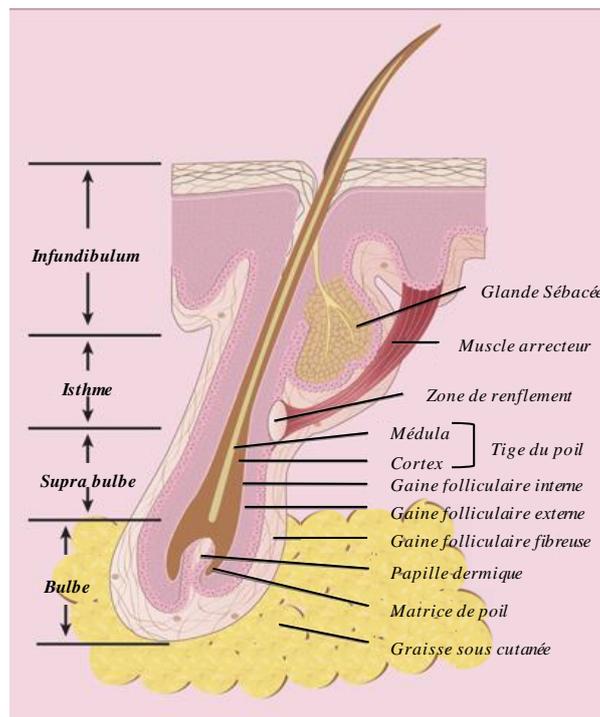


Figure 2 : Schéma d'une unité pilo-sébacée (Goldsmith et *al.*, 2012).

L'un des premiers événements les plus cruciaux dans le développement des lésions d'acné est l'hyperkératinisation des kératinocytes dans la partie de l'infundibulum folliculaire et du canal sébacé au niveau du derme, l'infra-infundibulum, induisant la formation des microcomédons (Kurokawa et *al.*, 2009). Les kératinocytes infra-infundibulaires dans ce cas montrent une augmentation du nombre et de la taille des granules kératohyalines et une accumulation de gouttelettes lipidiques (Knutson, 1974). Au lieu de l'excrétion normale des kératinocytes desquamés à travers l'orifice folliculaire vers l'extérieur, ces cellules demeurent dans le canal folliculaire en formant des bouchons microscopiques hyperkératoses, les microcomédons (Brown et Shalita, 1998). Les microcomédons peuvent également être

formés par la réaction de desquamation des kératinocytes infra-infundibulaires en raison d'une adhérence intracellulaire anormale (Shalita et *al.*, 2011). En outre, une hyperprolifération des kératinocytes infra-infundibulaires contribue à l'obstruction du canal folliculaire (Hughes et *al.*, 1996). L'hyperkératinisation est associée à un défaut dans la différenciation terminale des kératinocytes infra-infundibulaires. Néanmoins, la physiopathologie exacte de la formation des microcomédons, la comédogénèse, reste mal comprise. Des études ont montré une relation avec l'augmentation de l'expression de la filaggrine (filament de protéine d'agrégation) (Kurokawa et *al.*, 1988).

b) Production du sébum

Le sébum est la sécrétion des glandes sébacées de la peau, composé de triglycérides ($\approx 32\%$), d'esters cireux ($\approx 25\%$), de squalène ($\approx 10\%$) d'acides gras libres ($\approx 28\%$, dont 68% sont insaturés), de cholestérol ($\approx 4\%$) et d'oléate de cholestérol ($\approx 2\%$) (Schneider et *al.*, 2016). En association avec les autres lipides provenant des kératinocytes et avec le liquide aqueux extra-cellulaire, il constitue un film hydro-lipidique à l'interface de la peau pour protéger celle-ci de la déshydratation. Le sébum est également impliqué dans la signalisation hormonale spécifique de la peau, la différenciation épidermique, et la protection de la peau contre les rayons ultraviolets. Il apporte des agents antioxydants et antimicrobiens à la surface de la peau (Ro et Dawson, 2005).

La glande sébacée est une glande exocrine annexée à la peau entière à l'exception de la paume des mains et la plante des pieds, constituée de deux types de cellules : les kératinocytes et les sébocytes. Il y a deux types de glandes sébacées : celles qui sont liées aux follicules pileux, en unités pilo-sébacées, et celles qui existent indépendamment. La production du sébum à partir des sébocytes est contrôlée par les hormones androgènes. A la naissance, les glandes sébacées sont sous le contrôle des androgènes maternels. Ensuite, ils diminuent rapidement en taille et la production du sébum se réduit jusqu'au début de la puberté. A ce moment, les glandes sébacées sont, de nouveau, activées par les androgènes circulants (Ro et Dawson, 2005). La production du sébum joue un rôle central dans le développement de l'acné puisque son apparition est couramment associée à la puberté et à la réactivation des glandes sébacées à cet âge (Brown et Shalita, 1998). L'hyperproduction de sébum, l'hyper-séborrhée, est induite par l'augmentation des androgènes, l'hyperandrogénie, ou par l'augmentation de la sensibilité des glandes sébacées au niveau normal des androgènes

circulants en raison de l'exposition accrue des récepteurs d'androgènes (Schmidt *et al.*, 1986). Bien que l'hyper-séborrhée soit l'évènement simultané majeur associé au développement de l'acné et à son aggravation, elle ne constitue pas une condition stricte pour la déclencher (Hughes *et al.*, 1996). Le sébum accumulé dans le follicule sébacé, en association avec la formation des microcomédons, fournit le milieu anaérobie riche en lipides favorable à la croissance de *P. acnes* (Shalita et Lee, 1983).

La composition du sébum constitue également un facteur important dans la pathogénèse de l'acné. Le sébum contient naturellement une concentration importante en acides gras mono- et di-insaturés. Les acides gras insaturés, qui ont un effet sur le développement de l'acné, sont : l'acide sapiénique (C16:1, Δ 6), l'acide sebaléique (C18:2, Δ 5,8) avec un acide gras essentiel, l'acide linoléique (C18:2, Δ 9,12) (Zouboulis *et al.*, 2005). Une des hypothèses proposées pour expliquer l'effet des changements qualitatifs du sébum est basée sur le ratio Δ 6: Δ 9 et son évolution lors de la réactivation des glandes sébacées (Downing *et al.*, 1986; Knaggs, 2007). Lors de la pré-puberté les sébocytes indifférenciés montrent une teneur en enzyme Δ 9 désaturase plus élevée par rapport à l'enzyme Δ 6 désaturase, et donc la teneur en acides Δ 9 (l'acide linoléique) est plus importante que celle des acides Δ 6 (l'acide sapiénique). Pendant la puberté, le sébum montre une teneur plus élevée en acides Δ 6 par rapport aux acides Δ 9 en raison de l'inversion de la teneur en enzymes désaturase Δ 6 et Δ 9 dans les sébocytes différenciées. La carence en acide linoléique (Δ 9), nécessaire à la différenciation cellulaire pour la synthèse des membranes cellulaires, sera compensée par l'autre acide gras di-insaturé, l'acide sebaléique. Cela peut altérer la fonction barrière de ces membranes et induire l'hyperkératinisation infra-infundibulaires.

c) Colonisation folliculaire par *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) et l'inflammation

P. acnes est une bactérie non mobile, anaérobie aérotoleante, à Gram positif en forme de bâtonnets non sporogènes. *P. acnes* constitue une partie du microbiote commensal dans la peau humaine avec des densités élevées dans les parties supérieures du corps (Cogen *et al.*, 2008; Costello *et al.*, 2009; Grice *et al.*, 2009). Cette bactérie est impliquée dans l'acné et ainsi que dans d'autres infections postopératoires invasives des tissus mous, du système cardiovasculaire, ou des arthrites. C'est la raison pour laquelle cette bactérie est parfois considérée comme bactérie commensale, pathogène opportuniste (Achermann *et al.*, 2014). Des recherches sont actuellement menées pour détecter d'éventuelles souches pathogènes,

leur séquence de génome et leur rôle exact dans la pathogénèse de l'acné (Lomholt et Kilian, 2010; Hunyadkürti et al., 2011; Kasimatis et al., 2013; Fitz-Gibbon et al., 2013; Scholz et al., 2016). A titre d'exemple, des différences génétiques qui se trouvent entre les deux souches HL096PA1 et KPA171202 sont les responsables de la virulence de la première souche par rapport à la deuxième (Kasimatis et al., 2013).

Dans la pathogénèse de l'acné, la hyperakéatinisation et l'hyper-séborrhée sont considérées comme les événements initiaux conduisant à la transition de *P. acnes* d'une bactérie commensale à pathogène en rendant le milieu pilo-sébacé anaérobique, riche en lipides et donc favorable à la prolifération de cette bactérie (Kurokawa et al., 2009). *P. acnes* libère des médiateurs chimiques favorisant l'inflammation, qui se propagent par la rupture de comédons dans le derme environnant. Cela transforme les comédons en lésions inflammatoires (pustules, nodules et kystes) (Dawson et Dellavalle, 2013).

P. acnes induit l'inflammation par des mécanismes directs et indirects. *P. acnes* produit des enzymes de dégradation, telles que les lipases qui hydrolysent les triglycérides du sébum en glycérol, utilisé par l'organisme comme un substrat de croissance, et en acides gras libres, qui ont des propriétés pro-inflammatoires (Shalita et Lee, 1983). Le mécanisme indirect consiste en l'exposition des antigènes de *P. acnes*, les clusters de différenciation CD1 et CD14. Cela va introduire une réaction inflammatoire par l'activation des récepteurs de type Toll dans les kératinocytes, les sébocytes, les cellules immunitaires, les macrophages et les monocytes (Kim et al., 2002; Wang et Zane, 2008). L'activation de ces cellules conduit à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, les cytokines, comme les interleukines (IL) IL 1 β , IL 6, IL 8, IL 12, et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) (Nagy et al., 2006). Les lipases et les autres enzymes hydrolytiques produites directement par *P. acnes* ou par le système immunitaire contribuent à la rupture folliculaire, la propagation de l'inflammation et, alors, à la sévérité de l'acné.

Le rôle de *P. acnes* en tant qu'initiateur de l'inflammation ou en tant que facteur déterminant la sévérité de l'acné, ainsi que le mécanisme moléculaire exact de la réaction inflammatoire, sont toujours en étude (Contassot et French, 2014). Il a été également supposé que *P. acnes* joue un rôle dans la formation des microcomédons en modifiant l'expression de la filaggrine et, par conséquent, en affectant la différenciation des kératinocytes et stimulant leur prolifération (Jarrousse et al., 2007). La présence de l'acné dans les syndromes

auto-inflammatoires tels que PAPA (*Pyogenic Arthritis, Pyoderma gangrenosum, Acne*), PASH (*Pyoderma gangrenosum, Acne, Suppurative Hidradenitis*), SAPHO (*Synovitis, Acne, Pustulosis, Hyperostosis, Osteitis*) montre l'importance du mécanisme inflammatoire dans la pathogénèse de l'acné. Le syndrome SAPHO en particulier, souligne le rôle de *P. acnes* dans celle-ci (Chen et al., 2011; Hong et al., 2013).

d) Hormones

Le développement de l'acné est associé aux changements hormonaux lors de la puberté, en particulier, les androgènes. Ces derniers jouent un rôle essentiel dans la pathogénèse de l'acné en affectant, de façon complexe, la différenciation et la prolifération des kératinocytes infra-infundibulaires et les sébocytes, la formation des comédons et le métabolisme des lipides du sébum (Kurokawa et al., 2009). En revanche, le niveau des androgènes circulants est normal chez la plupart des patients atteints d'acné à l'exception des femmes âgées de plus de 25 ans qui montrent des concentrations élevées en androgènes circulants (hyperandrogénie) (Seirafi et al., 2007). Il a été supposé que les androgènes jouent uniquement un rôle permissif ou initiateur dans le déclenchement de l'acné (Kurokawa et al., 2009). Une autre hypothèse a été proposée pour expliquer la pathogénèse de l'acné avec des niveaux circulants normaux d'androgènes : il s'agit d'une d'hyper-expression des récepteurs d'androgènes sur les cellules des glandes sébacées (hyperandrogénisme) (Schmidt et al., 1986). L'acné peut aussi se développer sous l'effet de l'hyperandrogénie cutanée en absence de l'hyperandrogénie systémique (Knutsen-Larson et al. 2012). En effet, les glandes sébacées, qui sont sous contrôle des androgènes, possèdent les six enzymes nécessaires à la synthèse des androgènes à partir du cholestérol ou pour convertir les androgènes circulants en métabolites plus puissants (Chen et al., 2002). Il est à noter que les androgènes principaux sont : la testostérone, la déhydroépiandrostérone (DHEA), l'androstènedione, l'androstènediol, l'androstérone, et la dihydrotestostérone (DHT). Les enzymes responsables de leur synthèse et leur métabolisme sont : la stéroïde sulfatase, la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase, la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase, la stéroïde 5 α -réductase, la 3 α -hydroxystéroïde déshydrogénase, l'aromatase. Parmi ces enzymes, la stéroïde sulfatase est susceptible d'avoir un effet sur le développement de l'acné puisqu'elle possède un rôle prédominant dans les activités androgéniques sébacées concernant la production du sébum (Imperato-McGinley et

al., 1993) et elle a montré une réactivité immunitaire accrue dans le cas de l'acné (Thiboutot et *al.*, 1998).

Le développement de l'acné au cours des syndromes PCOS (*PolyCystic Ovary Syndrome*), CAH (*Congenital Adrenal Hyperplasia*) et SAHA (*Seborrhoea, Acne, Hirsutism, Alopecia*) souligne la contribution de l'hyperandrogénie et l'hyperandrogénisme dans la pathogénèse de l'acné (Chen et *al.*, 2011).

Le système cholinergique est également lié à la pathogénèse de l'acné (Hana et *al.*, 2007). Les sébocytes indifférenciés et matures et les kératinocytes infundibulaires expriment les récepteurs cholinergiques (effet endocrine) (Kurzen et *al.*, 2004; Grando et *al.*, 2006). Les kératinocytes peuvent synthétiser l'acétylcholine (effet paracrine) (Slominski et Wortsman, 2000). L'activation excessive des récepteurs cholinergiques dans l'unité pilo-sébacée (endocrine, paracrine ou exocrine) induit l'hyperprolifération de ces cellules et l'hyperproduction du sébum (Hana et *al.*, 2007).

L'insuline et le facteur de croissance-1 analogue à l'insuline (IGF-1) stimulent la synthèse des androgènes dans l'ovaire, les glandes surrénales et les testicules (Davidovici et Wolf, 2010) par l'activation de cytochrome P450c17 (17 α -hydroxylase et 17,20 lyase) et alors la conversion de la prégnénolone en déhydroépiandrostérone (DHEA) (Baptiste et *al.*, 2010). Les conditions présentant une hyperinsulinémie, telles que le syndrome PCOS, le diabète de type-2 et l'obésité, sont alors associées au développement de l'acné pour induire une hyperandrogénie (Imperato-McGinley et *al.*, 1993; Rosenfield, 1999 et 2001; Rosenfield et *al.*, 2000; Tsai et *al.*, 2006; Smith et *al.*, 2007). Ainsi, l'insuline et l'IGF-1 stimulent directement la croissance des glandes sébacées (Rosenfield, 1999 et 2001).

e) Autre facteurs

Des études statistiques comparatives ont montré que les antécédents familiaux multiplient le risque d'acné par deux (Ghods et *al.*, 2009; Wei et *al.*, 2010). Des différences de fréquence et de sévérité de l'acné ont été trouvées entre différents groupes ethniques (Cheng et *al.*, 2010). L'apparition de l'acné comme un symptôme dans le syndrome PAPA est en faveur de l'implication génétique dans sa pathogénèse. Néanmoins, le facteur génétique dans le développement de l'acné n'est pas confirmé clairement (Williams et *al.*, 2012).

Le tabagisme augmente le risque et la sévérité de l'acné (Schäfer et *al.*, 2001). Son rôle dans la pathogénèse de l'acné est expliqué par les activités de la nicotine sur les récepteurs de l'acétylcholine présents dans l'unité pilo-sébacée (effet exocrine) (Hana et *al.*, 2007).

Le régime alimentaire est également impliqué dans la pathogénèse de l'acné (Knutsen-Larson et *al.* 2012; Dawson et Dellavalle, 2013; Williams et *al.*, 2012). La sévérité de l'acné a été associée à des régimes alimentaires ayant une charge glycémique élevée, tels les produits laitiers, en raison de l'hyperinsulinémie induite (Smith et *al.*, 2007; Adebamowo et *al.*, 2008; Spencer et *al.*, 2009; Davidovici et Wolf, 2010). De plus, le lait contient naturellement le IGF-1 (Suikkari, 1989) et stimule alors directement la synthèse des androgènes.

Enfin, des facteurs environnementaux nombreux ont été associés à l'exacerbation de l'acné tels que le manque d'exposition au soleil (Green et *al.*, 2001), l'humidité (Tucker, 1983) et des produits cosmétiques et nettoyants pour le visage riche en huiles (Plewig et *al.*, 1970).

2.1.2 Traitement de l'acné

En raison de la complexité de la pathogénèse de l'acné et du manque de compréhension de celle-ci, le traitement idéal n'existe pas, mais des protocoles médicaux et physiques avec des précautions hygiéniques peuvent réduire les lésions (Williams et *al.*, 2012), on parle alors de la gestion de l'acné. Le traitement médical de l'acné comprend plusieurs agents thérapeutiques ciblant une ou plusieurs pathologies, destinés à la voie cutanée et/ou orale. Le choix du protocole médical dépend de l'âge du patient, de la sévérité, de l'étendue et de la morphologie de l'acné (Dawson et Dellavalle, 2013; Zaenglein et *al.*, 2016).

a) Les traitements topiques (cutanés)

Les traitements topiques de l'acné contiennent généralement des rétinoïdes et des composés semblables aux rétinoïdes, le peroxyde de benzoyle et des antibiotiques topiques. D'autres agents thérapeutiques moins fréquents existent tels que l'acide salicylique, l'acide azélaïque, le chlorure d'aluminium, la résorcine, le soufre, et le zinc (Zaenglein et *al.*, 2016).

- Les rétinoïdes

Les rétinoïdes sont des dérivés de la vitamine A. Ils ont principalement un effet comédolytique en normalisant la desquamation et l'adhérence des kératinocytes. Ainsi, ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires légères (Bradford et Montes, 1974). Les rétinoïdes empêchent le développement de microcomédons. Ils peuvent être alors utilisés pour le traitement d'entretien (Gollnick et *al.*, 2003). L'utilisation des rétinoïdes est limitée par leurs effets irritants (Thielitz et Gollnick 2008). Plusieurs composés rétinoïdes topiques existent, comme la trétinoïne, l'isotrétinoïne, l'adapalène et la tazarotène. Ces rétinoïdes agissent différemment sur les différents types des récepteurs de la vitamine A (α , β et γ), induisant des différences d'activité thérapeutique, d'efficacité et de tolérance entre ces différents dérivés (Zaenglein et *al.*, 2016). Les rétinoïdes topiques peuvent être utilisés en combinaison avec les antibiotiques pour réduire le développement de résistance. Néanmoins, ils ne sont pas stables en présence du peroxyde de benzoyle. Enfin, les rétinoïdes sont des molécules tératogènes et alors contre-indiquées pendant la grossesse ou chez les femmes susceptibles d'être enceintes (Thielitz et Gollnick, 2008).

- Le peroxyde de benzoyle

Le peroxyde de benzoyle possède des propriétés bactéricides par la génération de radicaux libres qui oxydent les protéines dans la membrane cellulaire bactérienne (Taylor et Shalita, 2004). Il possède également des effets comédolytiques et anti-inflammatoires légers (Oh et Myung, 1996). Il est recommandé en monothérapie pour l'acné légère ou en combinaison avec des antibiotiques pour l'acné moyenne ou sévère (Zaenglein et *al.*, 2016). Le peroxyde de benzoyle exerce son effet oxydant également sur l'épiderme induisant une irritation cutanée qui peut être si sévère qu'elle nécessite l'arrêt du traitement (Williams et *al.*, 2012).

- Les antibiotiques

Les antibiotiques topiques les plus fréquemment utilisés pour le traitement de l'acné sont les macrolides (la clindamycine, l'érythromycine). Ces antibiotiques possèdent des propriétés bactériostatiques permettant de réduire la présence de *P. acnes* sur la surface de la peau et à l'intérieur de l'unité pilo-sébacée (Leyden et *al.*, 2009) et également des propriétés anti-inflammatoires (Mills et *al.* 2002; Tan et *al.*, 2005). En raison du développement de la

résistance aux antibiotiques, l'utilisation de ceux-ci pour le traitement d'entretien est non recommandée. La monothérapie antibiotique n'est pas non plus recommandée mais on utilise les antibiotiques en combinaison avec le peroxyde de benzoyle ou les rétinoïdes topiques (Knutsen-Larson et *al.* 2012; Williams et *al.*, 2012; Dawson et Dellavalle, 2013; Zaenglein et *al.*, 2016).

b) Les traitements systémiques (oraux)

Les traitements oraux sont destinés à l'acné moyenne et sévère.

▪ Les antibiotiques

Les mêmes groupes d'antibiotiques que ceux utilisés pour le traitement topique sont recommandés pour le traitement oral de l'acné sévère étendue sur une large surface du corps pour améliorer l'observance du patient (par rapport à la voie topique), en combinaison avec les rétinoïdes ou le peroxyde de benzoyle, qui eux sont administrés par voie topique, pour réduire la résistance bactérienne (Knutsen-Larson et *al.*, 2012; Dawson et Dellavalle, 2013).

▪ Les hormones

Les traitements hormonaux disponibles comprennent principalement les contraceptifs oraux (œstrogène + progestatif de synthèse), qui suppriment la production des androgènes ovariennes et surrénales, et les agents bloquant les récepteurs d'androgènes (l'acétate de cyprotérone, la spironolactone, et le flutamide). Les traitements avec les contraceptifs sont recommandés chez les femmes atteintes d'acné modérée à sévère, et qui désirent une contraception orale ou dans le cas où les autres traitements ont échoué (Smith et *al.*, 2011). Le mécanisme d'action de ces agents contre l'acné agit donc contre l'hyperandrogénie et l'hyperandrogénisme. Ils montrent une efficacité certaine, même chez les femmes ayant des niveaux normaux d'androgènes systémiques (George et *al.*, 2008).

▪ L'isotrétinoïne

Le traitement oral par l'isotrétinoïne constitue la première ligne pour l'acné sévère, et la deuxième ligne pour l'acné moyenne résistante aux autres traitements (Dawson et Dellavalle, 2013). Il montre une efficacité unique par rapports aux autres agents

thérapeutiques rétinoïques ou non rétinoïques en ciblant les quatre pathogénèses de l'acné en normalisant la kératinisation et la desquamation folliculaires (Windhorst, 1982; Dalziel et al., 1987), puis en réduisant la production du sébum (Strauss et Stranieri, 1982 ; Leyden et McGinley, 1982; King et al., 1982). Il inhibe la croissance de *P. acnes* (Leyden et McGinley, 1982; King et al., 1982) et exerce un effet anti-inflammatoire (Falcon et al., 1986). L'isotrétinoïne est actuellement le traitement le plus efficace pour l'acné et est utilisé en monothérapie (Layton 2009; Dawson et Dellavalle, 2013). Cependant, son utilisation subit des réglementations strictes dans la plupart des pays en raison de son effet tératogène (Lynberg et al., 1990) et sa susceptibilité d'avoir des effets secondaires sérieux tels que la maladie inflammatoire chronique de l'intestin, la dépression, l'anxiété, le changements d'humeur, des facteurs de risque cardiovasculaire et la minéralisation des os (Williams, 2012; Zaenglein et al., 2016).

2.2 L'isotrétinoïne

L'isotrétinoïne est une SA développée par Hoffmann-La Roche en 1971 et approuvée la première fois par la *Food and Drug Administration* (FDA) aux États-Unis en 1982 sous la marque ACCUTANE®. C'est un médicament sous prescription pour le traitement de l'acné sévère résistante aux traitements conventionnels. L'utilisation de l'isotrétinoïne est surveillée par les autorités compétentes dans la plupart des pays. Par exemple, aux États-Unis, les autorités REMS (*Risk Evaluation Mitigation Strategies*), mandatées par la FDA, ont lancé le programme iPLEDGE. Lors de la prescription de l'isotrétinoïne, le médecin, le patient et le pharmacien doivent s'inscrire dans ce programme et convenir d'accepter certaines responsabilités. En France, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) en 2015 restreint les prescriptions initiales d'isotrétinoïne uniquement aux dermatologues. Actuellement en France, il se trouve sous forme de capsules molles dosées à 5, 10, 20 ou 40 mg pour la voie orale (ACNETRAIT®, CONTRACNE®, CURACNE®, PROCUTA®) dans laquelle l'isotrétinoïne est présentée sous forme de suspension dans de l'huile de soja. La forme topique disponible (ROACCUTANE®) est un gel hydro-alcoolique d'hydroxypropylcellulose contenant 0,05 m/m% d'isotrétinoïne.

2.2.1 Définition

L'isotrétinoïne, ou l'acide 13-*cis*-rétinoïque, est un dérivé synthétique de la vitamine A. Sa nomenclature IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) est l'acide (2Z,4E,6E,8E)-3,7-diméthyl-9-(2,6,6-triméthylcyclohex-1-ényl) nona-2,4,6,8-tétraénoïque. Sa structure comprend un cycle β -ionone avec une chaîne latérale de polyène terminée par un groupement carboxyle. Sa constante d'acidité (pKa) est de 4,79. Sa formule brute est $C_{20}H_{28}O_2$ avec une masse molaire de $300,4351 \pm 0,0186 \text{ g.mol}^{-1}$. L'isotrétinoïne fait partie de la première génération des rétinoïdes. Celle-ci comprend à côté de la vitamine A (le tout-*trans*-rétinol et ses esters avec les acides acétique, propanoïque et palmitique), le rétinol et la trétinoïne (l'acide tout-*trans*-rétinoïque) et ses autres isomères tels que l'alitrétinoïne (l'acide 9-*cis*-rétinoïque) et l'acide 11-*cis*-rétinoïque (Figure 3) (Eur.Ph 8^{Ed}, 2014).

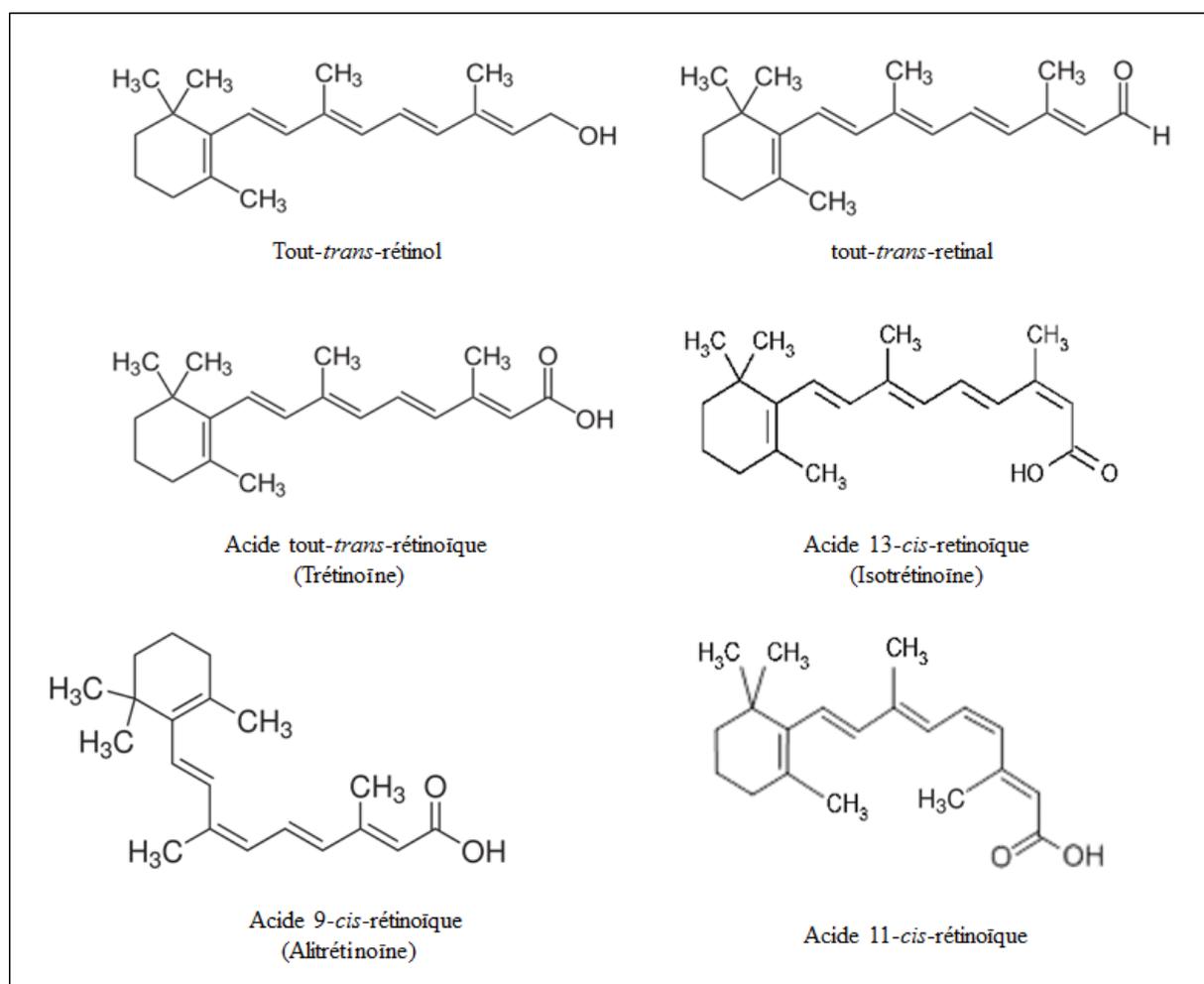


Figure 3 : Les formules structurales des rétinoïdes de la première génération (Livrea et Packer, 1993).

2.2.2 Solubilité de l'isotrétinoïne

L'isotrétinoïne se présente sous forme de poudre cristalline, jaune ou orange pâle. C'est une molécule fortement hydrophobe (log P entre 5,01 et 6,6 selon les références (Nankervis, 1992; Raza et *al.*, 2013c)), pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans le chlorure de méthylène (Eur.Ph 8^{Ed}, 2014). La solubilité de l'isotrétinoïne a été étudiée dans une large gamme d'excipients pharmaceutiques tels que des huiles végétales et synthétiques, des tensioactifs et des co-tensioactifs. Le Tableau 1 montre des exemples d'excipients étudiés avec les valeurs de solubilité trouvées.

Tableau 1 : La solubilité de l'isotrétinoïne dans des exemples d'excipients pharmaceutiques.

Excipient	Composition	Solubilité de l'isotrétinoïne (mg.ml ⁻¹)	Références
Huile de coton LCT ^a	26 % palmitate 18 % oléate 52 % linoléate	C16 : 0 C18 : 1 C18 : 2	Nankervis et <i>al.</i> , 1995 et 1996
Huile de soja LCT ^a	12 % palmitate 24 % oléate 51 % linoléate	C16 : 0 C18 : 1 C18 : 2	
Huile d'arachide LCT ^a	12 % palmitate 53 % oléate 26 % linoléate	C16 : 0 C18 : 1 C18 : 2	
Miglyol 812 MCT ^b	55 % caprylate 45 % caprate	C8 : 0 C10 : 0	
Acide oléique		C18 : 1	
Acide linoléique		C18 : 2	
Huile de tournesol	5 % palmitate 30 % oléate 59 % linoléate	C16 : 0 C18 : 1 C18 : 2	Chavda et <i>al.</i> , 2013
Huile de ricin	1 % palmitate 4 % oléate 3 % linoléate 90 % ricinoléate	C16 : 0 C18 : 1 C18 : 2 C18 : 1	
PEG 200 ^c	Polyéthylène glycol 200	8,5	
PEG 400 ^c	Polyéthylène glycol 400	12,2	
Tween 20	Monolaurate de sorbitane polyoxyéthylène 20	10,0	
Tween 80	Monooléate de sorbitane polyoxyéthylène 20	14,6	
Propylène glycol		1,6	
Transcutol P	diéthylène glycol monoéthyl éther	52,3	
Plurol oleique	l'ester oléique de polyglycérol	5,0	

^a Triglycérides à chaînes longues

^b Triglycérides à chaînes moyennes

^c Polyéthylène glycol

Avec les huiles végétales, la solubilité de l'isotrétinoïne dépend de la longueur de la chaîne des acides gras et leur degré d'insaturation. Par exemple, le Miglyol 812, qui est composé des triglycérides à chaînes moyennes, solubilise mieux l'isotrétinoïne que les huiles de triglycérides à chaînes longues, en raison de la teneur élevée en groupements ester dans cette huile. Le pouvoir solubilisant des huiles de triglycérides à chaînes longues (vis-à-vis de l'isotrétinoïne) semble être amélioré par la présence d'insaturations dans les chaînes des acides gras comme avec l'huile de soja et l'huile d'arachide en comparaison avec l'huile de coton. Certains excipients synthétiques, tels que le Transcutol P, possèdent un pouvoir solubilisant de l'isotrétinoïne plus important que les huiles végétales. L'incorporation de l'isotrétinoïne dans les cyclodextrines (α -cyclodextrine et hydroxypropyl β -cyclodextrine) est également une des stratégies permettant d'améliorer sa solubilité (Yap et *al.*, 2005; Trichard et *al.*, 2007; Kaur et *al.*, 2010). A titre d'exemple, la valeur de la solubilité de l'isotrétinoïne dans l'eau est de $1,1 \pm 0,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Cette valeur a été augmentée neuf fois ($9,2 \pm 1,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) lors de la formation d'un complexe d'incursion dans l'hydroxypropyl β -cyclodextrine (Kaur et *al.*, 2010).

2.2.3 Stabilité de l'isotrétinoïne

L'isotrétinoïne est sensible à l'air, à la chaleur et à la lumière, surtout en solution (Eur.Ph 8^{Ed}, 2014). La photosensibilité de l'isotrétinoïne constitue un problème majeur lors du développement de nouvelles formes pharmaceutiques. Elbaum (1988) a rapporté que jusqu'à 20 % et 40 % de l'isotrétinoïne se dégrade sous l'exposition à la lumière d'une lampe à incandescence (pendant 4 h) et à la lumière fluorescente (pendant 2 h). Les produits de photo-dégradation de l'isotrétinoïne sont principalement les isomères de l'acide rétinoïque et, à plus faible teneur, des produits de la photolyse (Tashtoush et *al.*, 2008). La photosensibilité de l'isotrétinoïne a été étudiée dans des solutions alcooliques. Dans l'éthanol et le méthanol, l'isotrétinoïne subit une isomérisation complète et rapide (en quelques secondes à quelques minutes) vers l'alitrétinoïne (Ioel et *al.*, 2005; Patel et *al.*, 2011). Les rayonnements UV A (320 – 400 nm) du rayonnement solaire sont les principaux contributeurs à la photo-dégradation de l'isotrétinoïne (Tashtoush et *al.*, 2008). L'encapsulation de l'isotrétinoïne dans les cyclodextrines (α -cyclodextrine et hydroxypropyl β -cyclodextrine), des liposomes et des microémulsions permet d'améliorer sa photo-stabilité (Ioel et *al.*, 2005;

Yap et *al.*, 2005; Liu et *al.*, 2007a,b; Patel et *al.*, 2011). L'isotrétinoïne est également sensible à l'oxydation (Lima et *al.*, 2005). Les produits principaux de l'oxydation sont la 4-oxoisotrétinoïne, la 4-hydroxyisotrétinoïne et la 5,6-dehydro-5,6-epoxyisotrétinoïne. La chaleur dégrade l'isotrétinoïne par stimulation des réactions d'oxydation. En absence d'oxygène, la chaleur au-dessous de la température de fusion (174 – 175° C) ne modifie que l'état physique de l'isotrétinoïne en poudre (Tan et *al.*, 1992).

2.2.4 Mode d'action

L'isotrétinoïne constitue la SA la plus efficace contre l'acné en exerçant des effets recouvrant les quatre pathogénèses principales dans le développement de l'acné (Plewing et *al.*, 1982; Kurokawa et *al.*, 2009). L'isotrétinoïne possède principalement un effet suppresseur contre les glandes sébacées permettant de réduire la production du sébum (Landthaler et *al.*, 1980; Strauss et *al.*, 1980; Gomez, 1982; Leyden et McGinley, 1982; Stewart et *al.*, 1984; Dalzeil et *al.*, 1987). Elle inhibe également la croissance de *P. acnes* (Plewig et *al.*, 1982; Leyden et McGinley, 1982), exerce un effet anti-inflammatoire (Falcon et *al.*, 1986) et modifie le mode de kératinisation dans les follicules (Plewig et Wagner, 1981; Plewig et *al.*, 1982).

Le facteur clé dans l'efficacité de l'isotrétinoïne est son effet anti-androgène antiprolifératif sur les glandes sébacées. L'isotrétinoïne réduit la taille des glandes sébacées jusqu'à 90 %, perturbe la différenciation des sébocytes de façon que la majorité des sébocytes dans les glandes sébacées soit indifférenciée (Landthaler et *al.*, 1980), réduit leurs activités métaboliques (Dalzeil et *al.*, 1987), et par conséquent, diminue la production du sébum jusqu'à 70 % (Leyden et McGinley, 1982). De plus, l'isotrétinoïne modifie la composition du sébum (Strauss et *al.*, 1980; Foolad et *al.*, 2016). Néanmoins, le mécanisme moléculaire du mode d'action de l'isotrétinoïne contre l'acné n'est pas encore complètement élucidé (Foolad et *al.*, 2016) en raison du manque de compréhension sur la pathogénicité de l'acné et la complexité des rôles physiologiques de la vitamine A et de ses dérivés (Plet et *al.*, 1988; di Masi et *al.*, 2015). Les rétinoïdes se lient généralement à des récepteurs nucléaires régularisant la transcription de gènes, les récepteurs d'acide rétinoïque RAR (*Retinoic Acid Receptors*) et les récepteurs X du rétinoïdes RXR (*Retinoid X Receptors*). Chaque type de ces

récepteurs présente trois sous types différents α , β et γ . L'épiderme humain contient les récepteurs RXR α (75 %), RXR β (9 %), RAR α (2 %) et RAR γ (14 %) (Karlsson et al., 2004). Les protéines cellulaires de liaison des rétinoïdes CRBP (*cellular retinol binding proteins*) et CRABP (*cellular retinoic acid binding proteins*) seraient impliquées dans le transport des rétinoïdes et leur disponibilité dans les noyaux (Dollé et al., 1990). L'isotrétinoïne n'a pas ou peu de capacité à se lier aux protéines de liaison CRBP et CRABP et aux récepteurs RAR et RXR (Levin et al., 1992), mais peut agir comme une prodrogue par son isomérisation intracellulaire à des métabolites agonistes de ces récepteurs nucléaires tels que la trétinoïne (Tsukada et al., 2000; Törmä, 2001). D'autres mécanismes indépendants de l'activation des récepteurs nucléaires RAR et RXR ont été proposés pour expliquer l'efficacité supérieure de l'isotrétinoïne par rapport aux autres rétinoïdes. L'isotrétinoïne induit, par un mécanisme indépendant des récepteurs RAR, l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire des sébocytes (Nelson et al., 2006). Il a été rapporté que l'isotrétinoïne réduit, par un rôle dans la régulation génique, l'expression des récepteurs d'androgènes sur les sébocytes (Pakhiddey et al., 2015). L'isotrétinoïne réduit, de la même manière, l'expression de la stéroïde 5 α -réductase, l'enzyme responsable de la conversion cutanée de la testostérone à la dihydrotestostérone (DHT) qui est 60 fois plus efficace (Boudou et al., 1995). Une autre hypothèse proposée est l'effet de l'isotrétinoïne sur le métabolisme de rétinoïdes endogènes nécessaires à la prolifération et à la différenciation des kératinocytes et des sébocytes (Törmä, 2001).

L'isotrétinoïne modifie le mode de kératinisation et prévient la formation des microcomédons (Plewig et al., 1982; Plewig et Wagner, 1981). Le mécanisme de cet effet n'est pas non plus connu et ne semble pas avoir un rôle crucial dans le mode d'action de l'isotrétinoïne (Dalzeil et al., 1987). L'isotrétinoïne réduit significativement le nombre de *P. acnes* sans avoir des propriétés antimicrobiennes (Weissmann et al., 1981). La réduction du nombre de la population de *P. acnes* est probablement un résultat secondaire du changement du milieu folliculaire en raison de la diminution de la production du sébum (Strauss et al., 1980). L'effet anti-inflammatoire de l'isotrétinoïne comprend un effet indirect par la réduction du nombre de *P. acnes*, et aussi direct par l'inhibition de la chimiotaxie des monocytes (Falcon et al., 1986).

2.2.5 Posologie et pharmacologie après une administration par voie orale

Comme le mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé, la posologie de l'isotrétinoïne a été établie sur la base des observations cliniques. La dose recommandée par voie orale, selon l'*European dermatology Forum* et en accord avec les directives de l'Agence Européenne des Médicaments (EMA), est de 0,3 - 0,5 mg.kg⁻¹.j⁻¹ pour l'acné moyenne modulaire et l'acné sévère, ou de $\geq 0,5$ mg.kg⁻¹.j⁻¹ pour l'acné conglobata pour une durée minimale de 3 mois et de $\leq 0,3$ mg.kg⁻¹.j⁻¹ pour le traitement d'entretien (Nast et *al.*, 2016). Il est fortement recommandé de commencer le traitement avec une faible dose ($\approx 0,5$ mg.kg⁻¹.j⁻¹) et ensuite, augmenter la dose progressivement jusqu'à la dose maximale tolérée (≈ 1 mg.kg⁻¹.j⁻¹) afin de réduire les effets secondaires et de faciliter leur gestion (Borghi et *al.*, 2009). La dose cumulée optimale est de 120 – 150 mg.kg⁻¹ pour avoir un effet thérapeutique et réduire le risque de rechute ou la retarder (Zaenglein et *al.*, 2016).

La biodisponibilité de l'isotrétinoïne par voie orale est de 25%. L'absorption gastro-intestinale de l'isotrétinoïne est fortement améliorée si sa prise se fait pendant les repas, spécialement avec la présence de matières grasses (Colburn et *al.*, 1983; Del Rosso, 2012; Webster et *al.*, 2013; Tan et Knezevic, 2013). L'isotrétinoïne est fortement liée à l'albumine plasmatique (99,9 %). Le métabolite principal de l'isotrétinoïne est la 4-oxo-isotrétinoïne avec la trétinoïne, l'alitrétinoïne, la 4-oxo-trétinoïne, la 4-oxo-alitrétinoïne (Layton, 2009). Son temps maximal (T_{max}) pour atteindre de la concentration maximale dans le plasma (C_{max}) est de l'ordre de 4 h et sa demi-vie est de 22 h. La demi-vie de son métabolite principal, la 4-oxo-alitrétinoïne, est de 29 h (Brazzell et Colburn, 1982; Brazzell et *al.*, 1983). L'isotrétinoïne ne s'accumule pas dans les tissus adipeux ou dans un autre organe et son élimination se fait dans les selles et l'urine (Colburn et *al.*, 1983).

L'administration orale de l'isotrétinoïne est associée à des effets secondaires systémiques significatifs tels que la toxicité mucocutanée, l'opacité cornéenne, l'hyperostose, et l'hypertriglycémie. Cela peut limiter son utilisation pour le traitement de l'acné ou pour d'autres désordres cutanés (Zaenglein et *al.*, 2016).

2.2.6 Posologie et pharmacologie après une administration par voie topique

L'application cutanée permet d'avoir un effet thérapeutique local avec une réduction des effets secondaires systémiques (Lehman et *al.*, 1988). Le site thérapeutique ciblé est les unités pilo-sébacées qui se trouvent au niveau du derme. La concentration thérapeutique dans ce site, en tenant compte des concentrations dermiques obtenues suite à l'administration orale lors d'un traitement efficace ($0,75 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pendant 6 mois), est de $88,9 \pm 46,1 \text{ mg.g}^{-1}$ de tissu (Rollman et Vahlquist, 1986). La quantité d'isotrétinoïne accumulée dans le derme est indépendante de la dose appliquée. Pour cette raison, la diffusion simple ne pourrait pas être le mécanisme principal de la pénétration cutanée de l'isotrétinoïne (Lehman et *al.*, 1988).

L'isotrétinoïne étant une molécule fortement hydrophobe, lors de son administration cutanée, la grande majorité de la quantité absorbée s'accumule dans la couche supérieure de l'épiderme, le *stratum corneum*, en raison de la nature fortement hydrophobe de cette couche. Les couches inférieures de l'épiderme et le derme sont plus hydrophiles et reçoivent alors des quantités moins importantes de cette molécule. Cela peut alors limiter l'efficacité du traitement topique (Lehman et *al.*, 1988). L'absorption cutanée de l'isotrétinoïne peut être améliorée par l'utilisation de promoteurs d'absorption cutanée tels que l'acide linoléique (Moghimi et *al.*, 2004). En effet, la pénétration cutanée de l'isotrétinoïne dépend des solvants. Par exemple, la pénétration cutanée de l'isotrétinoïne à travers le *stratum corneum* avec le propylène glycol et l'isopropanol est plus importante par rapport aux autres solvants tels que les huiles minérales, le polyéthylène glycol et le di-isopropyladipate. Les quantités d'isotrétinoïne retrouvées dans le derme ont été de 7,4 % et 5,9 % de la dose appliquée pour le propylène glycol et l'isopropanol, respectivement. Plus la solubilité de l'isotrétinoïne dans le solvant est élevée moins la pénétration cutanée est importante, à l'exception des solvants volatiles (Lehman et *al.*, 1988).

Une pénétration excessive permet à l'isotrétinoïne d'atteindre la circulation sanguine et d'induire les effets secondaires systémiques (Willhite et *al.*, 1990). Par exemple, lors de l'étude de Lehman et *al.*, (1988), une portion de l'isotrétinoïne appliquée en solution dans l'isopropanol (0,4 %) a traversé le derme. Cela doit être évité lors du développement des nouvelles formes pharmaceutiques cutanées. Actuellement, l'isotrétinoïne topique est disponible dans l'industrie pharmaceutique sous forme de gel hydro-alcoolique d'hydroxypropylcellulose la concentration de à 0,05 % (avec le butylhydroxytoluène comme

antioxydant). L'efficacité thérapeutique de cette formulation a été démontrée par sa capacité à réduire le nombre des lésions inflammatoires et non inflammatoires et à diminuer le degré de sévérité de l'acné (Chalker et *al.*, 1987). L'application cutanée de ce gel, et d'autres gels à des compositions comparables ne permettent pas à l'isotrétinoïne d'atteindre la circulation sanguine (Durand et *al.*, 1990; Jensen et *al.*, 1991; Stables et *al.*, 1996; Cunliffe et *al.*, 2001). Cependant, un effet irritant cutané important a été rapporté lors de l'application du gel (Queille-Roussel et *al.*, 2001), et cet effet peut être si important qu'il nécessite l'arrêt du traitement (Chalker et *al.*, 1987).

2.2.7 Nouvelles approches pour une application topique

L'encapsulation de l'isotrétinoïne dans différentes formes nano-pharmaceutiques, telles que les liposomes, les nanoparticules lipidiques, les vecteurs lipidiques nanostructurés, les nanocapsules, les microémulsions et les NEs, a été étudiée afin d'améliorer son administration cutanée et diminuer les effets secondaires observés avec la forme orale et la forme gel actuellement commercialisées. Le Tableau 2 montre des exemples de ces études avec les caractéristiques principales des systèmes étudiés.

Les avantages principaux tirés de ces systèmes d'administration cutanée de l'isotrétinoïne par rapport au gel commercial sont : l'amélioration de la photo-stabilité de la SA, l'augmentation de l'absorption cutanée, la réduction ou l'absence d'absorption percutanée et, par conséquent, la limitation des effets secondaires systémiques, la possibilité d'obtenir une libération prolongée et contrôlée de la SA à partir de ces systèmes.

Tableau 2 : Exemples des formes nano-pharmaceutiques étudiées pour l'encapsulation de l'isotrétinoïne pour une administration cutanée.

Formulation	Composition	C ^a (m/m%)	E ^b (%)	Etude cutanée	Avantages	Référence
Liposomes	Hydroxypropyl β-cyclodextrine, lécithine de soja, Span 80, Span 60, cholesterol	9 – 17 ^c	60 - 90	<i>Ex-vivo</i> : Peau abdominale de rat Test de toxicité : <i>In-vivo</i> (rat) Test d'irritation : test de Draize	Améliore la photo-stabilité Diminue la toxicité cutanée Augmente la pénétration cutanée	Kaur et al., 2010
	Lécithine de jaune d'œuf.	0,107	26	nd*		Ioele et al., 2005
Nanoparticules lipidiques solides	Lécithine de soja, Tween 80	0,054	90	<i>Ex-vivo</i> : peau abdominale de rat	Augmente la photo-stabilité Améliore la pénétration cutanée Réduit l'absorption systémique Diminue l'irritation cutanée	Liu et al., 2007a,b
	Monostéarate de glycérol, Tween 80, Compritol 888 ATO (dibéhénate de glycérol)	0,04	≈ 80	<i>Ex-vivo</i> : peau complète de souris <i>In-vivo</i> : méthode de tape- stripping sur peau humaine Test d'irritation : test de Draize		Shiva et al., 2012
	Lécithine de soja, Tween 80, Compritol 888 ATO (dibéhénate de glycérol)	0,045	89,49	<i>Ex-vivo</i> : peau dorsale de souris		Raza et al., 2013a,b
Vecteurs lipidiques nanostructurés	Lécithine de soja, Tween 80, Compritol 888 ATO (dibéhénate de glycérol), myristate d'isopropyle	0,039	78,60	<i>Ex-vivo</i> : peau dorsale de souris <i>In-vivo</i> : souris		Raza et al., 2013b,c
Nanocapsules	Poly(ε-caprolactone)	nd*	nd*	<i>Ex-vivo</i> : méthode de tape stripping sur peau humaine et porcine	Augmente la pénétration cutanée Réduit l'absorption systémique	Bettoni et al., 2012

Formulation	Composition	C ^a (m/m%)	E ^b (%)	Etude cutanée	Avantages	Référence
Microémulsion	Myristate d'isopropyle ^H , glycérides de caprylcaproyle macrogol-8 ^T Polyglycéryl oléate ^{CoT}	0,5	nd*	nd*	Améliore la photo-stabilité	Patel et <i>al.</i> , 2011
	Myristate d'isopropyle ^H , Labrasol (glycérides de caprylcaproyle macrogol-8) ^T , Cremophors EL (polyoxyéthylène huile de ricin hydrogénée) ^{CoT} , Solutol HS15 (polyoxyéthylène hydroxy stéarate) ^{CoT} , Plurol Oleique (ester oléique de polyglycérol) ^{CoT}	0,05	nd*	Peau dorsale de porc Tape-stripping		Gürbüz et <i>al.</i> , 2015
Nanoémulsion	Huile de coco ^H , Tween 80 ^T	0,05	nd*	nd*	Prolonge et contrôle la libération (24 h)	Miastkowska et <i>al.</i> , 2016

^a Concentration de l'isotrétinoïne dans la forme nano-pharmaceutique

^b Efficacité d'encapsulation

^c Concentration dans la formulation sans l'eau

* Non déterminé

^H Phase huileuse

^T Tensioactif

^{CoT} Co-Tensioactif

2.3 Conclusion

L'acné est une maladie inflammatoire multifactorielle affectant de nombreux adolescents et qui peut persister pendant des années chez certains individus. L'isotrétinoïne est la SA la plus efficace contre l'acné grâce à ses effets contre les quatre principaux mécanismes de l'acné. Néanmoins, l'utilisation de l'isotrétinoïne reste réservée à l'acné sévère et à l'acné résistante aux autres traitements en raison de ses effets secondaires sérieux. L'administration cutanée de l'isotrétinoïne sous la forme de gel, actuellement disponible, permet d'obtenir l'effet thérapeutique escompté. Cependant, l'utilisation sous forme de gel reste associée à des effets secondaires topiques, tels que l'irritation cutanée, et ainsi des effets secondaires systémiques en raison de l'absorption percutanée.

D'un autre côté, l'isotrétinoïne est une molécule fortement hydrophobe non-soluble dans l'eau. Cela limite son absorption et, par conséquent, sa biodisponibilité. L'isotrétinoïne est aussi une molécule fragile, surtout sensible à la photo-isomérisation et à l'oxydation. L'encapsulation de l'isotrétinoïne dans des formes nano-pharmaceutiques pour l'administration cutanée permettrait d'augmenter sa stabilité et sa solubilité, et ainsi d'améliorer sa biodisponibilité, de réduire ses effets secondaires, de modifier son profil de libération afin d'obtenir un traitement optimisé.

Ainsi, l'isotrétinoïne a été sélectionnée, en tant que SA modèle, pour étudier l'efficacité des NEs développées au cours du travail de cette thèse en tant que système de délivrance cutanée. Dans ces formulations, l'hydroxytoluène butylé a été ajouté au système en tant qu'antioxydant hydrophobe et la gomme xanthane a été utilisée principalement en tant qu'agent épaississant pour obtenir une texture de crème et limiter le crémage.

3 Matériels et méthodes

3.1 Matériels

L'isotrétinoïne (lot P500188), la trétinoïne (lot 118K1413), l'hydroxytoluène butylé (lot LRAA7701), la β -lg (lot SLBC2933V), l'acide acétique glacial de qualité HPLC (lot SZBF1200V) et les solutions du dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) (lot SLBC5939V) et de l'hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4) (lot 068K8600) ont été fournis par Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Le Miglyol 812 (lot 121228) a été fourni par Cremer Oleo GmbH & Co., KG (Hamburg, Germany). L'huile d'amande douce raffinée (lot 13050126/A) et l'huile de germe de blé (lot 13010230/B) de qualité pharmaceutique proviennent de la Cooper (Melun, France). L'azoture de sodium (lot K305.2) a été obtenu auprès de Carl Roth (Karlsruhe, Germany). La gomme xanthane (lot 20060134) a été fournie par Degussa (Paris, France). Le méthanol de qualité HPLC (lot V5C786025D) provient de Carlo Erba Reagents (Milan, Italie).

3.2 Etude de la solubilité de l'isotrétinoïne

La solubilité de l'isotrétinoïne a été étudiée dans les trois huiles utilisées dans le Chapitre II (le Miglyol 812, l'huile d'amande douce et l'huile de germe de blé). Les gammes d'étalonnage dans ces trois huiles ont été obtenues dans un premier temps avec des solutions mères préparées à une concentration de 1 mg.ml^{-1} sous une agitation moyenne avec un barreau magnétique pendant 2 h à 37°C , à l'abri de la lumière. Les spectres d'absorbance de l'isotrétinoïne dans ces trois huiles ont été obtenus avec un spectrophotomètre UV/vis (Jasco, Japan) entre 200 et 400 nm pour déterminer la longueur d'onde du maximum d'absorbance (λ_{max}) de l'isotrétinoïne dans chaque huile. Des courbes d'étalonnage (absorbance *vs* concentration) ont été alors établies à λ_{max} par dilution des solutions mères. La solubilité a été déterminée selon le schéma présenté sur la Figure 4. L'isotrétinoïne a été ajoutée en excès dans les huiles. Les solutions sursaturées ont été préparées par agitation dans un bain marie à 37°C pendant 48 h. Il est à noter que la durée de la solubilisation a été fixée à 48 h suite à des

essais préliminaires sur la quantité d'isotrétinoïne à solubiliser dans ces conditions à 24, 48 et 72 h. Ensuite, l'isotrétinoïne non solubilisée a été séparée par centrifugation (MiniSpin®, Eppendrop, Allemagne) à 6700 ×g pendant 10 min. Les solutions sursaturées ont été laissées au repos à l'abri de la lumière pendant 24 h à 25° C, puis l'isotrétinoïne précipitée a été séparée par centrifugation dans les mêmes conditions. Des aliquotes du surnageant ont été prélevées et diluées avec la même huile jusqu'à obtenir une absorbance dans la zone de linéarité des courbes d'étalonnage.

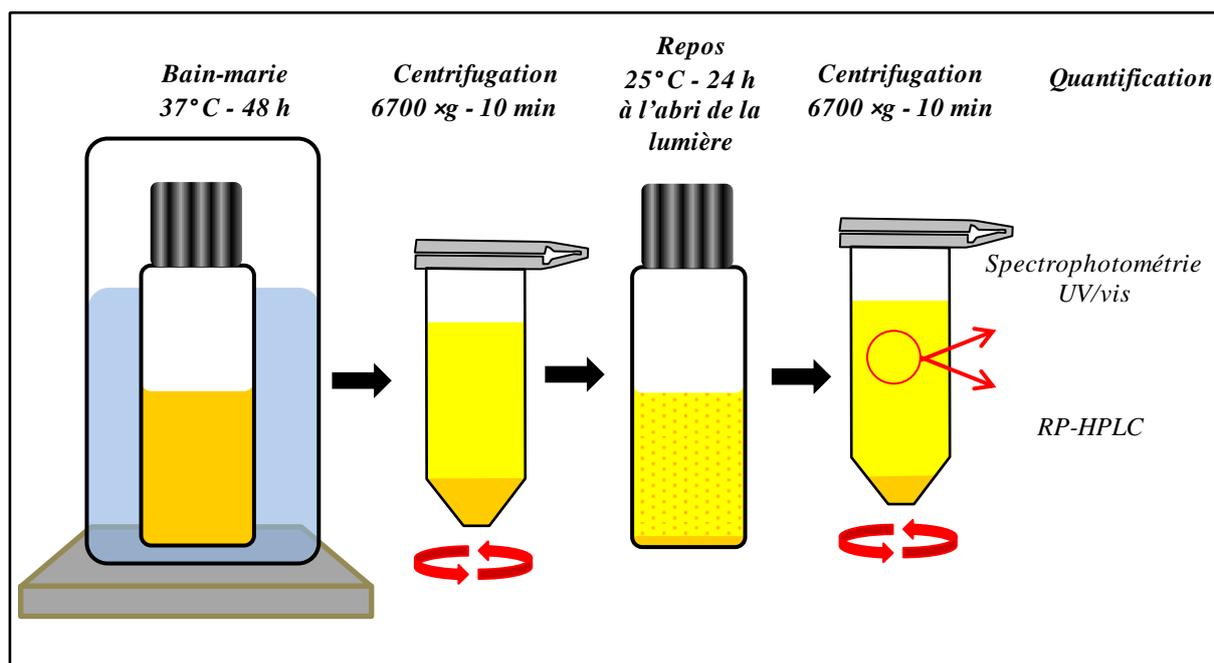


Figure 4 : Schéma représentant les étapes pour déterminer la solubilité de l'isotrétinoïne dans les différentes huiles.

3.3 Etude de la stabilité de l'isotrétinoïne

Suite aux résultats de solubilité, la stabilité de l'isotrétinoïne au cours de temps a été étudiée dans le Miglyol 812. Pour cela, des solutions d'isotrétinoïne dans le Miglyol 812 ont été préparées à une concentration de 200 µg.g⁻¹ en présence de 0,05 m/m% de l'hydroxytoluène butylé en tant qu'antioxydant, et stockées 30 jours à 25° C à l'abri de la lumière. L'analyse de la composition des échantillons d'isotrétinoïne a été réalisée par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) (Partie 3.8). Les

gammes d'étalonnage et les essais de solubilité et de stabilité ont été répétés trois fois et les résultats présentés sont des moyennes avec les écarts types.

3.4 Préparation des nanoémulsions

Les NEs ont été préparées dans les conditions optimales préalablement déterminées (Chapitre II), c'est-à-dire, 5 m/m% de phase huileuse (Miglyol 812), 95 m/m% de phase aqueuse (solution de β -lg à 1 m/m% dans le PBS à 10 mM, pH 7,0), avec une pression d'homogénéisation de 100 MPa et 4 cycles. Pour les NEs contenant l'isotrétinoïne, des solutions saturées d'isotrétinoïne dans le Miglyol 812 ont été préparées comme préalablement décrit (Partie 3.2) et, ensuite, utilisées en tant que phase huileuse. L'hydroxytoluène butylé a été ajouté à la phase huileuse en tant qu'antioxydant à une concentration de 0,05 m/m% de la masse finale de nanoémulsion. Pour les NEs contenant de la gomme xanthane, cette dernière a été ajoutée, sous forme de poudre, aux NEs préalablement préparées (2 h auparavant) à une concentration de 0,5 m/m% de la masse totale de nanoémulsion, et solubilisée par agitation magnétique pendant 2 h. Quatre types de NEs ont été préparés pour étudier l'effet de l'isotrétinoïne et/ou de la gomme xanthane comme indiqué dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Composition des NEs : (NE-R) la formulation de référence sans isotrétinoïne ni gomme xanthane; (NE-IT) nanoémulsion avec isotrétinoïne sans gomme xanthane; (NE-GX) nanoémulsion avec gomme xanthane sans isotrétinoïne; (NE-IT-GX) nanoémulsion avec isotrétinoïne et gomme xanthane.

Formulation	Concentration en isotrétinoïne (m/m%*)	Concentration en gomme xanthane (m/m%*)
NE-R	0	0
NE-IT	0,033	0
NE-GX	0	0,5
NE-IT-GX	0,033	0,5

* Pourcentage en masse par rapport à la masse totale de la nanoémulsion

3.5 Répartition de la protéine entre les différentes phases

La protéine libre c'est-à-dire non adsorbée à l'interface O/W, qui se trouve en excès dans la phase aqueuse, a été étudiée dans la formulation NE-R. Pour vérifier la présence et la conformation de cette portion de protéine, les deux phases de cette formulation ont été séparées, dans un premier temps, par ultracentrifugation (Beckman Optima LE-80K Ultra-Centrifuge) à 40 000 \times g pendant 2 h. La protéine qui se trouve dans les deux phases, phase aqueuse et phase émulsion concentrée, a été ensuite séparée par SDS-PAGE dans des conditions non-réductrices et réductrices comme décrit dans le Chapitre III - Part A (Partie 2.3.4). Les résultats de ces essais préliminaires nous ont ensuite permis de séparer et quantifier la protéine libre en excès dans la phase aqueuse et d'étudier son évolution au cours du temps aux jours 0, 3, 7, 15 et 30 (J0, J3, J7, J15 et J30) par une autre méthode plus rapide. Pour cela, les deux phases des NEs ont été séparées avec des filtres à centrifuger ayant un seuil de coupure de 100 kDa (Amicon Ultra-0,5, Membrane Ultracel-100, PMNL, Millipore, Allemagne). 0,5 mg des NEs ont été placés dans ces tubes et ensuite centrifugés avec une centrifugeuse MiniSpin[®] à 6700 \times g pendant 10 min. la protéine libre en excès dans la phase aqueuse a été quantifiée avec un spectrophotomètre UV/vis (Jasco, Japan) comme préalablement décrit (Chapitre II - Partie 2.2). La préparation des NEs a été répétées trois fois et la séparation des deux phases de chaque NEs par les filtres à centrifuger été répétées trois fois. Les résultats présentés sont des moyennes avec les écarts types de ces 9 essais.

3.6 Etude de l'efficacité d'encapsulation de l'isotrétinoïne

Pour déterminer l'efficacité d'encapsulation de l'isotrétinoïne, les NEs NE-IT ont été fractionnées avec des filtres à centrifuger ayant un seuil de coupure de 100 kDa et 3 kDa (Amicon Ultra-0,5, Membrane Ultracel-3/100, PMNL, Millipore, Allemagne) comme décrit sur la Figure 5. Dans un premier temps, les deux phases de la nanoémulsion ont été séparées par les filtres à 100 kDa comme préalablement décrit (Partie 3.5). La phase aqueuse a été, ensuite, séparée à son tour avec les filtres à 3 kDa qui retiennent les molécules de β -lg. Les centrifugations ont été effectuées avec une centrifugeuse MiniSpin[®] à 6700 \times g pendant

10 min. La quantité d'isotrétinoïne dans les différentes phases a été alors déterminée par la chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (Partie 3.8).

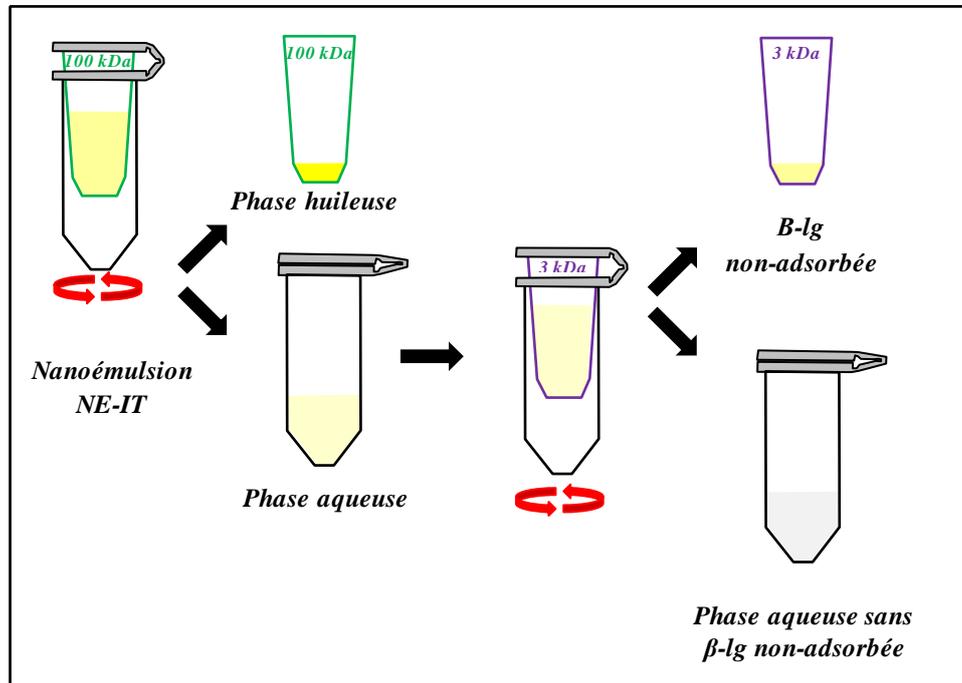


Figure 5 : Schéma représentant les différentes étapes pour fractionner les NEs NE-IT au moyen des filtres à centrifuger à 3 et 100 kDa.

3.7 Caractérisation des nanoémulsions et de leur stabilité

La viscosité des NEs a été mesurée en suivant le protocole indiqué dans le Chapitre II. La stabilité physique des NEs a été étudiée en temps réel après leur préparation à J0, J3, J7, J15 et J30 à l'aide d'un balayage optique avec un Turbiscan[®] classic MA2000 (Formulation SA, France) et par le suivi de l'évolution de la taille et du potentiel Zêta à l'aide du Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, U.K.) dont les protocoles sont décrits dans le Chapitre II.

3.8 Séparation et dosage de l'isotrétinoïne par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

Nous avons utilisé la technique RP-HPLC décrite dans la Pharmacopée Européenne (8^{ème} Ed., Monographie de l'isotrétinoïne) avec quelques modifications. La chaîne HPLC utilisée était composée d'une pompe (Waters 1525 Binary HPLC Pump), d'un injecteur (Waters 717 plus Autosampler) couplé à un dégazeur en ligne (Waters In Line Degasser AF), d'une colonne de gel de silice greffée octadécyle (US 0900 - N° Serie 100628 - Modulo - Cart QK Strategy 3 C18-2 150X3.5 mm - Interchim[®]), et un détecteur UV (Waters 2487, Dual λ Absorbance Detector). Le système d'acquisition de données était BREEZE (Waters Corporation). Les conditions trouvées, après l'étape d'optimisation, sont les suivantes : la phase mobile est composée d'acide acétique glacial, d'eau, et de méthanol (5:115:880 v/v/v), le débit est de 0,4 ml.min⁻¹, la longueur d'onde de détection est de 354 nm et le volume d'injection est de 10 μ l.

4 Résultats et discussion

4.1 Solubilité et stabilité de l'isotrétinoïne

Le Tableau 4 montre les résultats des gammes d'étalonnage réalisées au cours de ce travail par spectroscopie UV/vis et utilisées pour déterminer la solubilité de l'isotrétinoïne dans les trois huiles.

Les résultats de l'étude de la solubilité dans ces huiles sans antioxydant sont présentés dans la Figure 6. La solubilité de l'isotrétinoïne dans le Miglyol 812 est plus importante que celle dans l'huile d'amande douce et l'huile de germe de blé. Ces résultats sont en accord avec le travail de Nankervis et *al.* (1995 et 1996). Le pouvoir solubilisant des triglycérides pour les SAs hydrophobes est dépendant de leur teneur en groupements ester. Le Miglyol 812 est composé de triglycérides à chaînes moyennes (de l'acide caprique (C10:0) et de l'acide

caprylique (C8:0)) alors que l'huile d'amande douce et l'huile de germe de blé sont composées de triglycérides à chaînes longues (de l'acide palmitique (C16:0), l'acide oléique (C18:1) et de l'acide linoléique (C18:2)). Les triglycérides à chaînes moyennes possèdent une concentration en groupements ester plus importante que ceux à chaînes longues. Ils ont ainsi un pouvoir solubilisant plus important (Cao *et al.*, 2004).

Tableau 4 : Gammes d'étalonnage de l'isotrétinoïne obtenues par spectroscopie UV/vis dans les trois huiles.

Huile	λ_{\max} (nm)	Pente ($\mu\text{g}^{-1}.\text{ml}$)	Ordonné à l'origine (%)	Coefficient de corrélation	Gamme de linéarité ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
Miglyol 812	361	0,1248	0,0042	0,9998	0,25 - 10
Huile d'amande douce	378	0,0890	0,0109	0,9987	0,25 - 10
Huile de germe de blé	381	0,0787	0,0167	0,9964	0,50 - 10

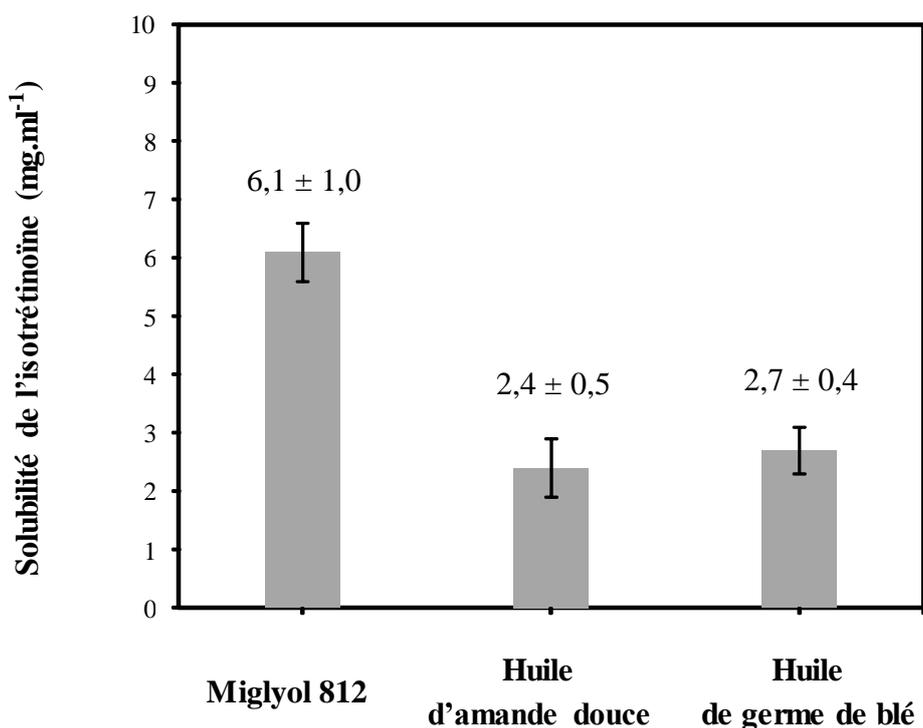


Figure 6 : Solubilité de l'isotrétinoïne dans les différentes huiles étudiées.

En prenant en compte la fraction massique de la phase huileuse dans les NEs (5 m/m%), les valeurs de la solubilité de l'isotrétinoïne dans ces trois huiles permettent d'obtenir des concentrations finales maximales en isotrétinoïne dans les NEs de $0,032 \pm 0,005$, $0,013 \pm 0,003$ et $0,015 \pm 0,002$ m/m% pour une phase huileuse composée de Miglyol 812, d'huile d'amande douce ou d'huile de germe de blé, respectivement. Les solutions saturées d'isotrétinoïne dans le Miglyol 812 ont été choisies en tant que phase huileuse pour la préparation des NEs car elles permettent d'obtenir la dose la plus élevée d'isotrétinoïne. Afin de pouvoir doser plus précisément l'isotrétinoïne et la séparer de ses produits de dégradation, nous avons mis en œuvre une technique de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC). Le Tableau 5 présente les gammes d'étalonnage établies au cours de ce travail par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (en présence du l'hydroxytoluène butylé en tant qu'antioxydant). Ainsi la valeur de solubilité de l'isotrétinoïne dans le Miglyol 812 déterminée par RP-HPLC est de $6,3 \pm 0,4$ mg.ml⁻¹ contre $6,1 \pm 1,0$ mg.ml⁻¹ par spectrophotométrie UV/vis. On a donc un bon accord entre ces deux techniques.

Tableau 5 : Gammes d'étalonnage de l'isotrétinoïne dans le méthanol et le Miglyol 812 par RP-HPLC.

Solvant	λ_{\max} (nm)	Pente ($\mu\text{g}^{-1}.\text{ml}$)	Ordonnée à l'origine (%)	Coefficient de corrélation	Gamme de linéarité ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
Méthanol 100%	354	135636	9600	0,9997	0,25 - 50
Miglyol 812	354	120380	49619	0,9992	0,25 - 50

La technique de RP-HPLC a également permis de vérifier la composition de l'échantillon d'isotrétinoïne utilisée. La Figure 7 montre les chromatogrammes RP-HPLC de l'isotrétinoïne dans le méthanol et dans le Miglyol 812 à J3 (fin de préparation de la solution – Figure 4) et à J30. En raison de la solubilisation facile et rapide de l'isotrétinoïne dans le méthanol en comparaison avec le Miglyol 812, des solutions d'isotrétinoïne dans le méthanol préparées directement avant d'effectuer l'injection ont été utilisées comme standard. En outre, une solution standard de trétinoïne dans le méthanol a été préparée et injectée (chromatogramme non montré). Le pic majeur qui apparaît au temps de rétention de 9,7 min sur le chromatogramme dans le méthanol (Figure 7(A)) correspond à l'isotrétinoïne.

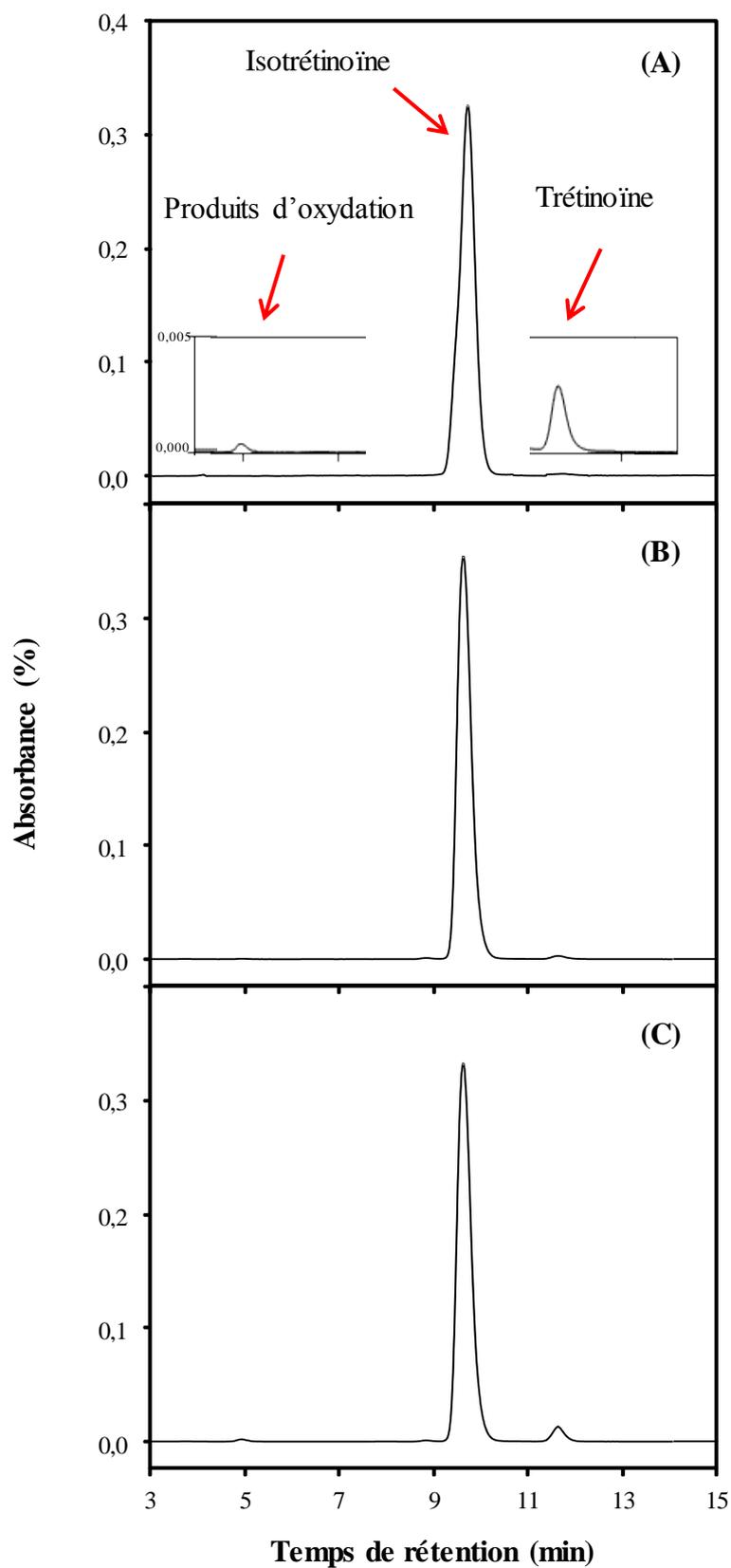


Figure 7 : Chromatogrammes RP-HPLC de la solution de l'isotrétinoïne dans (A) le méthanol, (B) le Miglyol 812 à J3, (C) le Miglyol 812 à J30 du stockage à 25° C, à l'abri de la lumière.

Le chromatogramme montre aussi un petit pic au temps de rétention de 11,7 min (correspondant à la trétinoïne) et d'autres petits pics aux temps de rétention autour de 5 min correspondant probablement aux produits d'oxydation plus hydrophiles que les isomères de l'acide rétinoïque. Les solutions d'isotrétinoïne dans le Miglyol 812 (à J3 et J30) présentent des chromatogrammes ressemblant à celui dans le méthanol avec une différence dans les quantités de chaque composant. Le Tableau 6 rassemble les pourcentages de ces composants dans la solution standard et la solution de Miglyol 812 aux deux temps d'étude (J3 et J30). Ces résultats indiquent que l'isotrétinoïne n'a subi aucun type de dégradation pendant la préparation de la solution huileuse et que seulement $\approx 5\%$ ont été convertis en trétinoïne pendant les 30 jours de stockage (à 25°C, à l'abri de la lumière). La teneur en produits d'oxydation ne montre pas de changement significatif pendant cette durée en raison de la présence de l'antioxydant et du faible pouvoir oxydatif du Miglyol 812 comme trouvé lors de la mesure de son indice de peroxyde (Chapitre II).

Tableau 6 : Composition de l'échantillon de l'isotrétinoïne dans la solution de méthanol et la solution de Miglyol 812, déterminée par RP-HPLC.

Solvant	Isotrétinoïne (%)	Trétinoïne (%)	Produits d'oxydation (%)
Méthanol (t = 0 jours)	99,2 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Miglyol 812 (t = 3 jours)	99,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1
Miglyol 812 (t = 30 jours)	94,1 ± 0,5	5,6 ± 0,5	0,4 ± 0,2

4.2 Caractérisation des nanoémulsions

Quatre formulations de NEs ont été étudiées dans ce Chapitre (voir Tableau 3). La formulation de référence (NE-R), qui est la formulation optimale trouvée au cours du travail de cette thèse (Chapitre II), a un aspect, une couleur et une texture similaires à ceux du lait. La gomme xanthane a été donc ajoutée à cette formulation en tant qu'agent épaississant afin d'obtenir une formulation avec une texture de crème plus adaptée à l'administration cutanée. La gomme xanthane est un polysaccharide de masse molaire élevée ($2 \cdot 10^6$ à $20 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹), produit par la fermentation bactérienne des glucines *via Xanthomonas campestris* (Palaniraj et Jayaraman, 2011). La gomme xanthane a été sélectionnée comme agent épaississant pour

deux raisons principales : l'absence d'interaction avec la β -lg à pH neutre où les deux polymères sont chargés négativement (Laneville et *al.*, 2000), et l'absence d'activité interfaciale à l'interface O/W en présence de β -lg (Bouyer et *al.*, 2013). La gomme xanthane a été ajoutée à une concentration de 0,5 m/m% à la nanoémulsion préalablement préparée. Cette concentration est supérieure à la concentration d'enchevêtrement du polysaccharide ($C_e \approx 0,085$ m/m%) (Papagiannopoulos et *al.*, 2016).

La Figure 8(A) montre la taille de gouttelettes des NEs le jour de la préparation des émulsions. La taille des gouttelettes de la formulation NE-R est de 201 ± 7 nm avec une distribution de taille étroite ($PDI = 0,133 \pm 0,062$). Cette taille n'a pas été modifiée significativement par l'ajout de gomme xanthane. La taille des gouttelettes de la formulation NE-GX est de 206 ± 16 nm et le PDI est de $0,219 \pm 0,039$. Le potentiel Zêta des gouttelettes de la NE-R est de -51 ± 2 mV (Figure 8(B)). De même, cette valeur n'a pas été significativement influencée par la présence de la gomme xanthane (potentiel Zêta = -53 ± 4 mV pour NE - GX).

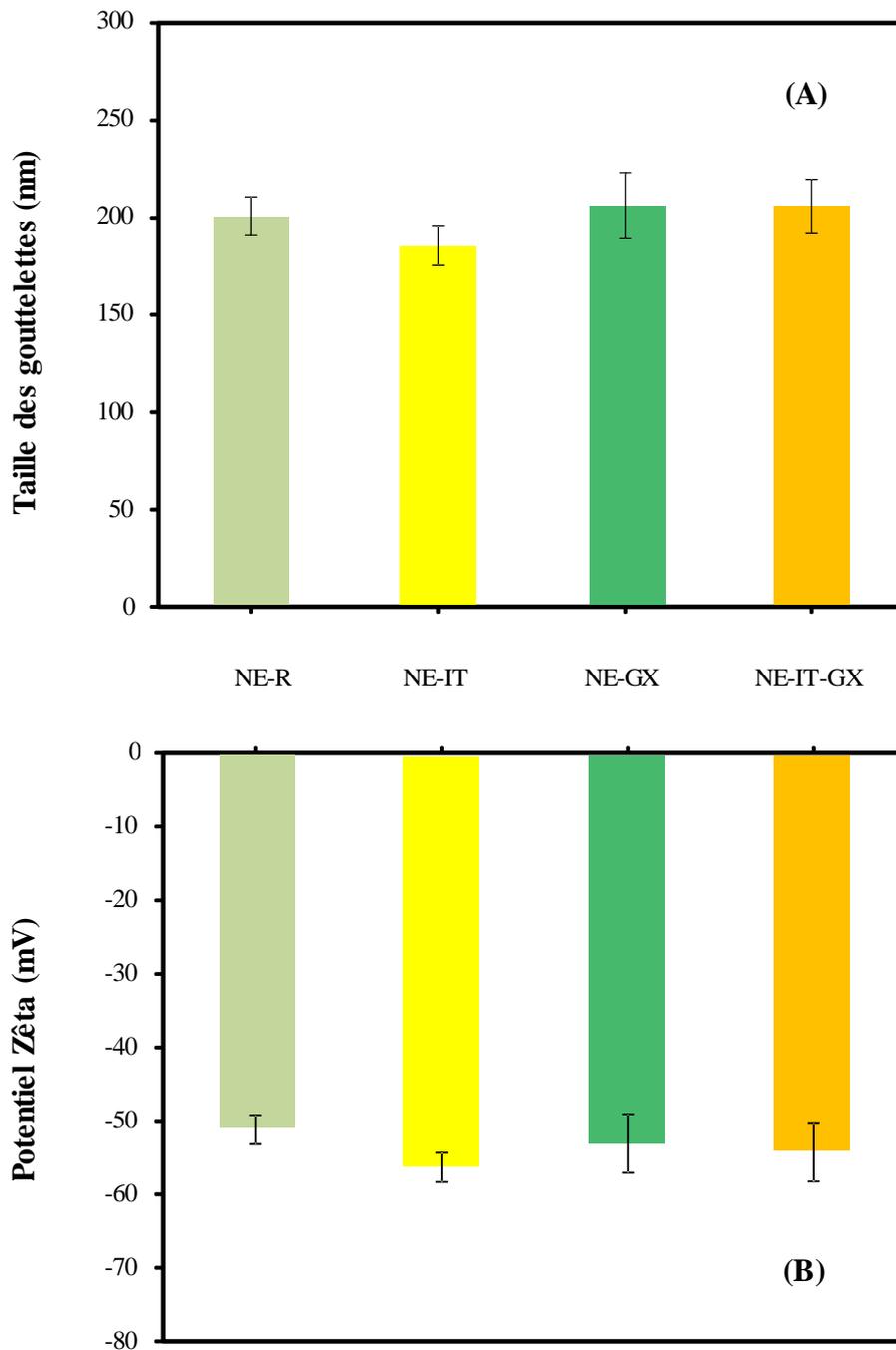


Figure 8 : Taille (A) et potentiel Zêta (B) des gouttelettes des NEs pour NE-R (nanoémulsion de référence), NE-IT (nanoémulsion contenant 0,033 m/m% d'isotrétinoïne), NE-GX (nanoémulsion contenant 0,5 m/m% de gomme xanthane), NE-IT-GX (nanoémulsion contenant 0,033 m/m% d'isotrétinoïne et 0,5 m/m% de gomme xanthane) à J0.

La Figure 9 présente les rhéogrammes des formulations NE-R et NE-GX sur une gamme de cisaillement de 10^2 à 10^3 s^{-1} qui correspond aux valeurs de cisaillement mises en jeu lors d'une application cutanée (Garg et *al.*, 2002). La NE-R montre un comportement

rhéofluidifiant avec de faibles valeurs de viscosité ($2,01 \pm 0,1$ mPa.s à un taux de cisaillement de 100 s^{-1}) proche de celle de l'eau. La présence de 0,5 m/m% de gomme xanthane a donné à la formulation NE-GX une texture crémeuse. Cette formulation montre un comportement rhéofluidifiant avec des valeurs de viscosité largement plus importantes que celles de la NE-R ($74,7 \pm 0,1$ mPa.s à un taux de cisaillement de 100 s^{-1}).

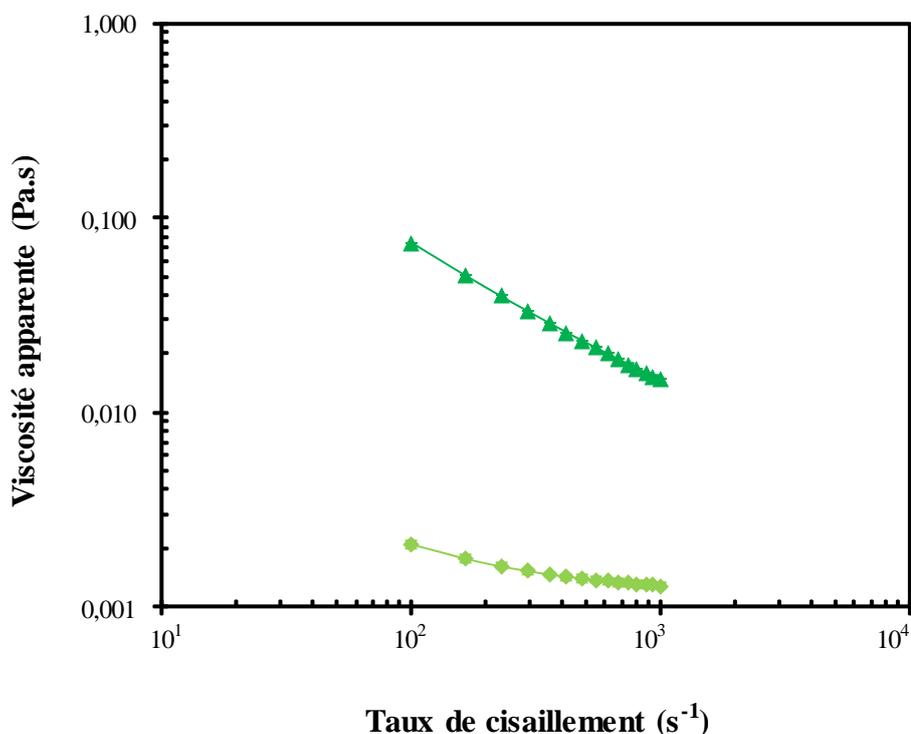


Figure 9 : Rhéogrammes des formulations (◆) NE-R (nanoémulsion de référence) et (▲) NE-GX (nanoémulsion contenant 0,5 m/m% de gomme xanthane),

L'isotrétinoïne a été ajoutée à la phase huileuse avant de préparer les NEs NE-IT et NE-IT-GX. Les mesures de la taille et du potentiel Zêta des gouttelettes de ces NEs montrent que la présence de l'isotrétinoïne n'a pas altéré la formulation (Figures 8(A) et 8(B)). Les NE-IT et NE-IT-GX ont des aspects similaires à ceux des NE-R et NE-GX respectivement, à l'exception d'une coloration jaune pâle du fait de la présence de l'isotrétinoïne.

4.3 Répartition de la protéine entre les différentes phases des nanoémulsions

En raison du manque de connaissance de la taille des agrégats de la β -lg en excès dans la phase aqueuse des NEs, la séparation des deux phases n'a pas été possible d'emblée par filtration. Nous avons alors séparé les deux phases, dans un premier temps, par ultracentrifugation. Les conditions de l'ultracentrifugation ont été optimisées afin d'avoir une séparation complète entre les deux phases (jusqu'à obtenir une phase aqueuse transparente en bas du tube et une fine couche d'émulsion concentrée sur la surface de l'échantion). Les conditions de l'ultracentrifugation ont été également vérifiées pour ne pas déstabiliser les gouttelettes des NEs et ne pas altérer largement la répartition de la protéine entre les deux phases. La taille et la distribution de taille des gouttelettes mesurées par Nanosizer avant d'effectuer l'ultracentrifugation et celles de la nanoémulsion reconstituée par dilution de la couche d'émulsion concentrée obtenue à la fin de l'ultracentrifugation ont été identiques.

La conformation de la β -lg dans ces deux phases a été ensuite étudiée par SDS-PAGE. La Figure 10 montre les profils de la β -lg dans les deux phases de la formulation NE-R à J0 obtenus dans des conditions non-réductrices (A) et réductrices (B). La lecture de ces deux gels avec un densitomètre a montré que 85 % et 15 % de la quantité totale de β -lg ajoutée aux NEs se trouvent respectivement dans la phase émulsion concentrée et la phase aqueuse.

Nous nous sommes intéressés à la conformation de la β -lg dans la phase aqueuse pour choisir le seuil de coupure du filtre à utiliser pour séparer les deux phases afin d'optimiser le temps pour la suite de cette étude. La β -lg libre dans la phase aqueuse se trouve principalement sous forme de monomères et de dimères de masses molaires respectives de 18 350 et 36 700 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($\approx 50\%$ et $\approx 40\%$ respectivement). Les différentes populations d'agrégats de β -lg ont des masses molaires inférieures à 100 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. La comparaison des bandes obtenues avec des conditions non réductrices et réductrices montre l'implication des liaisons disulfure dans les différents oligomères formés.

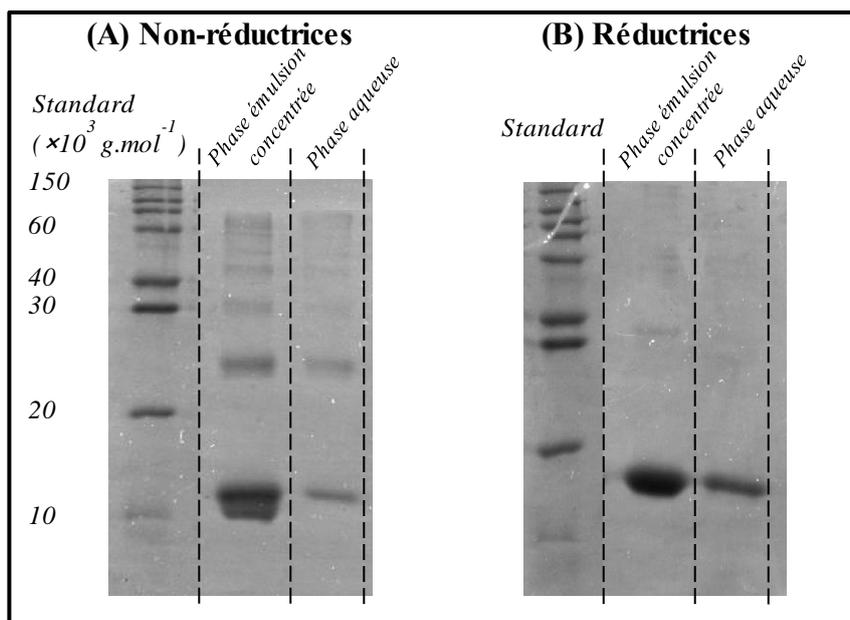


Figure 10 : Profils de SDS-PAGE de la β -lg obtenus avec (A) des conditions non réductrices et (B) des conditions réductrices dans les deux phases de la nanoémulsion NE-R (phase aqueuse : 95 m/m% de la solution de β -lg à une concentration de 1 m/m%, phase huileuse : 5 m/m% du Miglyol 812, conditions opératoires : 4 cycles d'homogénéisation à 100 MPa) à J0.

Les résultats précédents nous ont permis de séparer et quantifier la protéine en excès et d'étudier son évolution au cours du temps avec des filtres à centrifuger ayant un seuil de coupure de 100 kDa. La quantité de β -lg dans la phase aqueuse a été mesurée par spectrophotométrie UV/vis tandis que la quantité de protéine dans la phase d'émulsion concentrée a été calculée par différence entre la quantité totale de protéine dans la nanoémulsion et celle trouvée dans la phase aqueuse.

La Figure 11 montre les pourcentages de protéine dans les deux phases de la formulation NE-R au cours du temps par rapport à la quantité totale de protéine ajoutée aux NEs. Les résultats obtenus montrent que, à J0, $90 \pm 5\%$ et $10 \pm 5\%$ de la quantité totale de la protéine ajoutée aux NEs se sont trouvées respectivement dans la phase d'émulsion concentrée et en excès dans la phase aqueuse, en bon accord avec les résultats obtenus par ultracentrifugation/SDS-PAGE. Les quantités de la protéine dans ces deux phases sont constantes au cours du temps.

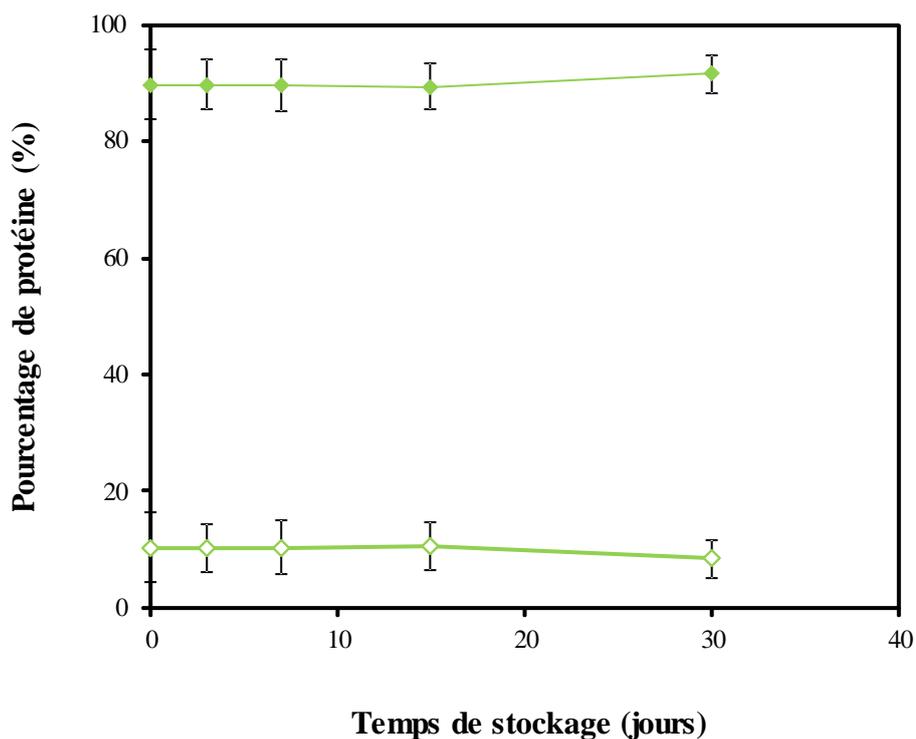


Figure 11 : Evolution au cours du temps du pourcentage de β -lg (◆) dans la phase d'émulsion concentrée et (◇) non adsorbée qui se trouve en excès dans la phase aqueuse pour la nanoémulsion NE-R (phase aqueuse : 95 m/m% de la solution de β -lg à une concentration de 1 m/m%, phase huileuse : 5 m/m% du Miglyol 812, conditions opératoires : 4 cycles d'homogénéisation à 100 MPa).

4.4 Efficacité d'encapsulation de l'isotrétinoïne

Le dosage de l'isotrétinoïne dans les différentes fractions de la nanoémulsion NE-IT (phase huileuse, phase aqueuse complète, phase aqueuse sans β -lg) a été réalisé 24 h après la préparation de celle-ci. La Figure 12 montre les chromatogrammes de ces différentes fractions. La phase huileuse contient près de 90 % de la quantité de SA ajoutée initialement et se trouve alors sous forme d'isotrétinoïne ($\approx 60\%$) et de trétinoïne ($\approx 40\%$). Le reste de la SA ajoutée ($\approx 10\%$) se trouve dans la phase aqueuse. La dégradation de l'isotrétinoïne dans la phase aqueuse est plus importante que celle dans la phase huileuse (75 % de l'isotrétinoïne existant dans la phase aqueuse a été dégradé). Le seuil de coupure du filtre utilisé pour séparer la β -lg de la phase aqueuse est de 3 kDa et permet alors le passage de l'isotrétinoïne dont la masse molaire est faible ($300,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

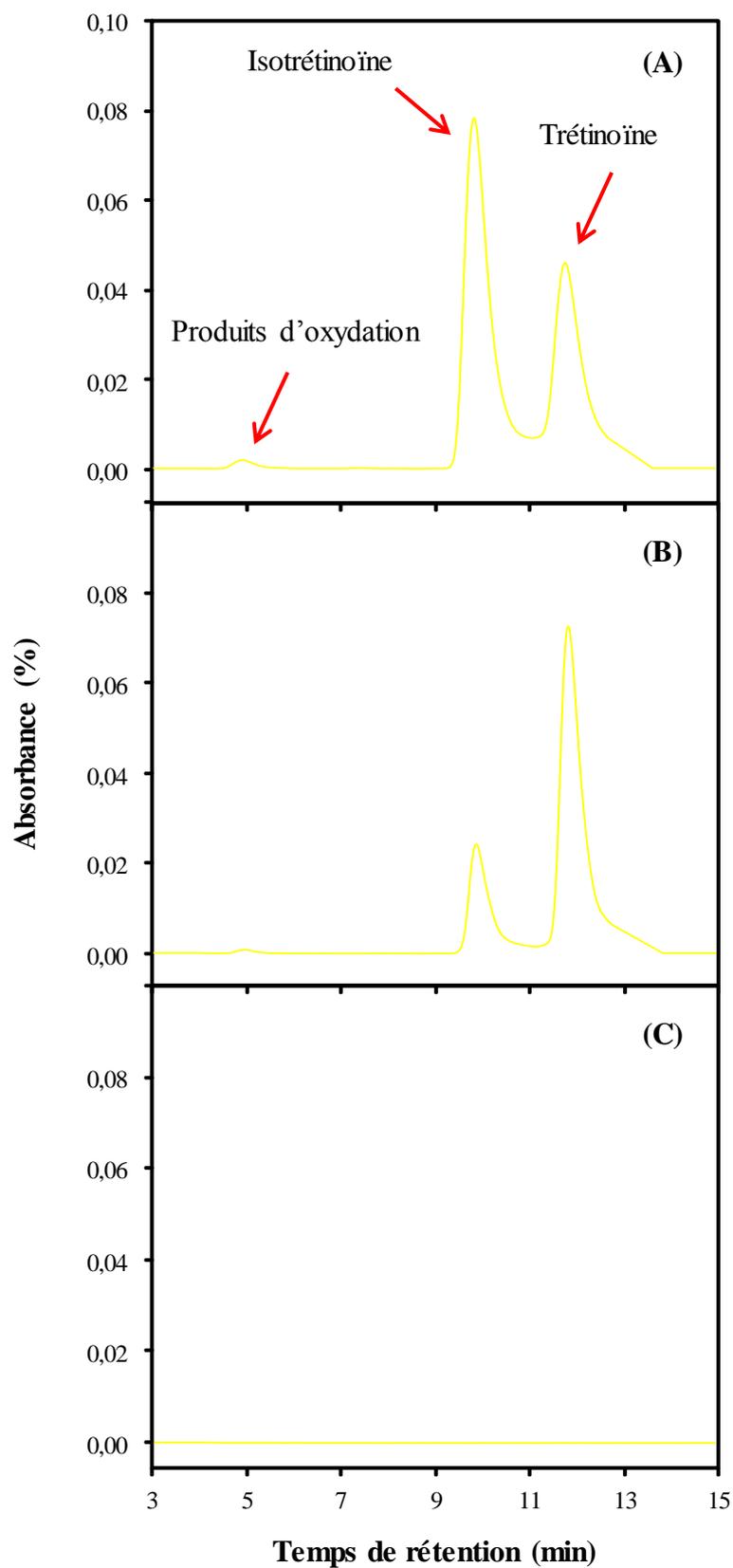


Figure 12 : Chromatogrammes de RP-HPLC des différentes fractions de la nanoémulsion NE-IT : (A) phase huileuse, (B) phase aqueuse complète, (C) phase aqueuse sans β -lg libre.

Le chromatogramme de la phase aqueuse, après avoir enlevé la β -lg non adsorbée à l'interface huile/phase aqueuse, ne contient plus aucune quantité détectable d'isotrétinoïne ou de ces produits de dégradation. Cela indique que toute la quantité de l'isotrétinoïne trouvée dans la phase aqueuse a été associée avec la protéine en excès dans la phase aqueuse. La capacité de la β -lg à lier les rétinoïdes a été montrée dans plusieurs études (Dufour et Haertlé, 1991; Zsila et *al.*, 2002). Les rétinoïdes se lient par des liaisons non-covalentes au cœur hydrophobe de la β -lg. De plus, la β -lg stimule l'isomérisation des acides rétinoïques (Livrea et Packer, 1993). Ce rôle de la β -lg et la présence de l'isotrétinoïne en solution aqueuse pourraient expliquer sa forte isomérisation vers la trétinoïne dans la phase aqueuse par rapport à la phase huileuse.

4.5 Stabilité physique des nanoémulsions

Les Figures 13(A) et 13(B) montrent l'évolution de la taille des gouttelettes et de leur potentiel Zêta respectivement pendant les 30 jours de stockage pour les quatre formulations. On observe que les quatre formulations ne montrent pas de variations significatives pendant cette période de stockage.

La Figure 14 présente l'évolution de l'intensité rétrodiffusée au cours du temps pour les quatre formulations obtenues par le suivi des NEs au Turbiscan[®]. Les formulations ne contenant pas de gomme xanthane (NE-R et NE-IT) montrent la présence progressive d'un crémage léger sans différence significative entre ces deux formulations (Figures 14(A) et 14(B)). Cela indique que la présence de l'isotrétinoïne n'a aucune influence sur la stabilité physique de la nanoémulsion.

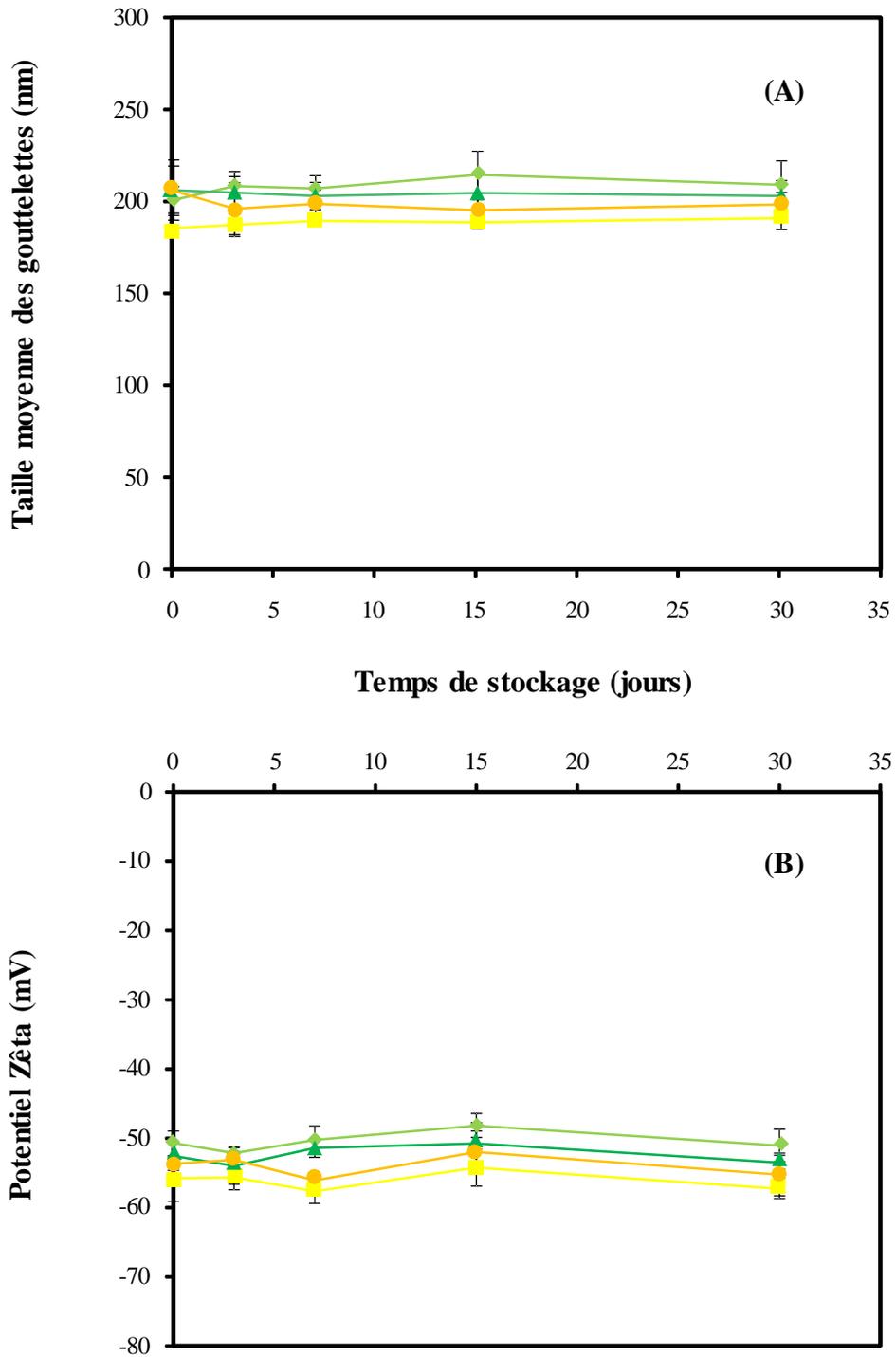


Figure 13 : Evolution de la taille (A) et du potentiel Zêta (B) des gouttelettes des NEs au cours du temps pour les formulations : (◆) NE-R : nanoémulsion de référence, (■) NE-IT : nanoémulsion contenant 0,033 m/m% d'isotrétinoïne, (▲) NE-GX : nanoémulsion contenant 0,5 m/m% de gomme xanthane, (●) NE-IT-GX : nanoémulsion contenant 0,033 m/m% d'isotrétinoïne et 0,5 m/m% de gomme xanthane.

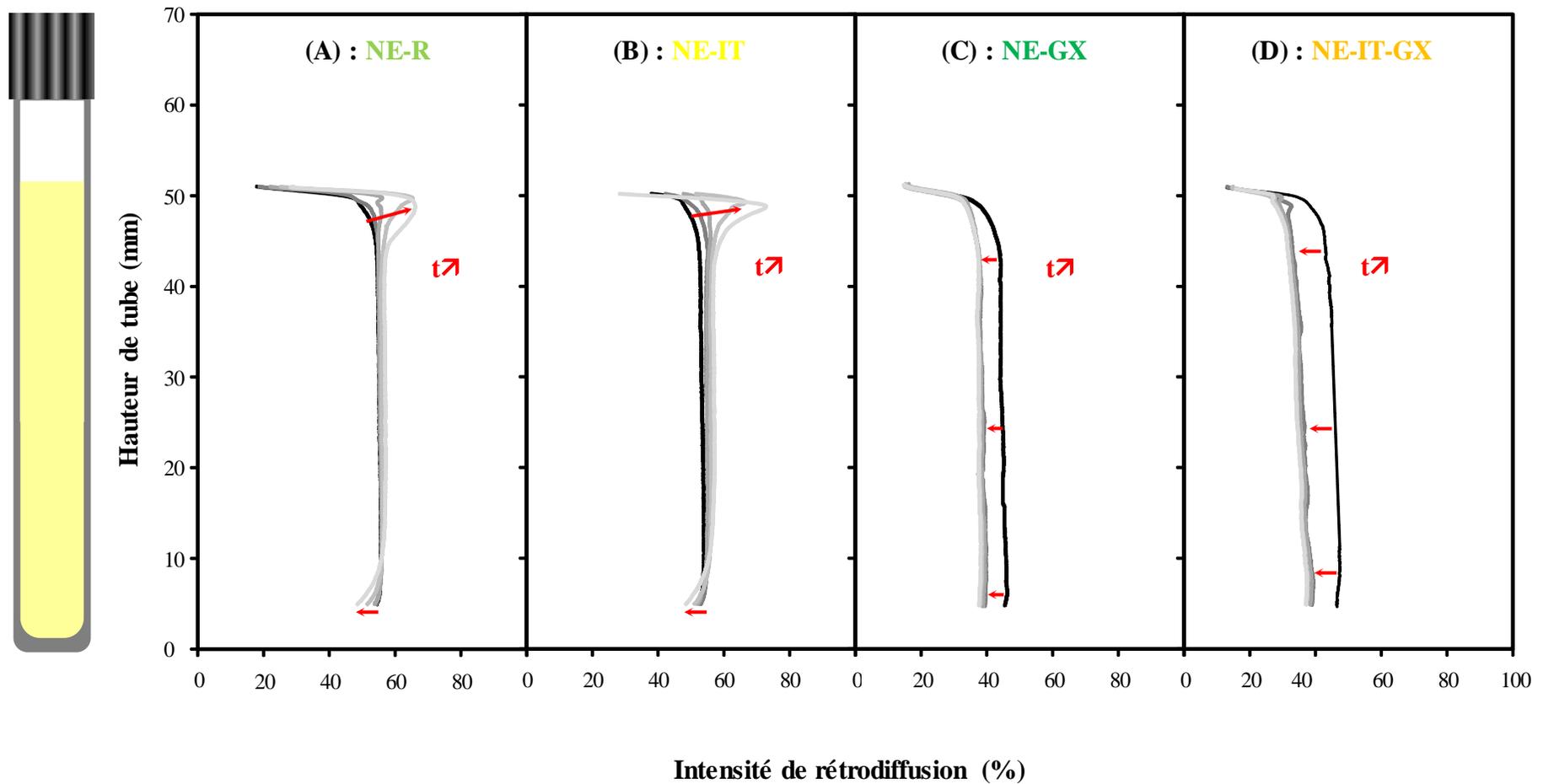


Figure 14 : Evolution de l'intensité rétrodiffusée au cours du temps obtenue par analyse au Turbiscan® à (—) J0, (—) J3, (—) J7, (—) J15, (—) J30 ; pour (A) NE-R : nanoémulsion de référence, (B) NE-IT : nanoémulsion contenant 0,033 m/m% d'isotrétinoïne, (C) NE-GX : nanoémulsion contenant 0,5 m/m% de gomme xanthane, (D) NE-IT-GX : nanoémulsion contenant 0,033 m/m% d'isotrétinoïne et 0,5 m/m% de gomme xanthane.

La gomme xanthane a été utilisée principalement en raison de son caractère épaississant de la phase continue, et par conséquent pour limiter la migration des gouttelettes et conférer une texture crémeuse aux formulations. En présence de cette gomme, les formulations NE-GX et NE-IT-GX (Figures 14(C) et 14(D)) ne montrent aucun signe de crémage grâce au rôle stabilisant exercé par cette gomme. L'augmentation de la viscosité a permis une grande réduction de la vitesse de migration de gouttelettes vers le haut de l'échantillon, selon la loi de Stokes. Une autre explication qui peut être présentée est la formation d'un réseau de longues chaînes de polysaccharide de façon à ce que la migration de gouttelettes soit complètement inhibée puisque les systèmes à base de gomme xanthane possèdent une contrainte seuil (*Yield stress*). Cependant, une réduction de l'intensité de la lumière rétrodiffusée a été détectée entre J0 et J3 sur toute la longueur du tube. Cela indique vraisemblablement une augmentation de taille des objets dispersés (Mengual et *al.*, 1999). En revanche, la mesure de taille des gouttelettes par le Nanosizer n'a montré aucune augmentation de taille. Cela signifie que les phénomènes de déstabilisations irréversibles (la coalescence et le mûrissement d'Ostwald) ne sont pas présents. Cependant, une floculation réversible des gouttelettes, induite par la présence de la gomme xanthane, peut être la raison de l'augmentation de taille des objets observée par le Turbiscan[®]. Ce phénomène n'a pas été détecté par le Nanosizer en raison de la dilution effectuée sur les échantillons avant chaque mesure et, par conséquent, la dissociation des floes. En raison de la charge négative de la β -Ig et de la gomme xanthane à pH 7, la floculation par pontage ou par des interactions non-covalentes est peu probable. En revanche, on peut avoir une floculation par déplétion en raison de la présence de protéine libre dans la phase aqueuse non adsorbée à l'interface O/W et de gomme xanthane (Ye et *al.*, 2004; Zhang et Liu, 2011). Il est important de noter que l'intensité rétrodiffusée dans la hauteur intermédiaire de l'échantillon à J0 dans les formulations contenant la gomme xanthane est moins importante que celle sans la gomme ($\approx 45\%$ et $\approx 55\%$ avec et sans gomme xanthane, respectivement). Cela pourrait signifier probablement que la floculation s'est produite immédiatement après l'ajout de la gomme xanthane. Une autre possibilité est que cette différence d'intensité rétrodiffusée provient de la différence de l'indice de réfraction de la phase aqueuse en présence et en absence de gomme xanthane.

5 Conclusion

La solubilité de l'isotrétinoïne dans le Miglyol 812 est plus importante que celle dans les triglycérides à longue chaîne. Cependant, cette solubilité reste relativement modérée et constitue un facteur limitant de l'encapsulation. Les NEs développées, qui contiennent 5 m/m% de Miglyol 812 en tant que phase huileuse, sont alors capables d'encapsuler jusqu'à 0,033 m/m% d'isotrétinoïne. Cela représente 66 % de la concentration du gel commercial. Il sera possible d'obtenir une concentration finale équivalente à la concentration dans les produits commercialisés par l'augmentation de la fraction massique de la phase huileuse jusqu'à 7,6 m/m%. Dans ce cas, une optimisation de la concentration de la β -lg dans la phase aqueuse sera nécessaire ainsi qu'une vérification de la stabilité du nouveau système.

Une faible quantité d'isotrétinoïne se trouve dans la phase aqueuse associée avec la β -lg non adsorbée. La photo-isomérisation constitue le mécanisme de déstabilisation chimique de la SA encapsulée dans ces NEs. Une quantité importante d'isotrétinoïne subit une isomérisation vers la trétinoïne principalement, qui est aussi une SA efficace contre l'acné mais moins que l'isotrétinoïne (Williams et *al.*, 2012). D'un autre côté, l'encapsulation de l'isotrétinoïne n'a aucun effet significatif sur la taille et la charge des gouttelettes, ni sur la stabilité physique du système. La présence de gomme xanthane a permis d'améliorer la stabilité de ce système contre le crémage par l'augmentation de la viscosité de la phase aqueuse et la formation d'un réseau cohérent de polysaccharide.

Il conviendra enfin d'évaluer le passage cutané de l'isotrétinoïne à partir de ce système par la méthode des cellules de Franz et de la comparer à celui du gel commercial et d'étudier l'efficacité thérapeutique pour l'acné.

Références

- Achermann, Y., Goldstein, E. J. C., Coenye, T., Shirtliff, M. E., 2014. Propionibacterium Acnes: From Commensal to Opportunistic Biofilm Associated Implant Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 27(3), 419-440.

- Adebamowo, C. A., Spiegelman, D., Berkey, C. S., Danby, F. W., Rockett, H. H., Colditz, G. A., Willett, W. C., Holmes, M. D., 2008. Milk Consumption and Acne in Teenaged Boys. *Journal of the American Academy of Dermatology* 58, 787-793.
- Baptiste, C. G., Battista, M. C., Trottier, A., Baillargeon, J. P., 2010. Insulin and Hyperandrogenism in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 122(1-3), 42-52.
- Bettoni, C. C., Felippi, C. C., de Andrade, C., Raffin, R. P., Jager, A., Guterres, S. S., Costal, T. D., 2012. Isotretinoin-Loaded Nanocapsules: Stability and Cutaneous Penetration by Tape Stripping in Human and Pig Skin. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 8(2), 258-271.
- Borghini, A., Mantovani, L., Minghetti, S., Virgili, A., Bettoli, V., 2009. Acute Acne Flare Following Isotretinoin Administration: Potential Protective Role of Low Starting Dose. *Dermatology* 218, 178-180.
- Boudou, P., Soliman, H., Chivot, M., Vilette, J. M., Vexiau, P., Belanger, A., Fiet, J., 1995. Effect of Oral Isotretinoin Treatment on Skin Androgen Receptor Levels in Male Acneic Patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80(4), 1158-1161.
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Huang, N., Rosilio, V., Agnely, F., 2013. β -Lactoglobulin, Gum Arabic, and Xanthan Gum for Emulsifying Sweet almond Oil: Formulation and Stabilization Mechanisms of Pharmaceutical Emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 433, 77- 87.
- Bradford, L. G., Montes, L. F., 1974. Topical Application of Vitamin A Acid in Acne Vulgaris. *Southern Medical Journal* 67, 683-687.
- Brazzell, R. K., Colburn, W. A., 1982 April. Pharmacokinetics of the Retinoids Isotretinoin and Etretinate. A comparative Review. *Journal of the American Academy of Dermatology* (4 Pt 2 Suppl), 643-651.
- Brazzell, R. K., Vane, F. M., Ehmann, C. W., Colburn, W. A., 1983. Pharmacokinetics of Isotretinoin During Repetitive Dosing to Patients. *European Journal of Clinical Pharmacology* (5), 695-702.
- Brown, S. K., Shalita A. R., 1998. Acne Vulgaris. *Lancet* 351, 1871-1876.
- Cao, Y., Marra, M., Anderson, B. D., 2004. Predictive Relationships for the Effects of Triglyceride Ester Concentration and Water Uptake on Solubility and Partitioning of Small Molecules Into Lipid Vehicles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93, 2768-2779.
- Chaiyasit, W., Elias, R. J., McClements, D. J., Decker, E. A., 2007. Role of Physical Structures in Bulk Oils on Lipid Oxidation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47, 299-317.

- Chalker, D. K., Leshner, J. L., Smith, J. G., Klauda, H. C., Pochi, P. E., Jacoby, W. S., Yonkosky, D. M., Voorhees, J. J., Ellis, C. N., Matsuda-John, S., Shalita, A. R., Smith, E. B., Raimer, S. S., Knox J. M., Kantor, II, 1987. Efficacy of Topical Isotretinoin 0.05% Gel in Acne Vulgaris: Results of a Multicenter, Double-Blind Investigation. *Journal of the American Academy of Dermatology* 17(2), 251-254.
- Chavda, H., Patel, J., Chavada, G., Dave, S., Patel, A., Patel, C., 2013. Self-Nanoemulsifying Powder of Isotretinoin: Preparation and Characterization. *Journal of Powder Technology* 2013, 1-9.
- Chen, W. C., Thiboutot, D., Zouboulis, C. C., 2002. Cutaneous Androgen Metabolism: Basic Research and Clinical Perspectives. *Journal of Investigative Dermatology* 119(5), 992-1007.
- Chen, W., Obermayer-Pietsch, B., Hong, J. B., Melnik, B. C., Yamasaki, O., Dessinioti, C., Ju, Q., Liakou, A. I., Al-Khuzaei, S., Katsambas, A., Ring, J., Zouboulis, C. C., 2011. Acne-Associated Syndromes: Models for Better Understanding of Acne Pathogenesis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 25, 637-646.
- Cheng, C. E., Irwin, B., Mauriello, D., Liang, L., Pappert, A., Kimball, A. B., 2010. Self-Reported Acne Severity, Treatment, and Belief Patterns across Multiple Racial and Ethnic Groups in Adolescent Students. *Pediatric Dermatology* 27(5), 446-452.
- Cogen, A. L., Nizet, V., Gallo, R. L., 2008. Skin Microbiota: a Source of Disease or Defence ?. *British Journal of Dermatology* 158, 442-455.
- Colburn, W. A., Gibson, D. M., Wiens, R. E., Hanigan, J. J., 1983. Food Increases the Bioavailability of Isotretinoin. *The Journal of Clinical Pharmacology* 23, 534-539.
- Contassot, E., French, L. E., 2014. New Insights Into Acne Pathogenesis: Propionibacterium Acnes Activates the Inflammasome. *Journal of Investigative Dermatology* 134, 310-313.
- Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I., Knight, R., 2009. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science Mag* 326, 1694-1697.
- Cunliffe, W. J., Glass, D., Goode, K., Stables, G.I., Boorman, G. C., 2001. A Double-Blind Investigation of the Potential Systemic Absorption of Isotretinoin, when Combined with Chemical Sunscreens, Following Topical Application to Patients with Widespread Acne of the Face and Trunk. *Acta Dermato-Venereologica* 81(1), 14-17.
- Dalziel, K., Barton, S., Marks, R., 1987. The Effects of Isotretinoin on Follicular and Sebaceous Gland Differentiation. *British Journal of Dermatology* 117, 317-323.
- Davidovici, B. B., Wolf, R., 2010. The Role of Diet in Acne: Facts and Controversies. *Clinics in Dermatology* 28, 12-16.
- Dawson, A. L., Dellavalle, R. P., 2013. Acne Vulgaris. *British Medical Journal*. 346, 1-7.

- Del Rosso, J. Q., 2012. Face to Face with Oral Isotretinoin - A Closer Look at the Spectrum of Therapeutic Outcomes and Why Some Patients Need Repeated Courses. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* 5(11), 17-24.
- di Masi, A., Leboffè, L., De Marinis, E., Pagano, F., Cicconi, L., Rochette-Egly, C., Lo-Coco, F., Ascenzi, P., Nervi, C., 2015. Retinoic Acid Receptors: from Molecular Mechanisms to Cancer Therapy. *Molecular Aspects of Medicine* 41, 1-115.
- Dollé, P., Ruberte, E., Leroy, P., Morriss-Kay, G., Chambon, P., 1990. Retinoic Acid Receptors and Cellular Retinoid Binding Proteins. *Development* 110, 1133-1151.
- Downing, D. T., Stewart, M. H., Wertz, P. W., Strauss, S., 1986. Essential Fatty Acids and Acne. *Journal of the American Academy of Dermatology* 14, 221-225.
- Dufour, E., Haertlé, T., 1991. Binding of Retinoids and β -Carotene to β -Lactoglobulin. Influence of Protein Modifications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1079(3), 316-320.
- Durand, A., Bun, H., Vienne, J. L., 1990. Comparative, Multicentre, Open Trial of the Plasma Levels of Tretinoin, 4-Oxo-Tretinoin, Isotretinoin and 4-Oxo-Isotretinoin After Repeated Cutaneous Application of Tretinoin Gel 0.05% or Isotretinoin Gel 0.05%. Stiefel Report No CO259/E.
- Falcon, R. H., Lee, W. L., Shalita, A. R., Suntharalingam, K., Fikrig, S. M., 1986. In Vitro Effect of Isotretinoin on Monocyte Chemotaxis. *Journal of Investigative Dermatology* 86(5), 550-552.
- Fitz-Gibbon, S., Tomida, S., Chiu, B. H., Nguyen, L., Du, C., Liu, M., Elashoff, D., Erfe, M. C., Loncaric, A., Kim, J., Modlin, R. L., Miller, J. F., Sodergren, E., Craft, N., Weinstock, G. M., Li, H., 2013. Propionibacterium acnes Strain Populations in the Human Skin Microbiome Associated with Acne. *Journal of Investigative Dermatology* 133(9), 2152-2160.
- Foolad, N., Burney, W., Shafizadeh, T., Watkins, S., Sivamani, R. K., 2016. The Influence of Tretinoin and Isotretinoin on the Sebaceous Gland Lipidome and Lipid Mediators. *Journal of Investigative Dermatology* 136(5-1) S51.
- Garg, A., Aggarwal, D., Garg, S., Singla, A. K., 2002. Spreading of Semisolid Formulations. An Update. *Pharmaceutical Technology* September 2002, 84-105.
- George, R., Clarke, S., Thiboutot, D., 2008. Hormonal Therapy for Acne. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 27, 188-196.
- Ghodsi, S. Z., Orawa, H., Zouboulis, C. C., 2009. Prevalence, Severity, and Severity Risk Factors of Acne in High School Pupils: a Community-based Study. *Journal of Investigative Dermatology* 129, 2136-2141.
- Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Gilchrist, B. A., Paller, A. S., Leffell, D. J., Wolff, K., 2012. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 8ed. McGraw-Hill Publishing, New York, USA.

- Gollnick, H. P., Finlay, A. Y., Shear, N., 2008. Can we Define Acne as a Chronic Disease ? If so, How and When ? *American Journal of Clinical Dermatology* 9, 279-284.
- Gollnick, H., Cunliffe, W., Berson, D., Dreno, B., Finlay, A., Leyden, J.J., Shalita, A. R., Thiboulot, D., 2003. Management of Acne: a Report from a Global Alliance to Improve Outcomes in Acne. *Journal of the American Academy of Dermatology* 49(1 suppl.), S1-37.
- Gomez, E. C., April 1982. Actions of Isotretinoin and Etretinate on the Pilosebaceous Unit. *Journal of the American Academy of Dermatology* 6(4-2), 746-750.
- Grando, S. A., Pittelkow, M. R., Schallreuter, K. U., 2006. Adrenergic and Cholinergic Control in the Biology of Epidermis: Physiological and Clinical Significance. *Journal of Investigative Dermatology* 126(9), 1948-1965.
- Green, J., Sinclair, R. D., 2001. Perceptions of Acne Vulgaris in Final Year Medical Student Written Examination Answers. *Australasian Journal of Dermatology* 42, 98-101.
- Grice, E. A. Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Murray, P. R., Green, E. D., Turner, M. L., Segre J. A., 2009. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science Mag* 324, 1190-1192.
- Gürbüz, A., Özhan, G., Güngör, S., Erdal, M. S., 2015. Colloidal Carriers of Isotretinoin for Topical Acne Treatment: Skin Uptake, ATR-FTIR and in vitro Cytotoxicity Studies. *Archives of Dermatological Research* 307(7), 607-615.
- Hana, A., Booken, D., Henrich, C., Gratchev, A., Maas-Szabowski, N., Goerdts, S., Kurzen, H., 2007. Functional Significance of Non-Neuronal Acetylcholine in Skin Epithelia. *Life Sciences* 80, 2214-2220.
- Hong, J. B., Prucha, H., Melnik, B., Ziai, M., Ring, J., Chen, W., 2013. Seltene Akne-assoziierte Syndrome und deren Bedeutung für das Verständnis der Pathogenese der Akne. *Der Hautarzt* 64, 274-279.
- Hughes, B. R., Morris, C., Cunliffe, W. J., Leigh, I. M., 1996. Keratin Expression in Pilosebaceous Epithelia in Truncal Skin of Acne Patients. *British Journal of Dermatology* 134, 247-256.
- Hunyadkürti, J., Feltóti, Z., Horváth, B., Nagymihály, M., Vörös, A., McDowell, A., Patrick, S., Urbán, E., Nagy, I., 2011. Complete Genome Sequence of *Propionibacterium acnes* Type IB Strain 6609. *Journal of Bacteriology* 193(17), 4561-4562.
- Imperato-McGinley, J., Gautier, T., Cai, L., Yee, B., Epstein, J., Pochi, P., 1993. The Androgen Control of Sebum Production. Studies of Subjects with Dihydrotestosterone Deficiency and Complete Androgen Insensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 76(2), 524-528.
- Ioele, G., Cione, E., Risoli, A., Genchi, G., Ragno, G., 2005. Accelerated Photostability Study of Tretinoin and Isotretinoin in Liposome Formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 293(1-2), 251-260.

- Jarrousse, V., Castex-Rizzi, N., Khammari, A., Charveron, M., Dreno, B., 2007. Modulation of Integrins and Filaggrin Expression by Propionibacterium Acnes Extracts on Keratinocytes. Archives of Dermatological Research 299, 441-447.
- Jensen, B. K., McGann, L. A., Kachevsky, V., Franz, T. J., 1991. The Negligible Systemic Availability of Retinoids with Multiple and Excessive Topical Application of Isotretinoin 0.05% Gel (Isotrex) in Patients with Acne Vulgaris. Journal of the American Academy of Dermatology 24(3), 425-428.
- Karlsson, T., Rollman, O., Vahlquist, A., Törmä, H., 2004. Immunofluorescence Localization of Nuclear Retinoid Receptors in Psoriasis Versus Normal Human Skin. Acta Dermato Venereologica 84, 363-369.
- Kasimatis, G., Fitz-Gibbon, S., Tomida, S., Wong, M., Li, H., 2013. Analysis of Complete Genomes of Propionibacterium Acnes Reveals a Novel Plasmid and Increased Pseudogenes in an Acne Associated Strain. BioMed Research International 2013, ID 918320.
- Kaur, N., Puri, R., Jain, S. K., 2010. Drug-Cyclodextrin-Vesicles Dual Carrier Approach for Skin Targeting of Anti-acne Agent. AAPS PharmSciTech 11(2), 528-537.
- Kim, J., Ochoa, M. T., Krutzik, S. R., Takeuchi, O., Uematsu, S., Legaspi, A. J., Brightbill, H. D., Holland, D., Cunliffe, W. J., Akira, S., Sieling, P. A., Godowski, P. J., Modlin, R. L., 2002. Activation of Toll-Like Receptor 2 in Acne Yriggers Inflammatory Cytokine Responses. The Journal of Immunology 169, 1535-1541.
- King, K., Jones, D. H., Daltry, D. C., Cunliffe, W. J., 1982. A Double-Blind Study of the Effects of 13-*Cis*-Retinoic Acid on Acne, Sebum Excretion Rate and Microbial Population. British Journal of Dermatology 107, 583-590.
- Knaggs, H., 2007. Cell Biology of the Pilosebaceous Unit. In: Webster, G. F., Rawlings, A. V., Acne and Its Therapy (Basic and Clinical Dermatology). CRC Press, New York, USA.
- Knutsen-Larson, S., Dawson, A. L., Dunnick, C. A., Dellavalle, R. P., 2012. Acne Vulgaris: Pathogenesis, Treatment, and Needs Assessment. Dermatologic Clinics 30, 99-106.
- Knutson, D. D., 1974. Ultrastructural Observations in Acne Vulgaris: the Normal Sebaceous Follicle and Acne Lesions. Journal of Investigative Dermatology 62, 288-307.
- Kurokawa, I., Danby, F. W., Ju, Q., Wang, X., Xiang, L. F., Xia, L., Chen, W., Nagy, I., Picardo, M., Suh, D. H., Ganceviciene, R., Schagen, S., Tsatsou, F., Zouboulis, C.C., 2009. New Developments in our Understanding of Acne Pathogenesis and Treatment. Experimental Dermatology 18, 821-832.
- Kurokawa, I., Mayer-da-Silva, A., Gollnick, H., Orfanos, C. E., 1988. Monoclonal Antibody Labeling for Cytokeratins and Filaggrin in the Human Pilosebaceous Unit of Normal, Seborrhoeic and Acne Skin. Journal of Investigative Dermatology 91, 566-571.

- Kurzen, H., Berger, H., Jäger, C., Hartschuh, W., Näher, H., Gratchev, A., Goerdts, S., Deichmann, M., 2004. Phenotypical and Molecular Profiling of the Extraneuronal Cholinergic System of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 123(5), 937-949.
- Landthaler, M., Kummermehr, J., Wagner, A., Plewig, G., 1980. Inhibitory Effects of 13-*Eis*-Retinoic Acid on Human Sebaceous Glands. *Archives of Dermatological Research* 269, 297-309.
- Laneuville S. I., Paquin P., Turgeon S. L., 2000. Effect of Preparation Conditions on the Characteristics of Whey Protein - Xanthan Gum Complexes. *Food Hydrocolloids* 14(4), 305-314.
- Layton, A., 2009. The Use of Isotretinoin in Acne. *Dermato-Endocrinology* 1(3), 162-169.
- Lehman, P. A., Slattery, J. T., Franz, T. J., 1988. Percutaneous Absorption of Retinoids: Influence of Vehicle, Light Exposure, and Dose. *Journal of Investigative Dermatology* 91(1), 56-61.
- Levin, A. A., Bosakowski, T., Kazmer, S., Grippo, J. F. 1992. 13-*Cis* Retinoic Acid Does Not Bind to Retinoic Acid Receptors Alpha, Beta and Gamma. *Toxicologist* 12, 181.
- Leyden, J. J., McGinley, K. J., 1982. Effect of 13-*Cis*-Retinoic Acid on Sebum Production and Propionibacterium Acnes in Severe Nodulocystic Acne. *Archives of Dermatological Research* 272, 331-337.
- Leyden, J., Rosso, J. D., Webster, G., 2009. Clinical Considerations in the Treatment of Acne Vulgaris and Other Inflammatory Skin Disorders: a Status Report. *Dermatologic Clinics* 27, 1-15.
- Lima, E. M., Diniz, D. G. A., Antoniosi-Filho, N. R., 2005. Development of A Gas Chromatography Method for the Determination of Isotretinoin and its Degradation Products in Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 38, 678-685.
- Liu, J., Hu, W., Chen, H., Ni, Q., Xu, H., Yang, X., 2007a. Isotretinoin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles with Skin Targeting for Topical Delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 328, 191-195.
- Liu, J., Hu, W., Chen, H., Ni, Q., Xu, H., Yang, X., 2007b. Pharmaceutical Nanotechnology Isotretinoin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles with Skin Targeting for Topical Delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 328, 191-195.
- Livrea, M. A., Packer, L., 1993. Retinoids: Progress in Research and Clinical Applications (Basic and Clinical Dermatology) 1st Edition. Marcel Dekker, New York, USA.
- Lomholt, H. B., Kilian, M., 2010. Population Genetic Analysis of Propionibacterium acnes Identifies a Subpopulation and Epidemic Clones Associated with Acne. *PLoS ONE* 5(8), e12277.

- Lynberg, M. C., Khoury, M. J., Lammer, E. J., Waller, K. O., Cordero, J. F., Erickson, J. D., 1990. Sensitivity, Specificity, and Positive Predictive Value of Multiple Malformations in Isotretinoin Embryopathy Surveillance. *Teratology* 42, 513-519.
- Mengual, O., Meunier, G., Cayré, I., Puech, K., Snabre, P., 1999. TURBISCAN MA 2000: Multiple Light Scattering Measurement for Concentrated Emulsion and Suspension Instability Analysis. *Talanta* 50(2), 445-456.
- Miastkowska, M., Sikora, E., Ogonowski, J., Zielinab, M., Łudzik, A., 2016. The kinetic Study of Isotretinoin Release from Nanoemulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.07.060.
- Mills, O. Jr, Thornsberry, C., Cardin, C. W., Smiles, K. A., Leyden, J. J., 2002. Bacterial Resistance and Therapeutic Outcome Following Three Months of Topical Acne Therapy with 2% Erythromycin Gel Versus its Vehicle. *Acta Dermato-Venereologica* 82, 260-265.
- Moghimi, H., Noorani, N., Zarghi, A., 2004. Stereoselective Permeation of Tretinoin and Isotretinoin through Enhancer-Treated Rat Skin. II. Effects of Lipophilic Penetration Enhancers. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 3, 17-22.
- Nagy, I., Pivarcsi, A., Kis, K., Koreck, A., Bodai, L., McDowell, A., Seltmann, H., Patrick, S., Zouboulis, C. C., Kemény, L., 2006. Propionibacterium Acnes and Lipopolysaccharide Induce the Expression of Antimicrobial Peptides and Proinflammatory Cytokines/Chemokines in Human Sebocytes. *Microbes and Infection* 8, 2195-2205.
- Nankervis, R., 1992. The Lymphatic Absorption of the Retinoids. Ph. D Thesis, University of Nottingham.
- Nankervis, R., Davis, S. S., Day, N. H., Shaw, P. N., 1995. Effect of Lipid Vehicle on the Intestinal Lymphatic Transport of Isotretinoin in the Rat. *International Journal of Pharmaceutics* 119, 173-181.
- Nankervis, R., Davis, S. S., Day, N. H., Shaw, P. N., 1996. Intestinal Lymphatic Transport of Three Retinoids in the Rat after Oral Administration: Effect of Lipophilicity and Lipid Vehicle. *International Journal of Pharmaceutics* 130, 57-64.
- Nast, A., Dréno, B., Bettoli, V., Bukvic Mokos, Z., Degitz, K., Dressler, C., Finlay, A. Y., Haedersdal, M., Lambert, J., Layton, A., Lomholt, H. B., López-Estebarez, J. L., Ochsendorf, F., Oprica, C., Rosumeck, S., Simonart, T., Werner, R. N., Gollnick, H., 2016. European Evidence-Based (S3) Guideline for the Treatment of Acne. Berlin, Germany.
- Nelson, A. M., Gilliland, K. L., Cong, Z., Thiboutot, D. M., 2006. 13-*Cis*-Retinoic Acid Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human SEB-1 Sebocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 126, 2178-2189.
- Oh, C. W., Myung, K. B., 1996. An Ultrastructural Study of the Retention Hyperkeratosis of Experimentally Induced Comedones in Rabbits: the Effects of Three Comedolytics. *Journal of Dermatology* 23(3), 169-180.

- Pakhiddey, R., Paul, S., Mandal, A. K., Kumar, V., 2015. Epidermal Androgen Receptors in Acne Vulgaris Patients Before and Following Oral Isotretinoin. *Journal of the Anatomical Society of India* 64(1), 42-47.
- Palaniraj, A., Jayaraman, V., 2011. Production, Recovery and Applications of Xanthan Gum by *Xanthomonas Campestris*. *Journal of Food Engineering*, 106(1), 1-12.
- Papagiannopoulos, A., Sotiropoulos, K., Pispas, S., 2016. Particle Tracking Microrheology of the Power-Law Viscoelasticity of Xanthan Solutions. *Food Hydrocolloids* 61, 201–210.
- Patel, M. R., Patel, R. B., Parikh, J. R., Patel, B. G., 2011. Improving the Isotretinoin Photostability by Incorporating in Microemulsion Matrix. *ISRN Pharmaceutics* 2011, 1-6.
- Plet, A., Raynaud, F., Evain-Brion, D., 1988. Mécanisme d'Action de l'Acide Rétinoïque. *Médecine/Sciences* 4, 618-623.
- Plewig, G., Fulton, J. E., Kligman, A. M., 1970. Pomade Acne. *Archives of Dermatology* 101, 580-584.
- Plewig, G., Nikolowski, J., Wolff, H. H., 1982. Action of Isotretinoin in Acne Rosacea and Gram-Negative Folliculitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 6(4-2), 766-785.
- Plewig, G., Nikolowski, J., Wolff, H. H., April 1982. Action of Isotretinoin in Acne Rosacea and Gram-Negative Folliculitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 6 (4-2), 766-785.
- Plewig, G., Wagner, A., 1981. Anti-Inflammatory Effects of 13-Cis-Retinoic Acid. *Archives of Dermatological Research* 270, 89-94.
- Queille-Roussel, C., Poncet, M., Mesaros, S., Clucas, A., Baker, M., Soloff, A., 2001. Comparison of the Cumulative Irritation Potential of Adapalene Gel and Cream with that of Erythromycin/Tretinoin Solution and Gel and Erythromycin/Isotretinoin Gel. *Clinical Therapeutics* 23, 205-221.
- Raza, K., Singh, B., Singla, P., Wadhwa, S., Garg, B., Chhibber, S., Katare, O. P., 2013b. Nanocolloidal Carriers of Isotretinoin: Antimicrobial Activity Against *Propionibacterium acnes* and Dermatokinetic Modeling. *Molecular Pharmaceutics* 10(5), 1958-1963.
- Raza, K., Singh, B., Singal, P., Wadhwa, S., Katare, O. P., 2013a. Systematically Optimized Biocompatible Isotretinoin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) for Topical Treatment of Acne. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 105, 67-74.
- Raza, K., Singh, B., Singla, N., Negi, P., Singal, P., Katare, O. P., 2013c. Nano-Lipoidal Carriers of Isotretinoin With anti-Aging Potential: Formulation, Characterization and Biochemical Evaluation. *Journal of Drug Targeting* 21(5), 435-442.

- Ro, B. I., Dawson, T. L., 2005. The Role of Sebaceous Gland Activity and Scalp Microfloral Metabolism in the Etiology of Seborrheic Dermatitis and Dandruff. *The journal of Investigative Dermatology. Symposium proceedings* 10(3), 194-197.
- Rollman, O., Vahlquist, A., 1986. Oral Isotretinoin (13-cis-retinoic acid) Therapy in Severe Acne: Drug and Vitamin A Concentrations in Serum and Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 86(4), 384-389.
- Rosenfield, R. L., 2001. Polycystic Ovary Syndrome and Insulin-Resistant Hyperinsulinemia. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45(3 Suppl):S95-104.
- Rosenfield, R. L., Ghai, K., Ehrmann, D. A., Barnes, R. B., 2000. Diagnosis of the Polycystic Ovary Syndrome in Adolescence: Comparison of Adolescent and Adult Hyperandrogenism. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 13 Suppl 5:1285-9.
- Rosenfield, R., 1999. Ovarian and Adrenal Function in Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America* 28, 265-293.
- Schäfer, T., Nienhaus, A., Vieluf, D., Ring, J., 2001. Epidemiology of Acne in the General Population: the Risk of Smoking. *British Journal of Dermatology* 145, 100-104.
- Schmidt, J. B., Spona, J., Huber, J., 1986. Androgen Receptor in Hirsutism and Acne. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 22(4), 206-211.
- Schneider, D., Dennerlein, K., Göen, T., Schaller, K. H., Drexler, H., Korinth, G., 2016. Influence of Artificial Sebum on the Dermal Absorption of Chemicals in Excised Human Skin: A proof-of-Concept Study. *Toxicology in Vitro* 33, 23-28.
- Scholz, C. F. P., Brüggemann, H., Lomholt, H. B., Tettelin, H., Kilian, M., 2016. Genome Stability of *Propionibacterium acnes*: A Comprehensive Study of Indels and Homopolymeric Tracts. *Scientific Reports* 6, 20662.
- Seirafi, H., Farnaghi, F., Vasheghani-Farahani, A., Alirezaie, N. S., Esfahanian, F., Firooz, A., Ghodsi S. Z., 2007. Assessment of Androgens in Women with Adult-Onset Acne. *International Journal of Dermatology* 46(11), 1188-1191.
- Shalita, A. R., Lee, W. L., 1983. Inflammatory Acne. *Dermatologic Clinics* 1, 361-364.
- Shalita, A. R., Del Rosso, J. Q., Webster, G., 2011. *Acne Vulgaris*. 1st edition, CRC Press, Boca Raton, États-Unis.
- Shiva, G., Somaye, M., Reza, J. M., 2012. Improved Photostability, Reduced Skin Permeation and Irritation of Isotretinoin by Solid Lipid Nanoparticles. *Acta Pharmaceutica* 62, 547-562.
- Slominski, A., Wortsman, J., 2000. Neuroendocrinology of the skin. *Endocrine Reviews* 21(5), 457-487.

- Smith, E.V., Grindlay, D. J., Williams, H. C., 2011. What's New in Acne? An Analysis of Systematic Reviews Published in 2009-2010. *Clinical and Experimental Dermatology* 36, 119-123.
- Smith, R. N., Mann, N. J., Braue, A., Makelainen, H., Varigos, G. A., 2007. A Low-Glycemic-Load Diet Improves Symptoms in Acne Vulgaris Patients: A Randomized Controlled Trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 86, 107-115.
- Spencer, E. H., Ferdowsian, H. R., Barnard, N. D., 2009. Diet and Acne: A Review of the Evidence. *International Journal of Dermatology* 48(4), 339-347.
- Stables, G., Glass, D., Boorman, G. C., Seukeran, D. C., Cunliffe, W. J., 1996. Topical Isotretinoin Alone or in Combination with Topical Erythromycin: no Clinical Absorption Even After "Maximised" Use. *British Journal of Dermatology* 135(Suppl. 47), 28.
- Stewart, M. E., Benoit, A. M., Downing, D. T., Strauss, J. S., January 1984. Suppression of Sebum Secretion with 13-Cis-Retinoic Acid: Effect on Individual Skin Surface Lipids and Implications for Their Anatomic Origin. *Journal of Investigative Dermatology* 82(1), 74-78.
- Strauss, J. S., Stranieri, A. M., 1982. Changes in Long-Term Sebum Production from Isotretinoin Therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology* 6, 751-756.
- Strauss, J. S., Stranieri, A. M., Farrell, L. N., Downing, D. T., 1980. The Effect of Marked Inhibition of Sebum Production with 13Cis-retinoic Acid on Skin Surface Lipid Composition. *Journal of Investigative Dermatology* 74(2), 66-67.
- Suikkari, A.-M., 1989. Insulin-Like Growth Factor (IGF-I) and its Low Molecular Weight Binding Protein in Human Milk. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 30, 19-25.
- Tan, J., Knezevic, S., 2013. Improving Bioavailability with a Novel Isotretinoin Formulation (Isotretinoin-Lidose). *Skin Therapy Letter* 18(6), 1-3.
- Tan, X., Meltzer, N., Lindebaum, S., 1992. Solid-State Stability Studies of 13-Cis-Retinoic Acid and all-trans-Retinoic Acid Using Microcalorimetry and HPLC Analysis. *Pharmaceutical Research* 9(9), 1203-1208.
- Tashtoush, B. M., Jacobson, E. L., Jacobson, M. K., 2008. UVA is the Major Contributor to the Photodegradation of Tretinoin and Isotretinoin: Implications for Development of Improved Pharmaceutical Formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 352(1-2), 123-128.
- Taylor, G. A., Shalita, A. R., 2004. Benzoyl Peroxide-Based Combination Therapies for Acne Vulgaris: a Comparative Review. *American Journal of Clinical Dermatology* 5(4), 261-265.
- Thiboutot, D., Martin, P., Volikos, L., Gilliland, K., 1998. Oxidative Activity of the Type 2 Isozyme of 17 beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase (17 beta-HSD) Predominates in Human Sebaceous Glands. *Journal of Investigative Dermatology* 111, 390-395.

- Thielitz, A., Gollnick, H., 2008. Topical Retinoids in Acne Vulgaris: Update on Efficacy and Safety. *American Journal of Clinical Dermatology* 9, 369-381.
- Törmä, H., November 2001. Interaction of Isotretinoin With Endogenous Retinoids. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45(5), S143-S149.
- Trichard, L., Fattal, E., Besnard, M., Bochot, A., 2007. α -Cyclodextrin/Oil Beads as a New Carrier for Improving the Oral Bioavailability of Lipophilic Drugs. *Journal of Controlled Release* 122, 47-53.
- Tsai, M. C., Chen, W., Cheng, Y. W., Wang, C. Y., Chen, G. Y., Hsu, T. J., 2006. Higher Body Mass Index is a Significant Risk Factor for Acne Formation in Schoolchildren. *European Journal of Dermatology* 16, 251-53.
- Tsukada, M., Schröder, M., Roos, T. C., Chandraratna, R. A., Reichert, U., Merk, H. F., Orfanos, C. E., Zouboulis, C. C., 2000. 13-Cis-Retinoic Acid Exerts its Specific Activity on Human Sebocytes Through Selective Intracellular Isomerization to All-Trans-Retinoic Acid and Binding to Retinoid Acid Receptors. *Journal of Investigative Dermatology* 115(2), 321-327.
- Tucker, S. B., 1983. Occupational Tropical Acne. *Cutis* 31(1), 79-81.
- Wang, K. C., Zane, L. T., 2008. Recent Advances in Acne Vulgaris Research: Insights and Clinical Implications. *Advances in Dermatology* 24, 197-209.
- Webster, G. F., Leyden, J. J., Gross, J. A., 2013. Comparative Pharmacokinetic Profiles of A Novel Isotretinoin Formulation (Isotretinoin-Lidose) and the Innovator Isotretinoin Formulation: A Randomized, 4-Treatment, Crossover Study. *Journal of the American Academy of Dermatology* 69(5), 762-767.
- Wei, B., Pang, Y., Zhu, H., Qu, L., Xiao, T., Wei, H. C., Chen, H. D., He, C. D., 2010. The Epidemiology of Adolescent Acne in North East China. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 24(8), 953-957.
- Weissmann, A., Wagner, A., Plewig, G., 1981. Reduction of Bacterial Skin Flora During Oral Treatment of Severe Acne with 13-Cis Retinoic Acid. *Archives of Dermatological Research* 270, 179-183.
- Willhite, C. C., Sharma, R. P., Allen, P. V., Berry, D. L., 1990. Percutaneous Retinoid Absorption and Embryotoxicity. *Journal of Investigative Dermatology* 95(5), 523-529.
- Williams, H. C., Dellavalle, R. P., Garner, S., 2012. Acne Vulgaris. *The Lancet* 379, 361-372.
- Windhorst, D. B., 1982. The Use of Isotretinoin in Disorders of Keratinization: An Introduction. *Journal of the American Academy of Dermatology* 6(4-2), 708-709.
- Yap, K. L., Liu, X., Thenmozhiyal, J. C., Ho, P. C., 2005. Characterization of the 13-Cis-Retinoic Acid/Cyclodextrin Inclusion Complexes by Phase Solubility, Photostability, Physicochemical and Computational Analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 25, 49-56.

- Ye, A., Hemar, Y., Singh, H., 2004. Influence of Polysaccharides on the Rate of Coalescence in Oil-in-Water Emulsions Formed with Highly Hydrolyzed Whey Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(17), 5491-5498.
- Yehye, W. A., Abdul Rahman, N., Ariffin, A., Abd Hamid, S. B., Alhadi, A. A., Kadir, F. A., Yaeghoobi, M., 2015. Understanding the Chemistry Behind the Antioxidant Activities of Butylated Hydroxytoluene (BHT): A Review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 101, 295-312.
- Zaenglein, A. L., Pathy, A. L., Schlosser, B. J., Alikhan, A., Baldwin, H. E., Berson, D. S., Bowe, W. P., Graber, E. M., Harper, J. C., Kang, S., Keri, J. E., Leyden, J. J., Reynolds, R. V., Silverberg, N. B., Stein Gold, L. F., Tollefson, M. M., Weiss, J. S., Dolan, N. C., Sagan, A. A., Stern, M., Boyer, K. M., Bhushan, R., 2016. Guidelines of Care for the Management of Acne Vulgaris. *American Academy of Dermatology* 74(5), 945-973.
- Zhang, X., Liu, J., 2011. Effect of Arabic Gum and Xanthan Gum on the Stability of Pesticide in Water Emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(4), 1308-1315.
- Zouboulis, C. C., Eady, A., Philpott, M., Goldsmith, L. A., Orfanos, C., Cunliffe, W. C., Rosenfield, R., 2005. What is the Oathogenesis of Acne?. *Experimental Dermatology* 14, 143-152.
- Zsila, F., Bikádi, Z., Simonyi, M., 2002. Retinoic Acid Binding Properties of the Lipocalin Member β -Lactoglobulin Studied by Circular Dichroism, Electronic Absorption Spectroscopy and Molecular Modeling Methods. *Biochemical Pharmacology* 64, 1651-1660.

CHAPITRE V

Discussion générale

Le travail de cette thèse visait à étudier la possibilité de préparer des NEs pharmaceutiques stabilisées par des biopolymères à la place des tensioactifs de synthèse qui sont potentiellement irritants (Lémery et *al.*, 2015). Actuellement, les NEs pharmaceutiques, dans la recherche et ainsi que dans l'industrie pharmaceutique, sont stabilisées majoritairement par des tensioactifs synthétiques tels que le Tween 80 (Wong, 2015). Dans le domaine alimentaire, les biopolymères sont largement utilisés pour stabiliser des systèmes émulsionnés destinés à la délivrance des composés alimentaires bioactifs tels que les vitamines (Relkin et *al.*, 2009). Cette approche semble être prometteuse pour le domaine pharmaceutique pour remplacer les tensioactifs de synthèse dans la formulation des NEs (He et *al.*, 2011).

Dans un premier temps du travail de cette thèse, une recherche bibliographique a été effectuée sur la base de données se trouvant dans le domaine alimentaire sur les différents biopolymères utilisés et leur efficacité en tant qu'agents nano-émulsionnants. Les protéines sont les plus fréquemment utilisées dans ce but grâce à leurs propriétés favorables à la stabilisation des systèmes émulsionnés comme leur nature amphiphile due à la présence de deux types de résidus d'acides aminés hydrophiles et hydrophobes, et aussi leur nature polymère en tant que polypeptides (Foegeding et Davis, 2011). Parmi les protéines étudiées, la β -lg a montré une efficacité remarquable concernant la taille des gouttelettes des NEs obtenues, leur stabilité physique et leur biocompatibilité (Benjamins, 2000; Smulders, 2000; He et *al.*, 2011). Ainsi, cette protéine a été sélectionnée pour cette étude. Parmi les méthodes utilisées pour la préparation des NEs, les méthodes à haute énergie sont les seules accessibles pour préparer des NEs stabilisées par des protéines. L'HPH et aussi la HPM sont plus efficaces pour réduire la taille des gouttelettes et plus adaptables à la transposition de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle (Salager et *al.*, 2006). Ainsi, la méthode de l'HPH a été choisie pour cette étude. En cohérence avec l'objectif de cette thèse, trois huiles végétales ont

été sélectionnées en tant que phase huileuse, le Miglyol 812, l'huile d'amande douce et l'huile de germe de blé.

Au cours de ce travail, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- 1- Quelles sont les conditions pour stabiliser des NEs par la β -lg ? Quels sont les mécanismes mis en jeu ?
- 2- Quel est le rôle de la dénaturation de la protéine ?
- 3- Est-il possible d'obtenir une formulation d'intérêt pharmaceutique pour une application cutanée ?

Les différents Chapitres de cette thèse ont fait l'objet d'une discussion propre des résultats obtenus. Dans cette discussion générale, nous synthétisons et remettons perspectives les principaux résultats, en nous appuyant sur la littérature, et nous discutons les points non abordés jusqu'à présent.

1 Quelles sont les conditions pour stabiliser des NEs par la β -lg ? Quels sont les mécanismes mis en jeu ?

La Figure 1 résume le protocole mis en œuvre au cours de cette thèse pour la préparation des NEs. La première étape (A) consiste en la préparation de la phase aqueuse dans laquelle la protéine est solubilisée à une concentration donnée. Dans l'étape (B), une émulsion primaire est préparée à l'aide d'un mélangeur à haute vitesse. Pour cela, la phase huileuse est ajoutée progressivement à une fraction massique donnée. La nanoémulsion finale est préparée par un ou plusieurs passages dans l'homogénéisateur à une valeur donnée de pression. Les résultats obtenus dans le Chapitre II montrent la possibilité d'obtenir des NEs stabilisées par la β -lg en suivant ce protocole. La modification de la composition et des conditions du procédé a permis de contrôler la taille des gouttelettes. La taille minimale des gouttelettes lors de l'optimisation était comprise entre 188 et 205 nm. Selon les différentes définitions des NEs, les systèmes préparés sont bien des NEs. Nous n'avons pas pu obtenir des tailles de gouttelettes en deçà de ces valeurs quelles que soient la composition ou les conditions du procédé. Cela peut s'expliquer par l'encombrement stérique en raison de la

taille de la protéine qui est relativement importante par rapport aux tensioactifs ne permet pas d'avoir des tailles de gouttelettes plus petites.

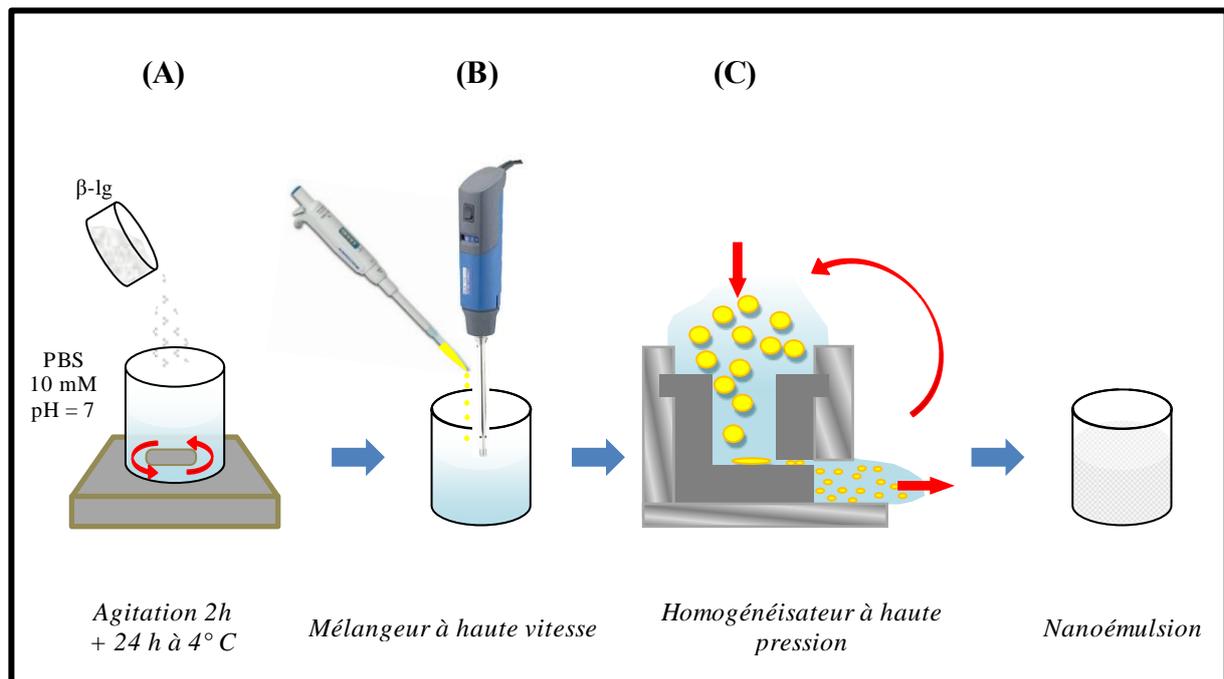


Figure 1 - Schéma représentant les différentes étapes pour la préparation des NEs stabilisées par la β -lg.

Au meilleur de notre connaissance, la taille des gouttelettes la plus petite rapportée pour des NEs stabilisées par des protéines globulaires est de l'ordre de 150 nm (Qian et McClements, 2011; He et *al.*, 2011). Pour réduire davantage la taille de gouttelettes, une approche consiste en l'addition d'un solvant volatil, tel que l'acétate d'éthyl, à la phase dispersée avant de préparer des NEs (stabilisées par les protéines du lactosérum) et ensuite en l'élimination de ce solvant par évaporation pour induire la réduction de taille souhaitée (déplacement du solvant/émulsification/évaporation) (Lee et McClements, 2010; Teo et *al.*, 2016). L'utilisation de solvants organiques dans les produits pharmaceutiques nécessite des étapes supplémentaires pour éliminer ces solvants potentiellement toxiques et pour vérifier le taux de solvants résiduels.

1.1 Mécanisme d'émulsification avec la β -lg par homogénéisation à haute pression

De façon générale, la viscosité de la phase huileuse et sa tension interfaciale avec la phase aqueuse sont les paramètres les plus influents sur la taille des gouttelettes des NEs lors de leur préparation par les méthodes à haute énergie (Maali et Mosavian, 2013). Les valeurs de ces deux paramètres pour les trois huiles choisies, obtenues lors de la caractérisation physico-chimique, ont été favorables pour mettre en évidence l'importance de chaque paramètre. Nos résultats ont montré que le Miglyol et l'huile d'amande douce possèdent des valeurs de tension interfaciale similaires mais des valeurs de viscosité différentes alors que l'huile d'amande douce et l'huile de germe de blé possèdent des valeurs de viscosité similaires et varient par les valeurs de leur tension interfaciale. La viscosité la plus basse du Miglyol 812 a permis d'obtenir la taille de gouttelettes la plus petite malgré le fait que la tension interfaciale joue un rôle défavorable dans ce résultat. De même, la faible tension interfaciale de l'huile de germe de blé n'a pas été utile pour réduire la taille des gouttelettes par rapport à l'huile d'amande douce, et des tailles de gouttelettes similaires ont été obtenues avec ces deux huiles ayant la même valeur de viscosité. Un des rôles de l'abaissement de la tension interfaciale pendant l'émulsification suite à l'adsorption d'un tensioactif, est de **faciliter la déformation** et, par conséquent, la rupture des grosses gouttes et de stabiliser les gouttelettes nouvellement créées (Jafari et *al.*, 2008). Ce rôle n'a pas été confirmé avec la β -lg dans notre travail ou il a été négligeable devant le rôle de la viscosité à cet égard. La déformation des gouttes et ensuite la rupture étaient plus faciles pour l'huile ayant la viscosité la plus faible quelle que sa valeur de tension interfaciale avec la phase aqueuse. Un autre rôle d'un agent tensioactif est de **stabiliser les gouttelettes nouvellement créées** et, alors, d'empêcher leur re-coalescence (Walstra, 1993). La taille finale de gouttelettes est le résultat d'un équilibre entre la rupture et la re-coalescence (Floury et *al.*, 2000). Nos résultats concernant les deux huiles ayant les mêmes valeurs de viscosité, et alors les mêmes conditions de rupture (l'huile d'amande douce et l'huile de germe de blé), montrent que les gouttelettes de ces deux huiles ont subi le même taux de re-coalescence malgré la différence de leur tension interfaciale avec la phase aqueuse.

Une question peut se poser sur le faible effet de la tension interfaciale sur l'efficacité d'émulsification rapportée au cours de notre travail. Est-ce que cela provient de l'adsorption

lente de la protéine à l'interface huile/phase aqueuse ? En effet, le rôle de l'abaissement de la tension interfaciale lors de l'émulsification à haute énergie est négligeable par rapport à l'effet de la viscosité de la phase dispersée quelle que soit la nature de l'agent émulsionnant puisque la prédominance de la viscosité a également été observée lors de la préparation de NEs stabilisées par un tensioactif de faible masse molaire tel que le Tween 80 (Wooster et *al.*, 2008). Par ailleurs, l'adsorption rapide de tensioactifs de faible masse molaire à l'interface permet de réduire la fréquence de la re-coalescence et donc d'obtenir des gouttelettes plus petites. Pour ces raisons, les tensioactifs de faible masse molaire ont une meilleure capacité à réduire la taille des gouttelettes par rapport aux macromolécules (Bos et Vliet, 2001). Alors, nous pouvons conclure que la vitesse d'adsorption de l'agent émulsionnant à l'interface (mesurée par la réduction de la tension interfaciale obtenue en présence de cet agent pendant une durée donnée) a une influence prépondérante sur le procédé d'émulsification et non la valeur de la tension interfaciale obtenue à la fin de la phase d'adsorption. Cela peut être expliqué comme suit : pendant l'homogénéisation, le temps total de passage de la formulation dans la valve de l'homogénéisateur est de 5 à 10 secondes en fonction de la pression appliquée, mais le temps durant lequel les gouttes se rompent et les nouvelles gouttelettes entrent en collision est beaucoup plus court que cela. Par exemple, le temps de l'élongation d'une goutte dans la zone d'interaction est de 3×10^{-6} à 16×10^{-6} s (Floury et *al.*, 2004). Les nouvelles gouttelettes entrent immédiatement dans la zone de turbulence à la sortie de la valve et subissent des collisions d'autant plus fortes que la pression est élevée. Le temps disponible pour les nouvelles gouttelettes pour adsorber l'agent tensioactif, avant de subir d'une éventuelle collision, ne permet donc pas une adsorption complète de la protéine aux interfaces nouvellement créées. Au cours de notre travail, les valeurs de la tension interfaciale rapportées pour les interfaces du Miglyol 812, l'huile d'amande douce et de l'huile de germe de blé avec la phase aqueuse sont les valeurs de la tension interfaciale obtenues à la fin de la phase d'adsorption de la β -lg à l'interface (au bout d'une heure environ). Cela ne reflète pas l'état de l'interface des gouttelettes dans la zone d'interaction de l'homogénéisateur car le mécanisme d'adsorption n'est pas le même dans l'homogénéisateur et lors de la mesure avec le tensiomètre à goutte. La prédiction de la vitesse d'adsorption de la β -lg à ces différentes interfaces lors de l'émulsification par homogénéisation n'est pas évidente. Par exemple, nous pouvons estimer les valeurs de la vitesse d'adsorption de deux façons différentes : (1) à partir de la pente de la phase d'adsorption de la protéine (Chapitre II – Figure 1) et (2) par la

différence entre les valeurs initiales de la tension interfaciale obtenues en présence et en absence de β -lg divisée par le temps (≈ 10 secondes) (Tableau 1).

Tableau 1 : la vitesse d'adsorption de la β -lg à l'interface Miglyol 812/phase aqueuse calculée par (1) la pente de la phase d'adsorption de la protéine ou par (2) la différence des valeurs initiales de tension interfaciale en présence et en absence de β -lg.

		Miglyol 812	Huile d'amande douce	Huile de germe de blé
Vitesse d'adsorption (mN.m⁻¹.s⁻¹)	Méthode (1)	0,0003 \pm 0,0001	0,0004 \pm 0,0002	0,0009 \pm 0,0002
	Méthode (2)	1,0 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1

Les valeurs obtenues ne permettent pas de conclure à une différence de vitesse d'adsorption lors de l'homogénéisation pour les différentes huiles. Il est aussi important de noter que la différence de l'abaissement de la tension interfaciale entre ces trois huiles ne reflète pas uniquement la différence de vitesse d'adsorption de la β -lg à ces interfaces. En effet, nous avons montré que ces huiles contiennent des acides gras libres et des peroxydes à des concentrations différentes. Ces composés ont des activités interfaciales et contribuent à l'abaissement de la tension interfaciale mesurée. Cela peut expliquer la valeur élevée de la vitesse d'adsorption de la β -lg à l'interface huile de germe de blé/phase aqueuse calculée par la méthode 1. Néanmoins, on ne trouve pas de différence significative entre les valeurs de la vitesse d'adsorption calculées par la méthode 2 car cette méthode soustrait tout autre effet que celui de la protéine.

1.2 Mécanismes de stabilisation/déstabilisation des NEs avec la β -lg

Les NEs sont des systèmes hors équilibre thermodynamique en raison de l'énergie libre à l'interface entre les deux phases. L'objectif lors de la formulation des NEs est de ralentir les différents mécanismes de déstabilisation. Les mécanismes irréversibles (mûrissement d'Ostwald et la coalescence) modifient la taille des gouttelettes des NEs et peuvent modifier les propriétés de la libération d'une SA encapsulée dans ces gouttelettes. Cependant, les mécanismes réversibles (floculation et crémage pour les NEs O/W) ne sont pas aussi rédhibitoires notamment pour l'application cutanée car on pourra s'en affranchir par simple agitation avant l'usage de la formulation.

Au cours de ce travail, nous avons étudié la stabilité physique des NEs à long terme à température ambiante. Lors de la comparaison entre les systèmes stables et non stables, nous avons pu déterminer les mécanismes de stabilisation et de déstabilisation des NEs en présence de β -lg. Les mesures de la rhéologie interfaciale ont montré que lors de l'adsorption à l'interface huile/phase aqueuse, la β -lg forme immédiatement un film viscoélastique. Des interactions intermoléculaires covalentes et non-covalentes se développent rapidement pendant les premières heures jusqu'à obtenir à $t \approx 4$ heures un film quasiment purement élastique. La présence de ce type de film à la surface des gouttelettes des NEs, suite à leur préparation par l'HPH, leur confère une résistance contre les chocs lors de la collision des gouttelettes animées par le mouvement brownien. Cela peut expliquer l'absence de phénomène de croissance de gouttelettes au cours du temps dans toutes les NEs contenant une quantité suffisante de protéine par rapport à la quantité d'huile. Le mûrissement d'Ostwald, qui est le mécanisme principal de déstabilisation des NEs de façon générale, a été absent dans nos NEs grâce ce film ce qui est un résultat très intéressant. En revanche, les NEs préparées avec de faibles quantités de protéine (les systèmes préparés avec 0,5 m/m% de β -lg pour 5 m/m% de Miglyol et les systèmes préparés avec 1 m/m% de β -lg pour 15 ou 30 m/m% de Miglyol) ont montré une croissance de taille de gouttelettes d'autant plus importante que le ratio protéine/huile est faible. Cette croissance de taille de gouttelettes est probablement causée par une coalescence induite par l'absence partielle de film interfacial.

Dans la formulation optimale (1m/m% de β -lg dans la phase aqueuse et 5 m/m% de Miglyol 812), environ 10 % de la quantité de protéine ajoutée n'a pas été adsorbée à l'interface des gouttelettes (Chapitre V - Partie 4.3). La quantité de la protéine libre a été réduite par l'augmentation de la fraction massique de la phase huileuse (8 % et 4 % pour 15 m/m% et 30 m/m% de la phase huileuse, respectivement) (Annexe II). La concentration interfaciale pour une monocouche de β -lg à l'interface O/W est de $1,25 \text{ mg.m}^{-2}$ (Sakuno et *al.*, 2008). Nous avons supposé que toute la quantité de protéine qui n'est pas libre dans la phase aqueuse est adsorbée à l'interface. Les concentrations interfaciales retrouvées dans notre travail sont de $5,4 \pm 0,3$; $2,0 \pm 0,2$ et $1,2 \pm 0,1 \text{ mg.m}^{-2}$ pour les systèmes contenant 5 ; 15 et 30 m/m% de la phase huileuse, respectivement. Cela correspond environ à 5 ; 2 et 1 couches de β -lg à la surface des gouttelettes, respectivement. En prenant en compte des données de la stabilité/instabilité de taille gouttelettes dans ces trois systèmes, nous pouvons conclure que le mécanisme principal de la stabilisation de ces NEs contre les phénomènes de croissance des gouttelettes est la formation d'un film interfacial composé d'un

nombre de couches supérieur à 2. L'épaisseur de la couche de β -lg est de l'ordre de 2 nm (Mackie et *al.*, 1991). L'épaisseur du film interfaciale de β -lg dans notre formulation optimisée est donc de 10 nm ce qui présente 10 % du diamètre total d'une gouttelette huileuse dans cette formulation.

La nature viscoélastique de ce film provient de la nature « polymère » de la protéine. La nature « amphiphile » de la protéine est également une caractéristique cruciale pour son activité émulsionnante. Sans cette amphiphilie la protéine n'aurait pas d'affinité pour l'interface et aucun film interfacial ne serait formé. Une fois la protéine adsorbée, l'amphiphilie joue le rôle d'une force motrice pour la dénaturation interfaciale de la protéine qui se déplie pour exposer ses différents fragments hydrophiles et hydrophobes vers les milieux correspondant à la nature de ces fragments. Cela induit « l'étalement » de la molécule à l'interface et favorise alors les interactions intermoléculaires entre ses différents fragments. L'abaissement de la tension interfaciale obtenu lors de l'adsorption de la protéine ne semble pas non plus avoir un effet significatif sur la stabilité des gouttelettes à long terme étant donné que les gouttelettes de Migyol, d'huile d'amande douce et d'huile de germe de blé ont également été toutes stables en terme de taille de gouttelettes bien que les valeurs de la tension interfaciale avec ces trois huiles soient différentes.

Le crémage est un autre phénomène de déstabilisation, mais pour sa part réversible, observé visuellement, au cours de ce travail, dans les NEs ayant une taille moyenne de gouttelettes légèrement supérieure à 200 nm (≥ 225 nm). Les NEs avec une taille moyenne de gouttelettes ≤ 200 nm apparaissent visuellement stables pendant une longue durée. Cependant, par la technique de balayage optique, un faible crémage a été observé en raison de la présence de populations de gouttelettes à des tailles supérieures à 200 nm. La stabilité cinétique de NEs à long terme est principalement le résultat de la prédominance du mouvement brownien aléatoire sur le mouvement induit par le champ de pesanteur (Tadros et *al.*, 2004). Les résultats obtenus pendant cette étude apportent un appui sur la définition de taille de gouttelettes d'une nanoémulsion pour l'estimer comme un système métastable avec des gouttelettes ≤ 200 nm. Il est important de noter que cette taille limite peut varier légèrement d'un système à un autre en raison de la composition. La différence de densité entre les phases aqueuse et huileuse est un facteur important qui influence la vitesse de migration des gouttelettes et, par conséquent, la stabilité du système. Par exemple, au cours de notre travail nous avons constaté que les NEs formulées avec de l'huile d'amande douce ou de l'huile de

germe de blé sont moins stables contre le crémage que des NEs de Miglyol 812 ayant la même taille de gouttelettes parce que les différences de densité avec la phase aqueuse sont plus importantes pour l'huile d'amande douce et l'huile de germe de blé.

2 Quel est le rôle de la dénaturation de la protéine ?

L'effet de la dénaturation des protéines, de façon générale ou spécifiquement par l'HPH, sur leurs propriétés émulsionnantes est soumis à controverses (Adjonu et *al.*, 2014; He et *al.*, 2011; Bader et *al.*, 2011; Lee et *al.*, 2009; Yuan et *al.*, 2012). Nous avons montré que l'efficacité de la β -lg a été réduite avec les valeurs de pression les plus élevées (à 200 et 300 MPa) (Chapitre II). Plusieurs hypothèses sont proposées dans la littérature pour expliquer cette réduction : la dénaturation de la protéine, le phénomène d'« *over processing* » et la re-coalescence accrue dans la zone d'interaction de l'homogénéisateur. Les protéines sont des macromolécules dont la structure est complexe et consiste en quatre niveaux structuraux spécifiques à chaque protéine. Elles sont sensibles aux traitements sévères tels que l'HPH (Paquin, 1999). L'efficacité des protéines en tant qu'agents émulsionnants dépend de leur structure et risque d'être perdue lors de la dénaturation de la protéine (Seekkuarachchi et *al.*, 2006). Les deux autres hypothèses (*over-processing* et re-coalescence accrue) sont liées à la cinétique d'adsorption de l'agent tensioactif à la surface des gouttelettes nouvellement créées sous le cisaillement et peuvent se produire aussi avec les tensioactifs de faible masse molaire. Cependant, ces phénomènes peuvent être exacerbés avec les protéines en raison de leur faible vitesse d'adsorption à l'interface huile/phase aqueuse et contribuer à réduire leur efficacité émulsionnante.

Au cours de ce travail, nous avons étudié les différents niveaux de structure de la β -lg lorsqu'elle est en solution aqueuse avant et après passage dans l'homogénéisateur à HP pression dans différentes conditions. La dénaturation de la protéine sous l'effet de l'HPH lors de la préparation des NEs en présence de phase huileuse peut varier par rapport à celle où la protéine est présente sous forme de solution aqueuse. En effet, pendant l'émulsification on a, de plus, la présence de la phase huileuse et, par conséquent, une dénaturation interfaciale de la molécule. Au cours de ce travail, nous n'avons pas pu évaluer la dénaturation de la protéine directement dans les NEs en raison de la complexité à distinguer la dénaturation induite par le

traitement à l'HPH et celle induite par l'adsorption à l'interface O/W (la dénaturation interfaciale). La dénaturation a été alors étudiée sur la protéine en solution pour avoir une première approche de ce qui se déroule réellement lors de l'émulsification à HP.

Nous avons ainsi étudié l'effet de ce traitement sur les différents niveaux de structure de cette protéine, sur son activité interfaciale en solution et, ensuite, sur son efficacité émulsionnante dans le cas où l'efficacité émulsionnante de la β -lg était optimale (100 MPa/4 cycles) et dans le cas où elle a été réduite (300 MPa/5 cycles).

Nos résultats montrent que l'efficacité émulsionnante optimale de la protéine a été associée à la préservation de l'intégrité de la protéine et l'invariabilité de ses propriétés interfaciales (en solution). La dénaturation de la protéine lors d'un traitement sévère à l'homogénéisateur à HP (300 MPa, 5 cycles) a été confirmée. La dénaturation induite dans ce cas ressemble à celle induite par la chaleur (une transformation au niveau de la structure secondaire, une large ouverture du cœur hydrophobe et une agrégation par des liaisons disulfure).

Il est à rappeler que le procédé d'émulsification par homogénéisation - en plus de la haute pression, du fort cisaillement et de la cavitation - est accompagné d'une élévation de la température d'autant plus importante que la pression est élevée (Grácia-Juliá et *al.*, 2008). Au cours de ce travail, nous avons trouvé que la température de la formulation atteint environ 60° C lors de l'homogénéisation à 300 MPa. Du fait de la similarité trouvée au cours de ce travail entre la dénaturation par l'HPH et celle par la chaleur, on peut donc se demander si la dénaturation induite par l'HPH n'est pas principalement causée par cette élévation de température. Nous avons trouvé, néanmoins, que cette température pendant une durée équivalente à 5 cycles d'HPH (4 min) ne modifie pas les structures secondaire et tertiaire de la β -lg (résultats de CD non présentés). Cela montre la faible contribution de l'élévation de température à la dénaturation de la β -lg pendant l'HPH. Cependant, la contribution des autres forces exercées (la pression, le cisaillement et la cavitation) à la dénaturation pendant l'HPH reste à étudier. Par exemple, il a été rapporté que le traitement à HP statique à 300 MPa peut dénaturer la β -lg mais pour des durées plus longues que la durée du traitement à l'HPH dans notre travail (Kolakowski et *al.*, 2001). Le cisaillement est le mécanisme principal de la rupture des gouttelettes huileuses mais cela ne veut pas dire forcément qu'il est le mécanisme principal de la dénaturation de la protéine. La cavitation générée pendant l'HPH a un effet

moins important au niveau de l'émulsification mais a un rôle dans la rupture de cellules (Floury et *al.*, 2004). Elle pourrait, alors, participer également à la dénaturation des protéines.

Lors de la dénaturation de la β -lg (à 300 MPa/5 cycles), nous avons trouvé plusieurs types d'agrégats et pas uniquement des dimères (Chapitre III). L'agrégation de la β -lg ne se produit donc pas seulement par la formation de liaisons disulfure suite à l'exposition de son seul groupement thiol libre ($-\text{SH}^{121}$) puisque cela conduirait seulement à des dimères. Le clivage de liaisons disulfure intramoléculaires est aussi probablement induit pendant la dénaturation de la protéine lors de procédé (par homogénéisation ou par chaleur), et permet de reformer des liaisons disulfure intermoléculaires. Il est important de noter que les liaisons disulfure ne sont pas le seul mécanisme d'agrégation. La formation d'agrégats non-covalents (par des interactions hydrophobes lors de la dénaturation de la β -lg) a été bien démontrée dans la littérature sous l'effet de la chaleur et celui d'un traitement à HP statique (Schokker et *al.*, 1999, Funtenberger et *al.*, 1995, 1997).

Le rôle du SDS dans les analyses de SDS-PAGE est de conférer à la protéine une charge négative suffisante pour effectuer la migration de la protéine dans le gel sous l'effet du champ électrique. L'interaction du SDS avec la protéine dissocie également les agrégats de protéine non-covalents (Reynolds et Tanford, 1970). Des essais préliminaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions alcalines (en absence de SDS), ont été effectués au cours de ce travail pour vérifier la présence de ce type d'agrégats. Les résultats ont montré, suite au traitement à 300 MPa et 5 cycles, la présence de quantités de protéine plus importantes dans les zones d'agrégats que celles obtenues en présence du SDS. Ces résultats sont à confirmer parce que les conditions d'analyse utilisées n'étaient pas adaptées. En effet, en conditions alcalines comme rapportées par Funtenberger et *al.* (1997), la migration de la protéine à travers le gel ne dépend pas uniquement de sa masse molaire, mais aussi de sa charge. Comme nous avons montré que le traitement à l'homogénéisation à 300 MPa a modifié le potentiel Zêta de la protéine, cela pourrait donc fausser ces résultats.

Nos résultats obtenus avec la protéine en solution sont en faveur de l'implication de la dénaturation de la β -lg sur l'efficacité émulsionnante. Nous avons trouvé que l'amélioration des propriétés interfaciales de la β -lg dénaturée par l'HPH ne semble pas s'accompagner d'un effet équivalent sur les propriétés émulsionnantes. Au contraire, une légère réduction de l'efficacité émulsionnante a été détectée. En effet, la taille des gouttelettes des NEs préparées à partir de la solution de protéine homogénéisée à 300 MPa/5 cycles (NE (300/5-100/4)) était

similaire à celle préparée à partir de la solution de protéine non-traitée (ou traitée à seulement 100 MPa/4 cycles) (NE (0-100/4) ou (NE (100/4-100/4))). L'agrégation de la β -lg en solution lors de sa dénaturation à 300 MPa/5 cycles ne semble pas avoir d'effet négatif sur sa disponibilité à recouvrir toutes les surfaces des gouttelettes créées pendant l'homogénéisation de l'émulsion. Cependant, les NEs préparées à partir de la solution de protéine homogénéisée à 300 MPa/5 cycles (NE (300/5-100/4)) ont été moins stables que celles préparées dans les conditions optimales. Le mécanisme le plus probable de cette réduction de stabilité est une floculation induite par pontage et/ou déplétion. La β -lg dans les solutions traitées à 300 MPa/5 cycles est présente sous forme de molécules individuelles dénaturées et d'agrégats plus hydrophobes que la protéine non traitée. Une fois les NEs préparées, une partie de la protéine peut être non adsorbée à l'interface huile/phase aqueuse et rester libre dans la phase aqueuse. Au cours de ce travail, la présence de protéine libre a été confirmée pour les NEs préparées à 100 MPa/4 cycles, mais ces expériences restent à réaliser pour les NEs préparées à 300 MPa/5 cycles. La protéine dénaturée en excès dans la phase aqueuse pourrait s'adsorber simultanément à différentes gouttelettes huileuses par des interactions hydrophobes avec les molécules préalablement présentes à l'interface des gouttelettes et, par conséquent, induire le pontage. Le pontage supposé dans ce cas ne correspondrait pas à la forme classique du pontage où les deux gouttelettes sont attachées par de longues chaînes de polymère (Figure 2(A)) mais par des agrégats de protéine (Figure 2(B)).

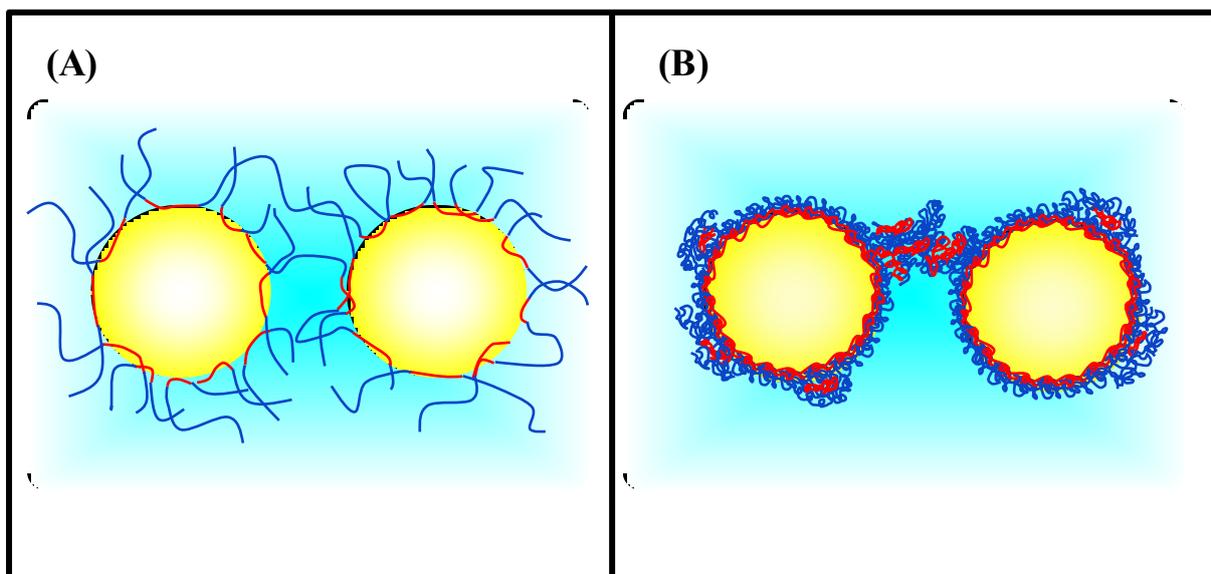


Figure 2 : Schéma représentant la floculation par pontage par (A) des longues chaînes des polymères dépliées et (B) par des agrégats de protéine.

La présence de protéine en excès dans la phase aqueuse pourrait également induire la floculation sans interaction directe avec les gouttelettes huileuses, mais par un mécanisme de déplétion. L'incidence de la floculation par déplétion entre deux gouttelettes dépend du rapport entre la distance entre celles-ci et le diamètre de l'entité libre dans la phase aqueuse inter-gouttelettes (Asakura et Oosawa, 1954 et 1958). Ainsi, l'incidence de la floculation en présence de gros agrégats de protéine est plus importante que le cas où il n'y a que des monomères et des dimères dans cette phase comme illustré sur la Figure 3. Les gouttelettes des NEs préparées à partir de protéine dénaturée ont montré une diminution de leur charge, ce qui peut aussi favoriser leur floculation par rapport aux NEs préparées à partir de protéine non-traitée.

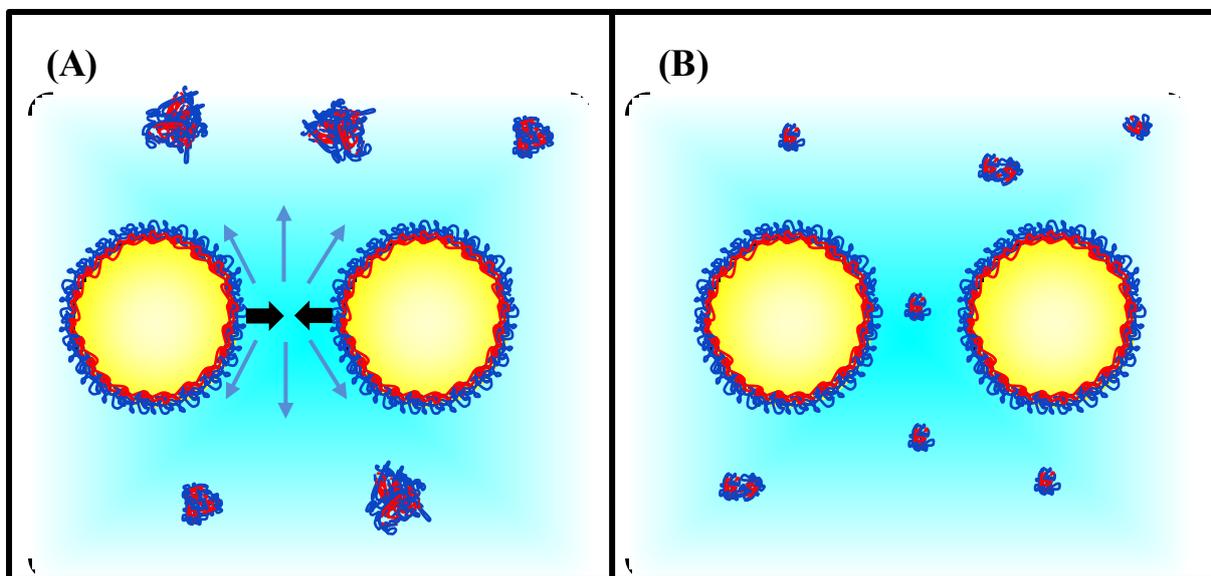


Figure 3 : Schéma représentant (A) la présence d'une floculation par déplétion dans le cas des NEs contenant des agrégats de protéine dans la phase aqueuse et (B) son absence dans le cas NEs contenant seulement des monomères de protéine.

La dénaturation probable de la protéine dans la phase aqueuse sous l'effet de l'HPH n'est pas le seul mécanisme de la réduction de l'efficacité émulsionnante de la β -Ig à des valeurs de pression élevées pendant l'homogénéisation. Les NEs préparées à 300 MPa/5 cycles à partir de solution de protéine non-traitée possédaient des tailles de gouttelettes plus importantes et étaient moins stables que celles préparées à 100 MPa/4 cycles à partir de solution de protéine dénaturée à 300 MPa/5 cycles. La différence de stabilité entre ces deux systèmes (NE (0-300/5)) et NE (300/5-100/4)) est reliée à la différence de taille de gouttelettes (265 ± 20 nm et 196 ± 6 nm, respectivement) (Chapitre III - Partie B - Figure 2).

Cependant, la dénaturation de la protéine a été présente dans les deux systèmes, et ne peut alors pas être la seule raison de la différence de taille de gouttelettes. Le phénomène d'*over-processing* (le manque de temps de résidence des gouttes dans la zone d'interaction de l'homogénéisateur) pourrait contribuer à la réduction de l'efficacité émulsionnante de la protéine sous l'effet de l'HPH (Desrumaux and Marcand, 2002; Jafari et al., 2008). En effet, à des valeurs très élevées de la pression d'homogénéisation, le passage des gouttelettes dans la valve de l'homogénéisateur devient extrêmement rapide. Leur temps de résidence dans la zone d'interaction de l'homogénéisateur devient très court et ne suffit pas pour effectuer la rupture des gouttelettes. Dans ce cas, le passage dans l'homogénéisateur ne modifie pas la taille de gouttelettes. Par exemple, nous avons trouvé que les NEs préparées à 200 MPa (où ce traitement ne dénaturait pas la protéine selon les mesures de CD (résultats non présentés)) ont une taille de gouttelettes indépendante du nombre de cycles après le premier cycle. Cela signifie qu'à partir du deuxième cycle, les gouttelettes traversaient la valve d'homogénéisateur sans aucun changement de taille. La contribution de l'*over-processing* est moins évidente à 300 MPa puisque la taille de gouttelettes augmentait avec le nombre de cycles. Cela peut être expliqué par **une re-coalescence des gouttelettes** induite à la fois par la forte perturbation dans la zone d'interaction à cette valeur de pression et par les interactions intermoléculaires accrues entre les molécules de protéine dénaturée simultanément. Une autre explication peut aussi être un mécanisme de **floculation par pontage suite à l'agrégation des gouttelettes par des liaisons disulfure inter-gouttelettes** (entre des molécules de β -lg adsorbées sur différentes gouttelettes). En effet, lors du rapprochement des gouttelettes, forcé par la forte perturbation, les liaisons disulfure peuvent se former instantanément entre les groupements thiol apparus lors du clivage des liaisons disulfure intramoléculaires. Dans les deux cas (**re-coalescence et agrégation par des liaisons disulfure inter-gouttelettes**), la simultanéité de la forte perturbation induite pendant l'émulsification à HP et la dénaturation de la protéine sous ce traitement semble être la clé de la réduction de l'efficacité émulsionnante. Si la dénaturation a été effectuée avant l'émulsification, l'implication des interactions intermoléculaires inter-gouttelettes sont moins probables puisque les interactions intermoléculaires sont préalablement formées dans les agrégats de protéine.

3 Est-il possible d'obtenir une formulation d'intérêt pharmaceutique pour une application cutanée ?

Les NEs développées semblent être prometteuses pour l'encapsulation et la délivrance de SAs hydrophobes. La voie d'administration envisagée pour évaluer l'efficacité de cette formulation est la voie cutanée. Cette formulation possède un aspect quasi-identique à celle du lait. Sa fluidité élevée peut être un facteur limitant en raison de son court temps de résidence sur la peau lors de l'application cutanée. En effet, la nanoémulsion optimale trouvée a un comportement rhéofluidifiant avec des valeurs de viscosité très légèrement supérieures à celle de l'eau. La gomme xanthane a alors été sélectionnée en tant qu'agent épaississant pour les raisons suivantes : c'est un biopolymère biocompatible et biodégradable, il n'a pas d'activité interfaciale en présence de β -lg et il présente des interactions électrostatiques répulsives avec la β -lg à la valeur de pH de la formulation (7,0). La gomme xanthane a été ajoutée à la NEs préalablement préparée pour éviter tout changement pendant l'émulsification, et ainsi, l'effet néfaste de l'HPH sur la structure et l'efficacité de cette gomme (Harte et Venegas, 2010). La concentration d'enchevêtrement de la gomme xanthane dépend de la masse molaire du polymère, du solvant, de la température et de la salinité (Papagiannopoulos et *al.*, 2016). Les différentes valeurs de la concentration d'enchevêtrement rapportées dans la littérature dans les différentes conditions sont inférieures à 0,1 m/m% (Oliveira et *al.*, 2013). La gomme xanthane a été alors ajoutée à notre formulation à une concentration supérieure à cette valeur (0,5 m/m%). Dans ces conditions, la formulation finale a présenté une texture crémeuse et un comportement rhéofluidifiant avec des valeurs de viscosité largement supérieures à celles de la formulation sans gomme xanthane. Par exemple, à un taux de cisaillement de 10^2 s^{-1} la valeur de la viscosité apparente a été multipliée par 25 après l'addition de la gomme xanthane. Cette forte augmentation de la viscosité a amélioré la stabilité des NEs contre le crémage. Théoriquement, selon la loi de Stokes (Chapitre II), si la densité de la phase aqueuse n'a pas été modifiée par la présence de la gomme xanthane, la vitesse de migration des gouttelettes vers le sommet de l'échantillon sera divisée par au moins 25.

Il est important de noter que le comportement obtenu avec la gomme xanthane de façon générale est celui d'un fluide à seuil d'écoulement. Le seuil d'écoulement dépend de la concentration. Par exemple le seuil d'écoulement pour la concentration que nous avons

utilisée est de 2500 mPa (Simon, 2001). La gamme de contrainte de cisaillement étudiée lors de nos expériences est de 7500 - 17500 mPa. Pour cela le seuil d'écoulement n'a pas pu être observé. Néanmoins, cette contrainte seuil est due à la formation d'un réseau bidimensionnel. Au repos, ce réseau créé par l'enchevêtrement de longues chaînes de ce polysaccharide peut piéger les gouttelettes et entraver complètement leur migration. Lors de l'application cutanée, un taux de cisaillement de 10^2 à 10^5 s^{-1} sera exercé (Garg et *al.*, 2002). Nous avons trouvé que la viscosité apparente de la formulation en présence de gomme xanthane est divisée par 5 lors de l'augmentation du taux de cisaillement de 10^2 à 10^3 s^{-1} . Cette diminution de la viscosité est importante pour faciliter l'étalement de la formulation lors de son application.

Cette partie de l'étude concernant la gomme xanthane montre la possibilité de moduler la texture et le comportement rhéologique de ces NEs avec des biopolymères biodégradables en améliorant la stabilité physique des formulations. Il sera alors possible de modifier les valeurs de la viscosité apparente au repos et sous cisaillement et le seuil d'écoulement en modifiant la concentration de ce biopolymère.

L'isotrétinoïne, la SA modèle sélectionnée pour cette étude, est une molécule fortement hydrophobe, sensible à la photo-isomérisation et à l'oxydation. Le Miglyol 812 solubilise mieux l'isotrétinoïne en comparaison avec les deux autres huiles grâce à sa teneur élevée en groupements ester. Cependant, la solubilité obtenue dans cette huile reste relativement modérée et ne permet pas d'atteindre une concentration dans la nanoémulsion finale supérieure à 0,033 m/m% si la fraction massique de phase dispersée est de 5 m/m%. Cela constitue seulement 66 % de la concentration en isotrétinoïne dans les produits pharmaceutiques pour application topique actuellement disponibles sur le marché. Il est important de noter que l'absorption cutanée de l'isotrétinoïne ne se fait pas par diffusion simple et est indépendante de la concentration appliquée sur la peau (Lehman et *al.*, 1988). Si notre formulation favorise l'absorption cutanée, il pourrait alors être possible d'avoir un effet thérapeutique avec notre formulation équivalent à celui du produit commercialisé même si la concentration en isotrétinoïne dans notre système est moins importante. Dans le cas où une concentration identique aux produits commerciaux est néanmoins souhaitée, une augmentation de la fraction massique de la phase huileuse est indispensable (jusqu'à 7,6 m/m%). Les résultats que nous avons obtenus pour une fraction massique plus importante (15 m/m%) montrent que cela peut être réalisable. Dans ce cas, une optimisation

de la quantité de protéine sera nécessaire et ainsi qu'une étude de stabilité de cette nouvelle formulation.

L'encapsulation de l'isotrétinoïne a été effectuée directement avec la formulation optimale, sans modification. L'isotrétinoïne est pratiquement insoluble dans l'eau mais en raison de la présence d'une quantité importante de β -lg libre dans la phase aqueuse, près de 10 % de l'isotrétinoïne se déplace de la phase huileuse vers la phase aqueuse et forme des complexes avec la β -lg. Le ratio molaire isotrétinoïne/ β -lg dans le complexe est de 1,4. Cela signifie que certaines molécules de la β -lg ont encapsulé deux molécules d'isotrétinoïne (elle pourrait être dans le cœur hydrophobe et dans la « poche » hydrophobe à la surface de la molécule de β -lg sous l'hélice α) (Figure 4).

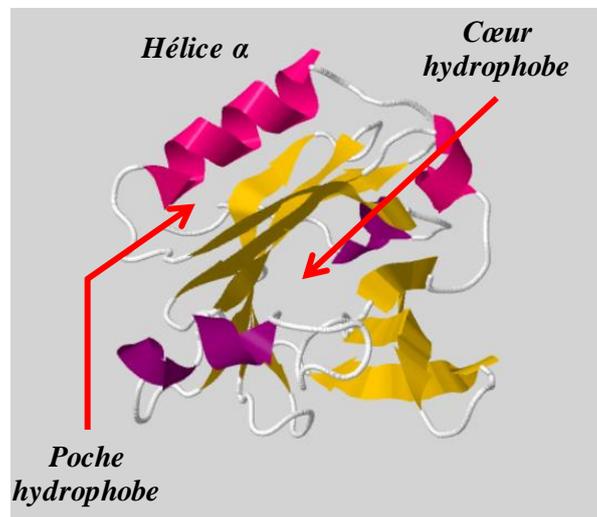


Figure 4 : Schéma représentant les éventuelles sites d'interaction de l'isotrétinoïne avec le monomère de la β -lactoglobuline (Modèle du monomère de β -lg issu de la *Protein Data Bank*).

L'encapsulation de l'isotrétinoïne dans la formulation optimale n'a aucun effet sur la taille ou la charge de gouttelettes ni sur la stabilité physique du système. Il est peu probable que la faible concentration de l'isotrétinoïne dans le Miglyol 812 ait modifié sa viscosité, facteur prédominant sur la taille des gouttelettes. Pour cela, la taille de gouttelettes n'a pas été influencée par la présence d'isotrétinoïne, quelle que soit son activité interfaciale. L'activité interfaciale de l'isotrétinoïne n'a, à notre connaissance, jamais été étudiée. L'isotrétinoïne est fortement hydrophobe et non soluble dans l'eau, mais elle contient un groupement carboxyle ionisé à pH neutre ($pK_a = 4,79$). De plus, en raison de sa capacité à former des complexes avec la β -lg, la présence d'isotrétinoïne peut modifier les propriétés interfaciales de la β -lg.

La réalisation de toutes ces caractérisations physico-chimiques de l'isotrétinoïne par rapport à ce système (effet de l'isotrétinoïne sur la viscosité du Miglyol 812, sur la tension et la rhéologie interfaciales en absence et en présence de β -lg) pourra nous éclairer à ce sujet.

D'un autre côté, l'encapsulation de l'isotrétinoïne dans ces NEs a altéré la stabilité chimique de cette molécule par rapport à sa stabilité dans le Miglyol 812. Il sera intéressant de comparer par rapport à ce qui se passe dans le gel hydro-alcoolique commercial. La photo-isomérisation vers la trétinoïne est le mécanisme principal de dégradation observée au cours de notre travail. La comparaison de l'ampleur de la photo-isomérisation de l'isotrétinoïne dans la solution huileuse et dans la nanoémulsion après séparation des deux phases montre que la présence de β -lg joue un rôle favorable à la photo-isomérisation (Chapitre IV - Figures 7 et 12). Les interactions entre la β -lg et les rétinoïdes ont été largement étudiées. Mais le travail s'est concentré sur le rétinol et la trétinoïne (Narayan et Berliner, 1997; Zsila et *al.*, 2002) et peu de données se trouvent sur les interactions avec l'isotrétinoïne. Il convient donc de clarifier ces interactions. Néanmoins, l'analyse de la composition des NEs a montré que $\approx 75\%$ de l'isotrétinoïne encapsulée dans la phase huileuse ne montrent pas de dégradation. Il est à noter que la trétinoïne générée est aussi une SA anti-acné mais avec une efficacité moindre que celle de l'isotrétinoïne (Williams et *al.*, 2012). L'étude de pénétration cutanée à partir de cette formulation et l'évaluation de l'effet thérapeutique sur un modèle animal d'acné permettra de conclure quant au potentiel ou non de cette formulation pour le traitement de cette maladie.

Enfin, la partie de l'étude concernant l'isotrétinoïne peut servir de modèle pour l'encapsulation d'autres SAs hydrophobes destinées à une application topique.

Références

- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., Agboola, S., 2014. Formation of Whey Protein Isolate Hydrolysate Stabilised Nanoemulsion. *Food Hydrocolloids* 41, 169-177.
- Asakura, S., Oosawa, F., 1954. On Interaction between Two Bodies Immersed in a Solution of Macromolecules. *The Journal of Chemical Physics* 22(7), 1255-1256.
- Asakura, S., Oosawa, F., 1958. Interaction between Particles Suspended in Solutions of Macromolecules. *Journal of Polymer Science* 33, 183-192.

- Bader, S., Bez, J., Eisner, P., 2011. Can Protein Functionalities Be Enhanced by High-Pressure Homogenization ? - A Study on Functional Properties of Lupin Proteins. *Procedia Food Science* 1, 1359-1366.
- Benjamins, J., 2000. Static and Dynamic Properties of Proteins Adsorbed at Liquid Interfaces. Ph.D. Thesis. University of Wageningen.
- Bos M. A., Vliet T. V., 2001. Interfacial Rheological Properties of Adsorbed Protein Layers and Surfactants: A Review. *Advances in Colloid and Interface Science* 91, 437-471.
- Desrumaux, A., Marcand, J., 2002. Formation of Sunflower Oil Emulsions Stabilized by Whey Proteins with High-Pressure Homogenization (up to 350 Mpa): Effect of Pressure on Emulsion Characteristics. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 263-269.
- Floury, J., Desrumaux, A., Lardieres, J., 2000. Effect of High-Pressure Homogenization on Droplet Size Distributions and Rheological Properties of Model Oil-in-Water Emulsions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1, 127-134.
- Floury, J., Legrand, J., Desrumaux A., 2004. Analysis of a New Type of High Pressure Homogeniser. Part B. Study of Droplet Break-Up and Recoalescence Phenomena. *Chemical Engineering Science* 59, 1285-1294.
- Foegeding, E. A., Davis, J. P., 2011. Food Protein Functionality: A Comprehensive Approach. *Food Hydrocolloids*, 25, 1853-1864.
- Funtenberger, S., Dumay, E., and Cheftel, J. C., 1997. High Pressure Promotes β -Lactoglobulin Aggregation Through SH/S-S Interchange Reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 912-921.
- Funtenberger, S., Dumay, E., Cheftel, J. C., 1995. Pressure-Induced Aggregation of β -Lactoglobulin in pH 7.0 Buffers. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*. 28, 410-418
- Garg, A., Aggarwal, D., Garg, S., Singla, A. K., 2002. Spreading of Semisolid Formulations. An Update. *Pharmaceutical Technology* September 2002, 84-105.
- Gracia Juliá, A., René, M., Cortés Muñoz, M., Picart, L., López Pedemonte, T., Chevalier, D., Dumay, E., 2008. Effect of Dynamic High Pressure on Whey Protein Aggregation: A Comparison with the Effect of Continuous Short Time Thermal Treatments. *Food Hydrocolloids* 22, 1014-1032.
- Harte, F., Venegas, R., 2010. A Model for Viscosity Reduction in Polysaccharides Subjected to High-Pressure Homogenization. *Journal of Texture Studies* 41, 49-61.
- He, W., Tan, Y., Tian, Z., Chen, L., Hu, F., Wu, W., 2011. Food protein-Stabilized Nanoemulsions as Potential Delivery Systems for Poorly Water-Soluble Drugs: Preparation, in Vitro Characterization, and Pharmacokinetics in Rats. *International Journal of Nanomedicine* 6, 521-533.

- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B., 2008. Re-Coalescence of Emulsion Droplets During High-Energy Emulsification. *Food Hydrocolloids* 22, 1191–1202.
- Kolakowski, P., Dumay, E., Cheftel, J.-C., 2001. Effects of High Pressure and Low Temperature on β -Lactoglobulin Unfolding and Aggregation. *Food hydrocolloids* 15(3), 215-232.
- Lee, S. H., Lefèvre, T., Subirade, M., Paquin, P., 2009. Effects of Ultra-High Pressure Homogenization on the Properties and Structure of Interfacial Protein Layer in Whey Protein-Stabilized Emulsion. *Food Chemistry* 113, 191-195.
- Lee, S.J., McClements, D.J., 2010. Fabrication of Protein-Stabilized Nanoemulsions Using a Combined Homogenization and Amphiphilic Solvent Dissolution/Evaporation Approach. *Food Hydrocolloids* 24, 560-569.
- Lehman, P. A., Slattery, J. T., Franz, T. J., 1988. Percutaneous Absorption of Retinoids: Influence of Vehicle, Light Exposure, and Dose. *Journal of Investigative Dermatology* 91(1), 56-61.
- Lémery, E., Briçon, S., Chevalier, Y., Bordes, C., Oddos, T., Gohier, A., Bolzinger, M. A., 2015. Skin Toxicity of Surfactants: Structure/Toxicity Relationships. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 469, 166-179.
- Maali, A., Mosavian, M. T. H., 2013. Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade (2000-2010). *Journal of Dispersion Science and Technology* 34, 92-105.
- Mackie, A. R., Mingins, J., Dann, R., 1991. Preliminary Studies of β -Lactoglobulin Adsorbed on Polystyrene Latex. In: *Food Polymers, Gels and Colloids*, ed. E. Dickinson. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 96-112.
- Narayan, M., Berliner, L. J., 1997. Fatty Acids and Retinoids Bind Independently and Simultaneously to β -Lactoglobulin. *Biochemistry* 36, 1906-1911.
- Oliveira, P. D., Michel, R. C., McBride, A. J. A., Moreira, A. S., Lomba, R. F. T., Vendruscolo, C. T., 2013. Concentration Regimes of Biopolymers Xanthan, Tara, and Clairana, Comparing Dynamic Light Scattering and Distribution of Relaxation Time. *PLoS ONE* 8(5), e62713.
- Papagiannopoulos, A., Sotiropoulos, K., Pispas, S., 2016. Particle Tracking Microrheology of the Power-Law Viscoelasticity of Xanthan Solutions. *Food Hydrocolloids* 61, 201–210.
- Paquin, P., 1999. Technological Properties of High Pressure Homogenizers: the Effect of Fat Globules, Milk Proteins, and Polysaccharides. *International Dairy Journal* 9, 329-335.
- Qian, C., McClements, D. J., 2011. Formation of Nanoemulsions Stabilized by Model Food-Grade Emulsifiers Using High-Pressure Homogenization: Factors Affecting Particle Size. *Food Hydrocolloids* 25, 1000-1008.
- Relkin, P., Jung, J. M., Ollivon, M., 2009. Factors Affecting Vitamin Degradation in Oil-in-Water Nano-Emulsions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 98, 13-18.

- Reynolds, J. A., Tanford, C., 1970. Binding of Dodecyl Sulfate to Proteins at High Binding Ratios. Possible Implications for the State of Proteins in Biological Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 66(3), 1002-1003.
- Sakuno, M.M., Matsumoto, S., Kawai, S., Taihei, K., Matsumura, Y., 2008. Adsorption and structural change of β -Lactoglobulin at the diacylglycerol-water interface. *Langmuir* 24, 11483-11488.
- Salager, J. L., Forgiarini, A., Marquez, L., 2006. Nanoemulsions. FIRP Booklet n°E237A Laboratorio FIRP, Escuela De Ingenieria Quimica, Universidad de Los Andes, Venezuela.
- Schokker, E. P., Singh, H., Pinder, D. N., Norris, G. E., Creamer, L. K., 1999. Characterization of Intermediates Formed During Heat-Induced Aggregation of B Lactoglobulin AB at Neutral pH. *International Dairy Journal* 9, 791-800.
- Seekkuarachchi, I. N., Tanaka, K., Kumazawa, H., 2006. Formation and Characterization of Submicrometer Oil-in-Water (O/W) Emulsions Using High-Energy Emulsification. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 45, 372-390.
- Simon, J. L., 2001. Gomme Xanthane : Agent Viscosifiant et Stabilisant. *Techniques de l'Ingénieur* F4300 v1.
- Smulders, P. E. A., 2000. Formation and Stability of Emulsions Made With Proteins and Peptides. Ph.D. Thesis. University of Wageningen.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C., 2004. Formation and Stability of Nano-Emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 108 –109, 303-318.
- Teo, A., Goh, K. K. T., Wen, J., Oey, I., Ko, S., Kwak, H-S., Lee, S. J., 2016. Physicochemical Properties of Whey Protein, Lactoferrin and Tween 20 Stabilised Nanoemulsions: Effect of Temperature, pH and Salt. *Food Chemistry* 197, 297-306.
- Walstra, P., 1993. Principles of Emulsion Formation. *Chemical Engineering Science* 48(2), 333-349.
- Williams, H. C., Dellavalle, R. P., Garner, S., 2012. Acne Vulgaris. *The Lancet* 379, 361-372.
- Wong, J., 2015. Nanotherapeutics in: Escoffier L., Ganau, M., Wong J., *Nanotherapeutics in Commercializing Nanomedicine: Industrial Applications, Patents, and Ethics*. Pan Stanford Publishing, Singapore.
- Wooster, T. J., Golding, M., Sanguansri, P., 2008. Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability. *Langmuir* 24, 12758-12765.
- Yuan, B., Ren, J., Zhao, M., Luo, D., Gu, L., 2012. Effects of Limited Enzymatic Hydrolysis with Pepsin and High-Pressure Homogenization on the Functional Properties of Soybean Protein Isolate. *LWT- Food Science and Technology* 46, 453-459.

Zsila, F., Bikádi, Z., Simonyi, M., 2002. Retinoic Acid Binding Properties of the Lipocalin Member β -Lactoglobulin Studied by Circular Dichroism, Electronic Absorption Spectroscopy and Molecular Modeling Methods. *Biochemical Pharmacology* 64, 1651-1660.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de cette thèse, nous avons formulé des NEs d'intérêt pharmaceutique stabilisées par une protéine globulaire, la β -lactoglobuline, en remplacement des tensioactifs de synthèse. Nous avons mené une caractérisation physico-chimique approfondie de ces systèmes et nous avons commencé à étudier leur potentiel pour l'encapsulation de l'isotrétinoïne en vue d'une application topique.

Les effets de la composition de la formulation (la concentration de protéine dans la phase aqueuse et la nature et la fraction massique de la phase huileuse) et des facteurs du procédé d'émulsification par HPH (la pression et le nombre des cycles) ont été étudiés et optimisés afin d'obtenir des gouttelettes nanométriques dans des NEs stables sur une longue période. L'étude physico-chimique des différentes phases huileuses et des propriétés interfaciales de la β -lactoglobuline à l'interface O/W a permis de mieux comprendre le mécanisme de l'émulsification, les mécanismes de stabilisation et de déstabilisation de cette protéine. Il ressort de cette étude que l'efficacité d'émulsification par l'HPH est principalement gouvernée par la viscosité de la phase huileuse et que la tension interfaciale entre les deux phases n'a pas eu d'effet à cet égard. La β -lg stabilise les gouttelettes d'huile par la formation d'un film interfacial quasiment purement élastique. Pour cela, une concentration minimale de protéine (dépendant de la fraction massique de la phase huileuse) est indispensable pour permettre la formation de ce film et, en conséquence, obtenir une stabilité cinétique contre les phénomènes de croissance des gouttelettes. La stabilité des NEs contre les phénomènes de déstabilisation réversibles, principalement le crémage, est influencée par la charge des gouttelettes et surtout par leur taille.

Suite à cette première étude d'optimisation de formulation, les effets de l'HPH sur les différents niveaux structuraux de la β -lg et sur ses propriétés interfaciales et émulsionnantes ont été étudiés. Les résultats obtenus montrent que l'efficacité émulsionnante de la β -lg est optimale quand ce traitement ne modifie pas significativement la structure de la protéine ni son activité interfaciale. La dénaturation de la protéine induite par l'homogénéisation à des valeurs élevées de pression consiste en la transformation des éléments de structure secondaire en structures désordonnées, une large perte dans la structure tertiaire et une agrégation

importante par des liaisons disulfure intermoléculaires. La β -lg dénaturée de cette manière est plus hydrophobe, s'adsorbe à l'interface O/W et forme un film élastique à l'interface plus rapidement par rapport à la protéine non traitée. L'amélioration des propriétés interfaciales de la protéine dénaturée n'améliore cependant pas ses propriétés émulsionnantes. Au contraire, la dénaturation de la protéine lors de l'émulsification a été le facteur principal responsable de la réduction de l'efficacité émulsionnante. Des hypothèses ont été proposées pour expliquer cet effet et sont la re-coalescence des gouttelettes induite par l'augmentation de l'hydrophobie de la protéine ou la floculation par des liaisons disulfure inter-gouttelettes. La réalisation d'un traitement réducteur, tel que celui avec le 2-mercaptoéthanol, et l'étude de son effet sur le diamètre des gouttelettes permettra de vérifier la présence de liaisons disulfure inter-gouttelettes. La visualisation des NEs par microscopie électronique permettra également de mieux comprendre la relation entre la dénaturation de la protéine et la réduction de son efficacité émulsionnante.

Une étude de l'effet de l'HPH, par les techniques mises en œuvre au cours de ce travail, sur la structure de la protéine dans les deux phases de la nanoémulsion préalablement séparées sera importante pour valider les résultats obtenus dans la solution et ainsi comprendre la relation entre la dénaturation interfaciale et la dénaturation par l'homogénéisation.

L'efficacité des NEs développées pour l'encapsulation d'une SA hydrophobe modèle a été étudiée avec l'isotrétinoïne. Nous avons pu obtenir une dose inférieure (66 %) aux formulations existantes. L'efficacité de l'encapsulation est limitée par la solubilité de la SA dans la phase huileuse. Il est néanmoins possible d'obtenir une concentration identique aux formulations commerciales en augmentant la fraction massique de la phase huileuse. Cela nécessite cependant une optimisation de la quantité de protéine et une étude de la stabilité pour cette nouvelle formulation. L'isotrétinoïne subit une isomérisation partielle vers la trétinoïne probablement en raison de son interaction avec la β -lg. La présence de l'isotrétinoïne dans les NEs n'a aucun effet sur la taille, la charge des gouttelettes ni sur la stabilité physique du système.

L'activité interfaciale de l'isotrétinoïne (tension et rhéologie interfaciales) à l'interface Miglyol 812/eau sera à évaluer ainsi que son influence sur l'activité interfaciale de la β -lg. L'interaction entre l'isotrétinoïne et la β -lg dans la solution et dans la phase aqueuse des NEs

pourra être réalisée grâce aux techniques de dichroïsme circulaire et de spectroscopie de fluorescence.

Les NEs préparées, en absence de SA, sont formulées à partir de composés naturels et biocompatibles, à l'exception d'une très faible concentration d'agent conservateur (l'azotate de sodium). Ce composé très toxique a été ajouté pour son effet bactériostatique car notre formulation présente un milieu favorable au développement des bactéries. Il serait indispensable de le remplacer par un autre agent conservateur accepté dans les produits pharmaceutiques. Il sera ensuite utile de vérifier la biocompatibilité de la formulation finale et l'absence d'effet irritant ou toxique sur la peau par l'évaluation de la viabilité cellulaire (l'essai de réduction du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium)) ou le test d'irritation cutanée *in-vivo*. L'influence de l'encapsulation de l'isotrétinoïne dans les NEs sur ces effets irritants sera également à étudier par les mêmes méthodes que citées ci-dessus. Dans cette étude nous avons sélectionné la β -lg comme protéine modèle en raison de ses propriétés avantageuses pour la formulation d'émulsion mais aussi parce qu'elle a été très bien caractérisée. Néanmoins, la β -lg est une des protéines du lait impliquée dans l'allergie aux produits laitiers. La réalisation du test cutané (Prick test) permettra d'évaluer l'effet de la conformation de cette protéine à l'interface des gouttelettes sur son antigénicité. Elle pourra être remplacée par des protéines susceptibles d'être moins allergisantes telles que les protéines de pois.

Enfin, la localisation des gouttelettes des NEs lors d'une administration cutanée sera à réaliser par microscopie confocale à balayage laser avec le marquage de la phase huileuse (rouge Nile) et de la protéine (fluorescéine isothiocyanate). La libération de l'isotrétinoïne à partir de ces NEs et sa pénétration cutanée dans les différentes couches de la peau peuvent être étudiées sur des modèles *ex-vivo* (peau d'oreille de porc ou peau humaine) dans des cellules de Franz avant de passer vers l'étude de l'efficacité thérapeutique sur des modèles animaux d'acné.

ANNEXE I

1 Effect of the composition and process conditions on the droplet Zeta potential and its stability

The effect of the NEs composition and of the homogenization process on the droplet ζ -potential was discussed in the Chapitre II. Herein, the following figures that contain the details of the effect of the oil nature (Figure 1), the effect of homogenization pressure and number of homogenization cycles (Figure 2), the effect of protein concentration (Figure 3), the effect of oil weight fraction (Figure 4) on the droplet ζ -potential (day 0), and the effect of these parameters on the stability of droplet ζ -potential over time (Figure 5).

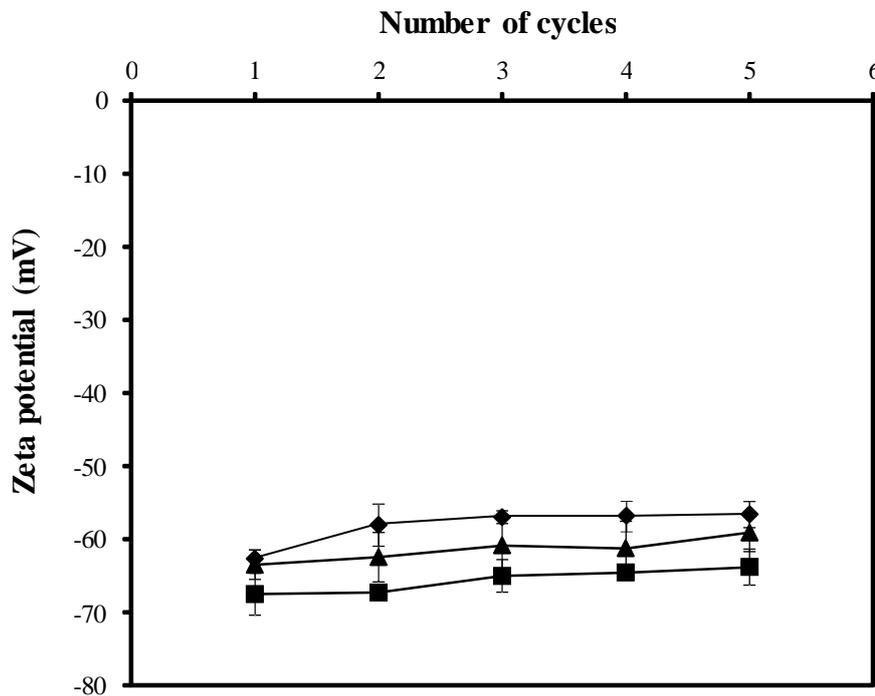


Figure 1: Effect of the number of homogenization cycles and of oil nature on the droplet Zeta potential of the NEs for the nanoemulsion composition: oily phase: 5 wt% of (♦) Miglyol 812; (■) sweet almond oil; (▲) wheat germ oil, aqueous phase: β -lg solution 1 wt%, operating conditions: 100 MPa.

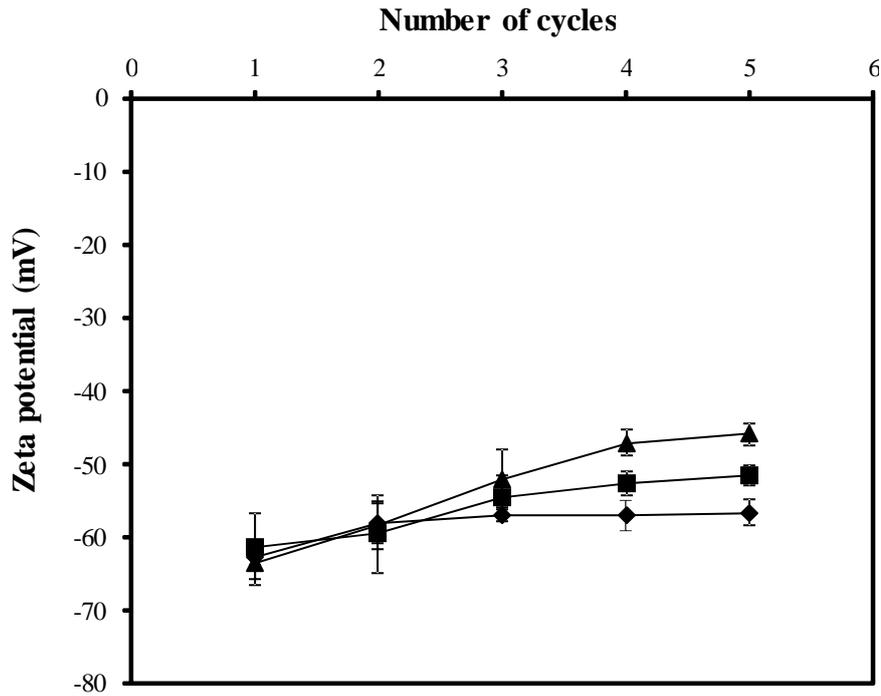


Figure 2: Effect of the homogenization pressure and of the number of cycles on the droplet Zeta potential of the NEs for nanoemulsion composition: oily phase: 5 wt% of Miglyol 812, aqueous phase: β -lg solution 1 wt%, operating conditions: (♦) 100 MPa; (■) 200 MPa; (▲) 300 MPa.

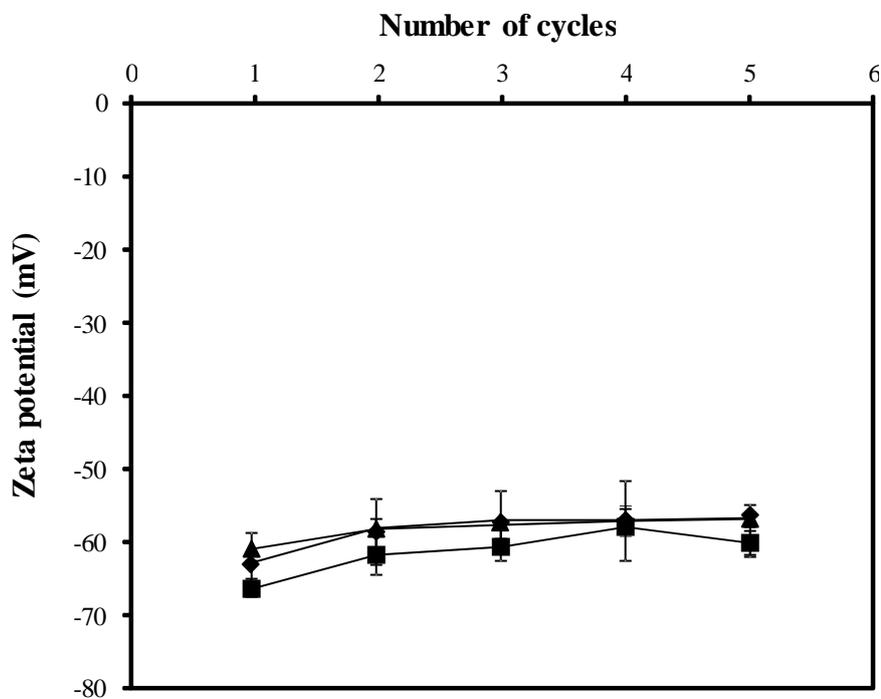


Figure 3: Effect of the β -lg concentration and of the number of homogenization cycles on the droplet Zeta potential of the NEs for nanoemulsion composition: oily phase: 5 wt% of Miglyol 812, aqueous phase: β -lg solution at (♦) 0.5 wt%; (■) 1 wt%; (▲) 2 wt%, operating conditions: 100 MPa.

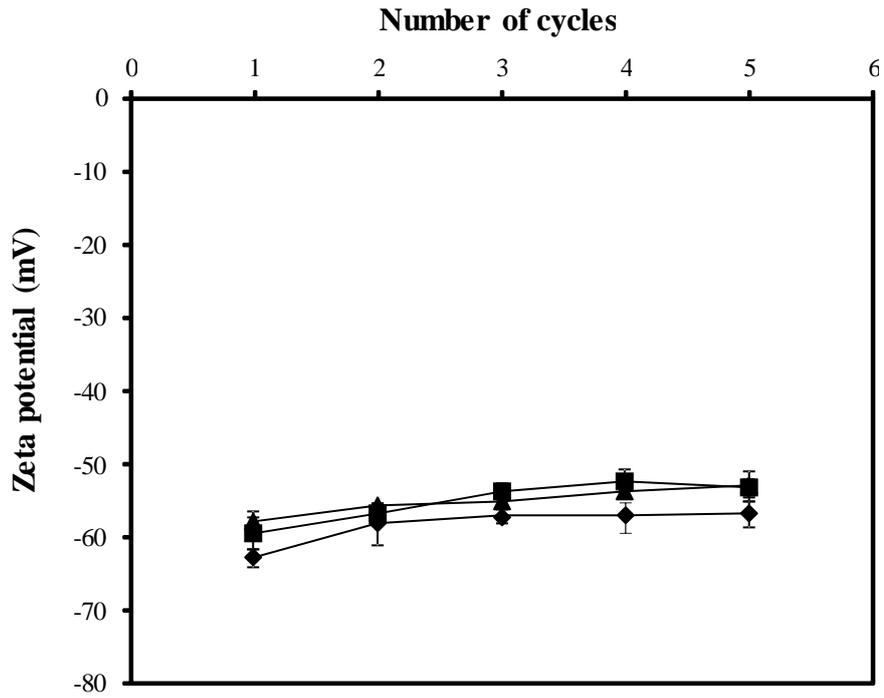


Figure 4: Effect of the oil weight fraction and of the number of homogenization cycles of on the droplet Zeta potential of the NEs for nanoemulsion composition: oily phase: Miglyol 812 (♦) 5 wt%; (■) 15 wt%; (▲) 30 wt%, aqueous phase: β -lg solution 1 wt%, operating conditions: 100 MPa.

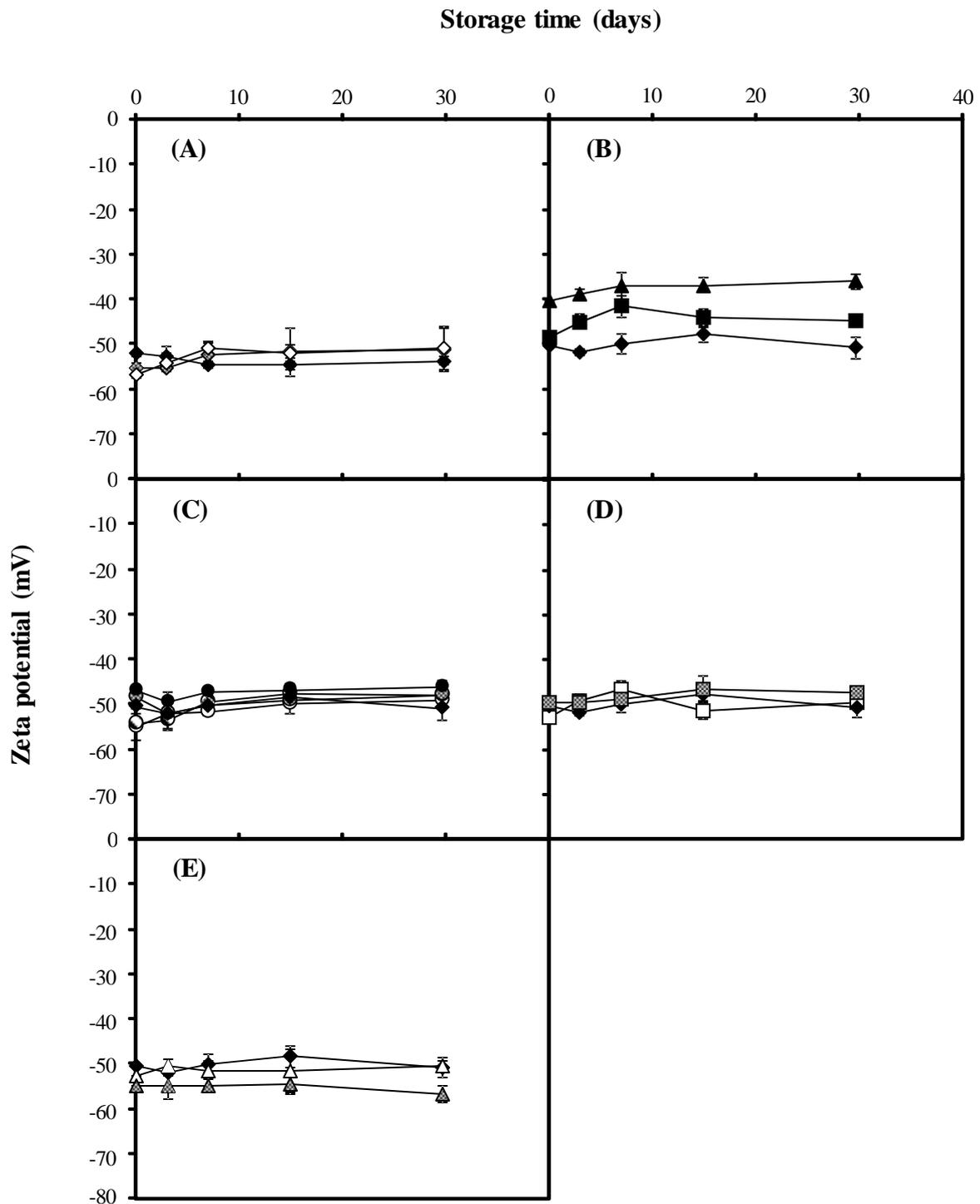


Figure 5: Effect of composition and process conditions on the droplet Zeta potential stability of the NEs: (A) Effect of oil nature: (\blacklozenge) F4 (Miglyol 812); (\blacklozenge) F6 (sweet almond oil); (\diamond) F7 (wheat germ oil). (B) Effect of pressure homogenization: (\blacklozenge) F4 (100 MPa); (\blacksquare) F8 (200 MPa); (\blacktriangle) F9 (300 MPa). (C) Effect of number of cycles: (\circ) F1 (1 cycle); (\bullet) F2 (2 cycles); (\bullet) F3 (3 cycles); (\blacklozenge) F4 (4 cycles); (\bullet) F5 (5 cycles). (D) Effect of β -lg concentration: (\square) F10 (0.5 wt%); (\blacklozenge) F4 (1 wt%); (\blacksquare) F11 (2 wt%). (E) Effect of oil weight fraction: (\blacklozenge) F4 (5 wt%); (\triangle) F12 (15 wt%); (\blacktriangle) F13 (30 wt%).

2 Effect of the composition and process conditions on the nanoemulsion viscosity and its stability

The following figure (Figure 6) shows the effect of the NEs composition and the homogenization process on the nanoemulsion viscosity (day 0): (A) effect of the number of cycles; (B) the effect of the protein concentration; (C) the effect of oil weight fraction. Figure 7 shows the effect of all formulation composition and process parameters on the stability of the nanoemulsion viscosity over time.

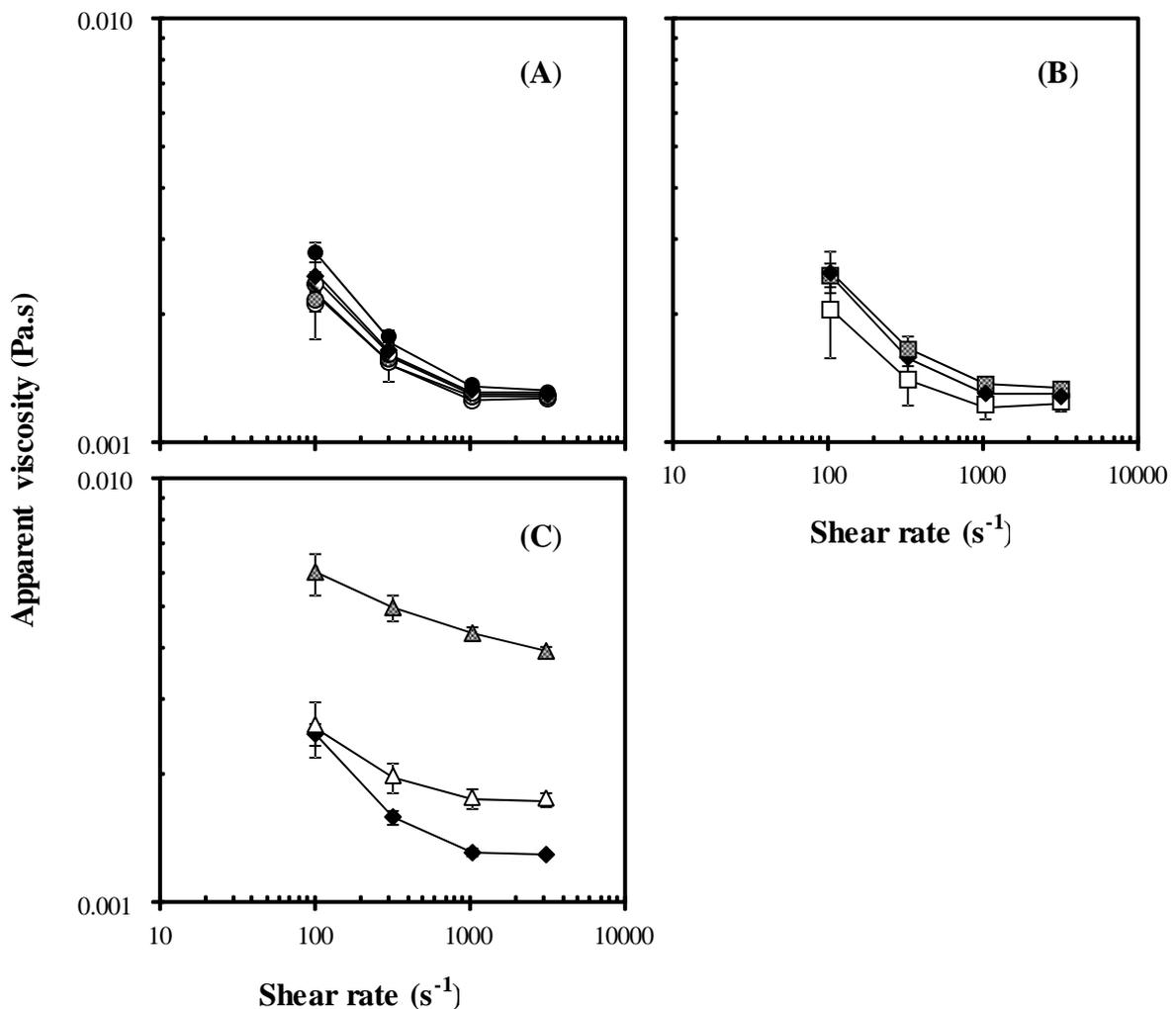


Figure 6: Effect of composition and process conditions on the rheogram of NEs: (A) Effect of number of cycles: (○) F1 (1 cycle); (◐) F2 (2 cycles); (◑) F3 (3 cycles); (◒) F4 (4 cycles); (●) F5 (5 cycles). (B) Effect of β -lg concentration: (□) F10 (0.5 wt%); (◈) F4 (1 wt%); (◩) F11 (2 wt%). (C) Effect of oil weight fraction: (◈) F4 (5 wt%); (△) F12 (15 wt%); (◤) F13 (30 wt%). Oily phase: Miglyol 812, operating conditions: 100 MPa.

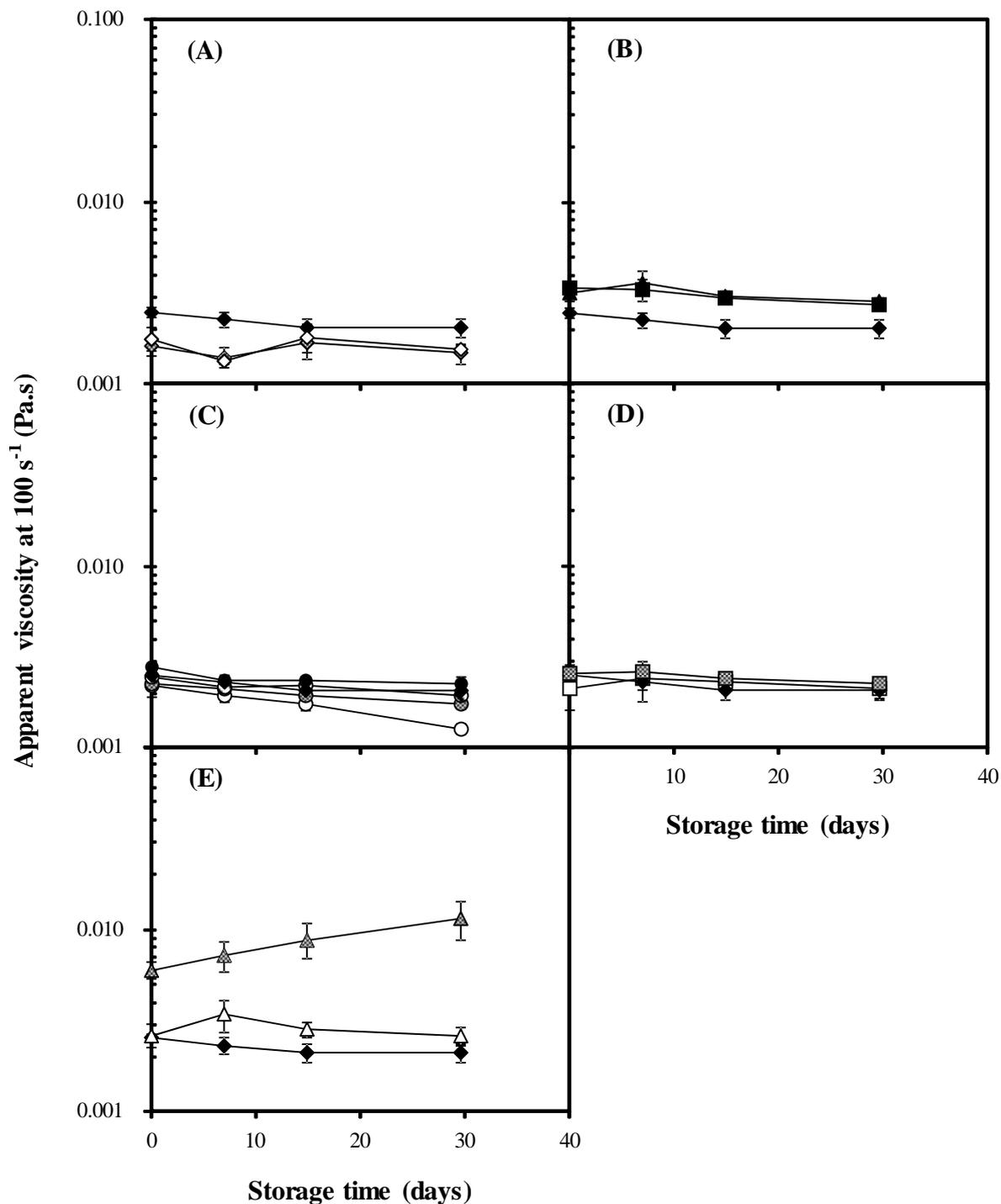


Figure 7: Effect of composition and process conditions on the apparent viscosity stability of NEs at 100 s⁻¹ of shear rate: (A) Effect of oil nature: (♦) F4 (Miglyol 812); (◈) F6 (sweet almond oil); (◇) F7 (wheat germ oil). (B) Effect of pressure homogenization: (♦) F4 (100 MPa); (■) F8 (200 MPa); (▲) F9 (300 MPa). (C) Effect of number of cycles: (○) F1 (1 cycle); (◉) F2 (2 cycles); (◐) F3 (3 cycles); (◆) F4 (4 cycles); (●) F5 (5 cycles). (D) Effect of β-Ig concentration: (□) F10 (0.5 wt%); (♦) F4 (1 wt%); (◼) F11 (2 wt%). (E) Effect of oil weight fraction: (♦) F4 (5 wt%); (△) F12 (15 wt%); (▲) F13 (30 wt%).

ANNEXE II

Free protein measurement

The free protein measurements were carried out using centrifugal filters and UV/vis spectrophotometer as previously described in Chapter IV (Part 3.5). The free protein percentage was determined in the nanoemulsion formulations that contain different protein concentrations in the aqueous phase (F4, F10, and F11) and different oil weight fractions (F4, F12, and F13) at days 0, 3, 7, 15, and 30 (the composition of these formulations is described in Chapter II - Table 3). Interfacial protein concentration was calculated from Equation 7 (Chapter II - Part 3.2.3) taking into account that C_S is the concentration of the adsorbed protein. Samples were prepared at least in duplicate. Protein separation was carried out in triplicate and the results are shown in Figure 1, expressed as their mean \pm standard deviation.

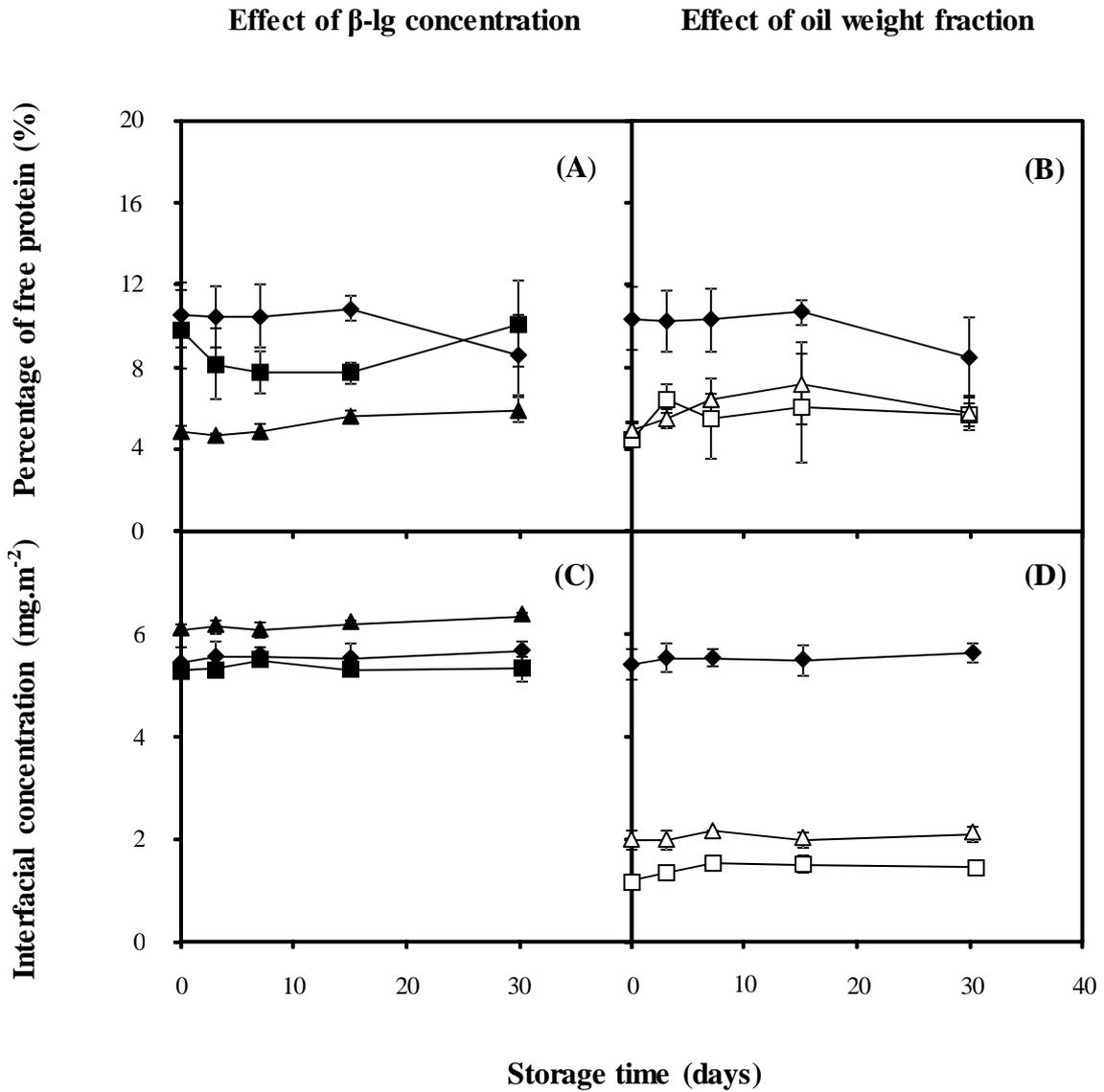


Figure 1: Percentage of free protein in the aqueous phase (A and B) and interfacial protein concentration (C and D) over time of NEs: (A and C) Effect of β -lg concentration: (▲) F10 (0.5 wt%); (◆) F4 (1 wt%); (■) F11 (2 wt%). (B and D) Effect of oil weight fraction: (◆) F4 (5 wt%); (△) F12 (15 wt%); (□) F13 (30 wt%). Oily phase: Miglyol 812, operating conditions: 4 cycles at 100 MPa.

Titre : Nanoémulsions d'intérêt pharmaceutique stabilisées par la β -lactoglobuline

Mots clés : nanoémulsions; β -lactoglobuline; homogénéisation à haute pression; structure de la protéine; rhéologie interfaciale; encapsulation; isotrétinoïne

Résumé :

L'objectif de cette thèse est de formuler des nanoémulsions pharmaceutiques huile/eau stabilisées par une protéine, la β -lactoglobuline, en remplacement des tensioactifs synthétiques, potentiellement toxiques. Les nanoémulsions ont été préparées par homogénéisation à haute pression. La composition de la formulation et les conditions du procédé ont été optimisées afin d'obtenir des nanoémulsions stables. Les effets du procédé d'homogénéisation sur la structure de la protéine et sur ses propriétés interfaciales et émulsionnantes ont été évalués. Les nanoémulsions les plus stables ont été obtenues quand l'huile ayant la viscosité la plus faible a été utilisée en tant que phase huileuse, avec des conditions du procédé modérées. Avec des conditions plus drastiques, l'efficacité émulsionnante a été diminuée en raison de la dénaturation de la protéine. La formulation optimale développée a permis d'encapsuler l'isotrétinoïne, un modèle de substance active hydrophobe, sans aucune modification de la stabilité du système. Une telle formulation semble prometteuse en tant que système de délivrance de médicament pour une application topique.

Title: Nanoemulsion stabilized by β -lactoglobulin for a pharmaceutical application

Keywords: nanoemulsions; β -lactoglobulin; high pressure homogenization; protein structure; interfacial rheology; encapsulation; isotretinoin

Abstract:

The aim of this thesis was to formulate pharmaceutical oil/ water nanoemulsions stabilized by a protein, β -lactoglobulin, instead of potentially toxic synthetic surfactants. Nanoemulsions were prepared by high pressure homogenization. The formulation composition and the process conditions were optimized in order to obtain stable nanoemulsions. The effects of the homogenization process on the protein structure and on its interfacial and emulsifying properties were assessed. The most stable nanoemulsions were obtained when the oil with the lowest viscosity was used as the oily phase with moderate process conditions. At severe process conditions, the emulsifying efficiency of the protein was reduced due its denaturation. The developed optimal formulation was able to encapsulate isotretinoin, a model of hydrophobic active compound, without any modification of the system stability. Such a formulation seems to be a promising drug delivery system for a topical application.

Laboratoire de rattachement :

Institut Galien Paris-Sud, UMR CNRS 8612
Université Paris-Sud, UFR de pharmacie
5 Rue Jean Baptiste Clément
92290 Châtenay-Malabry